

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертации 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

Одной из важнейших научных задач современной медицины является разработка методов неинвазивной диагностики. Диссертация Н.А. Маслова посвящена исследованию лазерно-индуцированной флуоресценции (ЛИФ), возбуждаемой ультрафиолетовым (УФ) излучением, как инструмента для определения состояния биологических объектов. Данная тема представляет несомненный интерес, поскольку ЛИФ-измерения можно проводить в реальном времени, анализ живых тканей проводится *in vivo*, а УФ излучение возбуждает флуоресценцию большого числа биологических молекул.

Диссертация состоит из введения, семи глав, заключения и списка литературы. Диссертация имеет объем 327 страниц, содержит 224 иллюстрации и список из 275 литературных источников.

Во введении сформулированы все необходимые структурные элементы: актуальность темы исследования; цели и задачи; методы исследования; положения, выносимые на защиту; степень достоверности, научная новизна, научная и практическая ценность полученных результатов; обозначен личный вклад соискателя.

В первой главе приведён подробный обзор литературы по применению ЛИФ для диагностических целей. Метод основан на регистрации флуоресценции молекулярных биомаркеров, которые являются индикаторами нормальных или патологических биохимических процессов. Для данного метода существует два подхода – с использованием флуорофоров, привнесённых в организм извне, и естественных, изначально ему присущих. Оба подхода актуальны: первый обладает большей гибкостью; второй, который был выбран автором, может выполняться *in vivo* и при этом не требует дополнительного медикаментозного вмешательства. Флуоресценция большинства естественных биомаркеров возбуждается, в основном, УФ излучением, чем и обусловлен выбор метода исследования. Рассмотрены основные особенности флуоресценции биологических тканей, в том числе рассмотренные в кандидатской диссертации соискателя, приведены основные флуорофоры. В главе рассмотрено влияние оптической толщины образцов на измеряемые спектры, деструктивное влияние УФ излучения, примеры использования ЛИФ для медицинской диагностики. Делается вывод, что потенциал коротковолнового УФ излучения для ЛИФ-диагностики ещё не раскрыт в

должной мере, однако, в связи с развитием новых лазерных источников и электронных способов регистрации, позволяющих проводить измерения с использованием ультрамалых доз, нуждается в дальнейшем изучении.

Вторая глава посвящена описанию экспериментальных методов, используемых в работе. Автор использовал две спектральных измерительных установки, обе выполнены на современном уровне. В первой из них для регистрации спектров ЛИФ использовался спектрометр с усилителем яркости, работающим в УФ области, и ПЗС видеокамерой. Во второй – спектрометр с охлаждаемой ПЗС-камерой с обратным освещением электродов, также способной регистрировать УФ излучение. Оба спектрометра позволяют измерять спектры даже слабофлуоресцирующих объектов. Для возбуждения ЛИФ в первой установке использовался KrF эксимерный лазер, использование которого в клинике может и не является оптимальным, однако, полученные результаты могут быть адаптированы в случае использования другого источника с той же длиной волны. Во второй установке использовался Nd:YAG лазер с оптопараметрическим преобразованием частоты (ОРО) – одним из эффективных способов создания перестраиваемого когерентного излучения в спектральном диапазоне от УФ до ИК диапазонов. Способность ОРО обеспечивать непрерывную настройку длины волны в широком спектральном интервале позволяет измерять матрицы возбуждения-эмиссии и, таким образом, более полно изучать флуоресценцию образцов, состоящих из нескольких флуорофоров, излучающих в одной и той же области спектра. Последнее свойство УФ-возбуждаемой ЛИФ делает нетривиальным анализ спектров. Для их анализа автор использовал метод главных компонент (МГК), основная идея которого – преобразование в пространство меньшей размерности с новыми переменными - главными компонентами (ГК), которых достаточно для восстановления исходных спектров возможно, с незначительными ошибками. Специфической чертой МГК является то, что с его помощью могут быть выявлены скрытые особенности, типичные для исследуемого набора данных, что актуально при анализе сплошных спектров. Однако МГК в силу ортогональности ГК делает их знакопеременными, что не позволяет сопоставлять их со спектрами реальных флуорофоров. Для сведения ГК к спектрам предполагаемых флуорофоров автор использовал положительно-определённые линейные комбинации ГК, соответствующие пикам наименьшей возможной ширины. В серии модельных экспериментов с оптическими фантомами данный подход позволил с хорошей точностью воспроизвести спектры присутствующих в нём флуорофоров.

В третьей главе автором наработана база для последующего анализа спектров ЛИФ. Исследованы характерные матрицы возбуждения-эмиссии ряда известных

должной мере, однако, в связи с развитием новых лазерных источников и электронных способов регистрации, позволяющих проводить измерения с использованием ультрамалых доз, нуждается в дальнейшем изучении.

