

«УТВЕРЖАЮ»



Директор ИАиЭ СО РАН

чл.-корр. РАН

С.А. Бабин

«22» Октября 2018 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию

Маслова Николая Анатольевича

«Лазерно-индуцированная флуоресценция биологических тканей при импульсном ультрафиолетовом возбуждении».

представленную на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 01.04.21 – лазерная физика.

Флуоресценция широко используется для дистанционного зондирования конденсированных и газообразных сред, для изучения и идентификации сложных биологических молекул, проведения количественной и качественной диагностики, в том числе в медицинских целях. Использование лазерного излучения для возбуждения флуоресценции обладает рядом принципиальных преимуществ, таких как: высокая импульсная мощность, позволяющая добиваться высокого соотношения сигнал/шум; монохроматичность излучения, позволяющая селективно воздействовать на флуоресцирующие молекулы; некоторые лазеры обладают возможностью плавной перестройки частоты излучения, позволяя точно настраиваться на полосы поглощения флуоресцирующих веществ. Поэтому лазерные приборы находят всё большее применение в медицине в качестве диагностического инструмента. Тем не менее, поиск новых подходов, расширение круга задач не теряют актуальности. Следует отметить, что флуоресцентная диагностика может осуществляться как с помощью окрашивания образцов флуоресцентными маркерами, так и с помощью естественных флуорофоров без изменения свойств образца, что делает такую диагностику малоинвазивной, не требующей предварительной подготовки. В ультрафиолетовой (УФ) части спектра много полос молекулярного поглощения естественных флуорофоров, при этом лазерно-индуцированная флуоресценция (ЛИФ) биологических тканей, возбуждаемая УФ

лазерными источниками, и возможности её практического использования долгое время оставались малоизученными, особенно в диапазоне длин волн возбуждения 200-300 нм, поэтому **актуальность темы диссертационной работы** Н.А. Маслова не вызывает сомнений.

Диссертация посвящена исследованию спектров ЛИФ биологических тканей, возбуждаемой ультрафиолетовым излучением эксимерного KrF лазера и Nd:YAG лазера с оптопараметрической перестройкой длины волны в диапазоне 210-350 нм, а также разработке подходов к статистическому анализу полученных спектров. Диссертация содержит 327 страниц, 224 иллюстрации, состоит из введения, семи глав, заключения и списка используемой литературы из 275 источников.

Во введении автор кратко перечисляет особенности лазерной флуоресцентной диагностики, обосновывает актуальность диссертационной работы, формулирует цели и задачи исследования, приводит основные положения, выносимые на защиту, пункты научной новизны, научной и практической ценности.

В первой главе описаны базовые принципы использования лазерной флуоресцентной спектроскопии для диагностики состояния биологических объектов. Рассматриваются известные флуоресцирующие соединения, возбуждаемые УФ излучением; влияние свойств оптически протяжённых образцов на спектры флуоресценции; влияние УФ излучения, приводящее к фотообесцвечиванию образцов; примеры использования ЛИФ для медицинской диагностики. Приведён круг перспективных задач для УФ лазерной диагностики.

Во второй главе описываются созданные автором экспериментальные установки для исследования ЛИФ. В них использовалось самое современное оборудование, позволяющее регистрировать малые интенсивности флуоресценции и, соответственно, использовать низкие дозы УФ облучения. В качестве источника возбуждающего ЛИФ излучения применялись эксимерный KrF лазер с длиной волны 248 нм и Nd:YAG лазер с оптопараметрической перестройкой длины волны в диапазоне 210-350 нм. Флуоресценция регистрировалась спектрометрами с усилителем яркости или охлаждаемой ПЗС матрицей с обратным освещением электродов. Все установки автоматизированы, обладают высокой чувствительностью. Особенностью УФ ЛИФ является одновременное возбуждение нескольких флуорофоров. С одной стороны это делает применение УФ излучение эффективным инструментом, позволяя получать большой объем информации. С другой стороны спектры флуоресценции сложных органических молекул сплошные, что приводит формированию у образца биологической ткани сплошного спектра из множества перекрывающихся полос. Таким образом, у спектров, полученных с высоким

спектральным разрешением, каждый из спектральных каналов является значимым и требуется анализ всего комплекса параметров. Регрессия к спектрам известных флуорофоров может не дать результата: они могут менять свои свойства в зависимости от окружения молекулы; могут сказываться нелинейные эффекты, например, реабсорбция флуоресценции; при проведении новых исследований, когда изначально недостаточно информации об объекте. Одним из подходов к решению указанных проблем является сокращение числа используемых спектральных признаков путём выбора информативной подсистемы используемых спектральных каналов, используя статистические различия спектров, например методом главных компонент. Главные компоненты помогают найти закономерности в динамике спектров ЛИФ, однако, не позволяет анализировать спектры, поскольку являются абстрактными знакопеременными функциями, свести которые к спектрам непосредственно флуоресцирующих отдельных веществ без дополнительных данных нельзя. В диссертации развит метод анализа главных компонент, заключающийся в том, что из них составляются положительно определённые линейные комбинации, соответствующие пикам наименьшей возможной ширины. В экспериментах с оптическим фантомом показано, что данное преобразование позволяет приближённо восстанавливать спектры флуорофоров, в том числе неизвестных заранее. Восстановленные спектры флуоресцирующих веществ, можно сопоставлять со спектрами известных, проводить качественный и количественный анализ их динамики.

В третьей главе изучаются характерные особенности ЛИФ с применением описанных выше лазерных источников на примере отдельных флуорофоров, тканей животных, человека. Установлено, что высокая импульсная мощность используемых УФ лазеров накладывает определённые ограничения: при использовании лазеров с длинами волн в диапазоне 210-300 нм и наносекундными длительностями импульса, энергия импульса лазерного излучения не должна превышать 200 мкДж/см². При больших энергиях у биологических образцов сказывается нелинейность интенсивности ЛИФ в зависимости от энергии импульса лазерного излучения, что недопустимо для адекватного сравнения эффективностей возбуждения, полученных в разных условиях. Автор связывает данное явление с поглощением возбуждающего излучения нефлуоресцирующими хромофорами, полосы поглощения которых перекрываются с полосами возбуждения флуорофоров. Таким образом, эффективно ограничивается глубина проникновения лазерного излучения. В отсутствие дополнительного поглощения нелинейность пропадает, что хорошо известно для ЛИФ газов, где наблюдаются узкие линии поглощения. Данная модель хорошо описывает экспериментальные данные. На примере тканей глаза человека продемонстрирована возможность определять тип тканей по

спектрам ЛИФ: в диапазоне длин волн возбуждения 210-290 нм выделение вкладов трёх основных пиков позволяет дифференцировать ткани капсулы хрусталика, ее эпителия и ядра самого хрусталика, в коротковолновой области для каждого типа образцов характерен вклад одной компоненты. Это даёт возможность обнаружения и удаления фрагментов эпителия во время хирургического вмешательства.

Четвёртая глава посвящена разработке диагностики минерализованных тканей: зуба, кости, кальцинированных сосудов и клапанов сердца. При возбуждении лазерным излучением с длиной волны 248 нм ЛИФ этих тканей содержит три основных спектральных компоненты. Пик, соответствующий минеральной составляющей позволяет визуализировать пораженные кальцинозом ткани, поражения кариесом тканей зуба приводит к уменьшению вклада пика, соответствующего коллагеновой составляющей ткани.

В пятой главе исследованы возможности ЛИФ для диагностики состояния миокарда сердца, предназначенного для пересадки, в процессе хранения. Опробованы различные подходы к измерениям, результаты сравнивались с экспериментами с культурой клеток сердца. Достоверная динамика обнаружена только при регистрации ЛИФ на срезе миокарда, причём неравномерная деградация ткани миокарда в процессе хранения приводит к спектральным изменениям ЛИФ, которые происходят неравномерно внутри тканей сердца.

Шестая глава посвящена вопросам оптического контроля биотехнологических процессов перспективных для задач трансплантации крупных сосудов. Обнаружено, что спектры ЛИФ аорты в процессе криосохранения при температуре жидкого азота не изменяются, если образцы были подготовлены с соблюдением технологии, в противном случае ухудшение качества трансплантата из-за пропитывания ткани кровью приводит к появлению полосы реабсорбции флуоресценции. Многообещающей технологией является создание искусственных тканей для замещения поврежденных крупных сосудов. На первом этапе для создания совместимого с пациентом трансплантата из донорской ткани необходимо удалить жизнеспособные клетки, и этот процесс требует контроля. Спектры ЛИФ тканей аорты при использовании 248 нм лазера состоят из трёх основных пиков. В процессе удаления клеток интенсивность компоненты, флуоресцирующей в области 400-500 нм, уменьшается, что отражает завершённость процесса.

Седьмая глава посвящена ЛИФ диагностике поражённых различными опухолями тканей. Сравнение спектров флуоресценции образцов тканей мышей и человека показывает сходные особенности. Оптимальным диапазоном длин волн возбуждающего излучения является 240-260 нм, характерные изменения флуоресценции при поражении

тканей наблюдаются в полосе 350-370 нм. Предложен способ визуализации границ злокачественных опухолей в мозге по флуоресценции протопорфирина IX, основанный на импульсно-периодической системе регистрации с вычитанием фона. Обычно наблюдается флуоресценция низкой интенсивности, и хирургу приходится проводить диагностику в темноте. Создан и испытан основанный на данном способе аппаратный комплекс, который при естественном освещении операционной позволяет регистрировать флуоресценцию, накладывая её изображение на изображение операционного поля. Это позволяет хирургу одновременно проводить диагностику и удаление опухоли, не повреждая окружающие ткани.

Научная ценность диссертационной работы заключается в том, что разработан метод анализа ЛИФ биологических тканей при УФ возбуждении. На примере большого числа типов биологических тканей, участвующих в различных естественных и биотехнологических процессах, показано, что спектры представимы в виде суммы небольшого числа (2-4) главных компонент. Главные компоненты сводятся к пикам наименьшей возможной ширины, формы которых можно сопоставлять с известными флуорофорами, находить неизвестные. Анализ вкладов пиков в спектр дают гораздо более глубокое представление о структуре тканей, чем обезличенные главные компоненты. Получен огромный экспериментальный материал, который демонстрирует комплексный подход к изучаемой проблеме: определены критерии применимости используемого лазерного излучения для проведения корректных измерений; разработан подход к анализу полученных сплошных спектров, который вначале опробован на оптических фантомах, а затем при анализе множества спектров ЛИФ, начиная от клеток до целых тканей, показана его эффективность.

Практическая ценность диссертации заключается в том, что полученные данные решают ряд актуальных медицинских диагностических задач. ЛИФ диагностика позволяет получать информацию в режиме реального времени без нарушения свойств диагностируемых тканей. Различия спектров ЛИФ тканей глаза, минерализованных тканей могут использоваться для диагностики во время хирургических манипуляций. Возможен непрерывный контроль биотехнологических процессов при криохранении, создании искусственных тканей. Разработанное устройство с импульсно-периодической системой регистрации и вычитанием фона позволяет производить визуализацию границ злокачественных опухолей при естественном освещении операционной и одновременно представляет микрохирургическую картину. Аутофлуоресценция, возбуждаемая УФ лазерным излучением, может быть использована для интраоперационного определения их границ и последующего удаления.

Диссертация написано в целом грамотно, хорошо оформлена. Наличие в тексте опечаток, в частности, вместо постоянной Планка иногда встречается буква «эта», минимально для представленного объема.

К недостаткам диссертации можно отнести:

1. В расчётах используются итерационные методы, подбор коэффициентов методом перебора. Всё это времязатратные методы, однако, в диссертации не уделяется внимание скорости, с которой эти расчёты производятся. В силу того, что ЛИФ позиционируется как метод, позволяющий получать информацию в режиме реального времени, скорость обработки данных имеет принципиальное значение.
2. При анализе главных компонент автор пренебрегает реабсорбцией флуоресценции, однако, в некоторых случаях она даёт существенный вклад в спектр флуоресценции (раздел 6.5.4). Из текста неясно, как это отразится на предложенном методе анализа.
3. В некоторых местах представлены спектры, нормированные на чувствительность спектральных приборов, а в некоторых – первичные данные. Это не влияет на относительное сравнение спектров в пределах одной серии, но в общем затрудняет сравнение данных.
4. На стр. 60 указано, что в программе сбора данных калибровка опорного фотодиода осуществлялась с помощью «стороннего прибора», однако, тип и наименование этого прибора не указаны.

Указанные недостатки не снижают в целом высокую оценку представленных результатов. Диссертация Н.А. Маслова вносит существенный вклад в физику взаимодействия лазерного излучения с веществом, в ней заложены физические и технические основы лазерного метода изучения живой природы – УФ ЛИФ спектроскопии. Результаты диссертации могут быть использованы в организациях, где занимаются исследованиями, разработкой и применением лазеров в медицине: ФИАН РАН, МГУ, ИОФ РАН, ТГУ, СГУ и др.

Достоверность и значимость полученных результатов подтверждены 22 публикациями в отечественных и зарубежных рецензируемых журналах, главой в монографии, а также многочисленными публикациями в трудах отечественных и международных конференций. Практическая ценность работы подтверждается 5 патентами, 2 актами внедрения.

Диссертация представляет собой завершённую научно-исследовательскую работу на актуальную тему, обладающую научной и практической ценностью, в которой решена

задача применения УФ лазеров для аутофлуоресцентной медико-биологической диагностики. Автореферат диссертации полностью соответствует её содержанию.

Диссертационная работа отвечает критериям Положения о порядке присуждения ученых степеней утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, а её автор Маслов Н.А. заслуживает присуждения ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 01.04.21 – лазерная физика.

Основные положения диссертации Маслова Н.А. заслушаны на семинаре УНЦ «Квантовая оптика» Института автоматики и электрометрии СО РАН.

Главный научный сотрудник

лаборатории нелинейной спектроскопии газов,

доктор физико-математических наук

П.Л. Чаповский

Главный научный сотрудник

лаборатории фотоники,

доктор физико-математических наук

Д.А. Шапиро

Главный научный сотрудник

лаборатории информационной оптики,

доктор технических наук

О.И. Потатуркин