Вторая глава посвящена описанию экспериментальных методов, используемых в работе. Автор использовал две спектральных измерительных установки, обе выполнены на современном уровне. В первой из них для регистрации спектров ЛИФ использовался спектрометр с усилителем яркости, работающим в УФ области, и ПЗС видеокамерой. Во второй – спектрометр с охлаждаемой ПЗС-камерой с обратным освещением электродов, также способной регистрировать УФ излучение. Оба спектрометра позволяют измерять спектры даже слабофлуоресцирующих объектов. Для возбуждения ЛИФ в первой установке использовался KrF эксимерный лазер, использование которого в клинике может и не является оптимальным, однако, полученные результаты могут быть адаптированы в случае использования другого источника с той же длиной волны. Во второй установке использовался Nd:YAG лазер с оптопараметрическим преобразованием частоты (ОРО) – одним из эффективных способов создания перестраиваемого когерентного излучения в спектральном диапазоне от УФ до ИК диапазонов. Способность ОРО обеспечивать непрерывную настройку длины волны в широком спектральном интервале позволяет измерять матрицы возбуждения-эмиссии и, таким образом, более полно изучать флуоресценцию образцов, состоящих из нескольких флуорофоров, излучающих в одной и той же области спектра. Последнее свойство УФ-возбуждаемой ЛИФ делает нетривиальным анализ спектров. Для их анализа автор использовал метод главных компонент (МГК), основная идея которого – преобразование в пространство меньшей размерности с новыми переменными - главными компонентами (ГК), которых достаточно для восстановления исходных спектров возможно, с незначительными ошибками. Специфической чертой МГК является то, что с его помощью могут быть выявлены скрытые особенности, типичные для исследуемого набора данных, что актуально при анализе сплошных спектров. Однако МГК в силу ортогональности ГК делает их знакопеременными, что не позволяет сопоставлять их со спектрами реальных флуорофоров. Для сведения ГК к спектрам предполагаемых флуорофоров автор использовал положительно-определённые линейные комбинации ГК, соответствующие пикам наименьшей возможной ширины. В серии модельных экспериментов с оптическими фантомами данный подход позволил с хорошей точностью воспроизвести спектры присутствующих в нём флуорофоров.

В третьей главе автором наработана база для последующего анализа спектров ЛИФ. Исследованы характерные матрицы возбуждения-эмиссии ряда известных

флуорофоров, тканей лабораторных животных. Применение импульсного лазерного излучения обладает рядом технических преимуществ, однако, установлено, что оно должно использоваться с осторожностью – при спектральных измерениях плотность энергии импульса УФ лазерного излучения не должна превышать 200 мкДж/см^2 , иначе в биологических тканях наблюдается нелинейная зависимость интенсивности флуоресценции от мощности возбуждающего излучения, что делает некорректным получение спектров возбуждения. Предложена простая модель наблюдаемой нелинейности, основанная на поглощении излучения нефлуоресцирующими хромофорами, которая хорошо описывает экспериментальные данные. На примере тканей глаза человека показано, что использование УФ лазерного излучения позволяет по спектрам ЛИФ устанавливать тип биологических тканей, а измерение матриц возбуждения-эмиссии позволяет найти оптимальные параметры возбуждения.

Четвёртая глава посвящена ЛИФ минерализованных тканей. Используя наработки из кандидатской диссертации автором продемонстрирована возможность визуальной идентификации наличия кальцинированных участков клапанов сердца человека по изображениям флуоресценции в двух спектральных интервалах с использованием лазера с длиной волны 248 нм для возбуждения. В матрицах возбуждения-эмиссии спектра костной ткани обнаружены четыре компонента, которые могут давать существенно различный вклад, в зависимости от структуры ткани, однако, связи с наличием остеопороза автор не обнаружил. Здесь проявился недостаток гибкости используемого метода – если флуоресцирующие биомаркеры в ткани изначально отсутствуют, его нельзя использовать. При исследовании ЛИФ тканей зуба человека, с источником возбуждающего излучения с длиной 248 нм, автор показал, что в спектре здоровой ткани присутствуют три компонента, а при поражении кариесом из-за деградации белкового каркаса их число уменьшается.

В пятой главе представлены результаты исследования ЛИФ, возбуждаемой излучением эксимерного KrF лазера с длиной волны 248 нм, миокарда различной жизнеспособности. Изучена возможность применения ЛИФ для диагностики миокарда в различных его областях, а также представлены результаты модельных экспериментов с культурами клеток сердца. Оказалось, что культура клеток является плохой моделью целой ткани, т.к. по своим спектральным свойствам отличается от неё. Поверхностная диагностика не даёт достоверного результата из-за малой глубины проникновения лазерного излучения в ткань. Достоверная динамика спектров ЛИФ при снижении жизнеспособности наблюдается только на срезе миокарда, причём изменения происходят неоднородно, отражая неравномерность процессов деградации ткани.

Шестая глава посвящена ЛИФ, возбуждаемой эксимерным лазером с длиной волны 248 нм, применительно к определению состояния трансплантата аорты при различных биотехнологических процедурах: хранении, на этапах заморозки и размораживания, в процессе децеллюляризации. В процессе краткосрочного хранения при температуре +4°C возможная динамика спектров оказалась незарегистрированной на фоне их исходной неоднородности. Однако изменения, происходящие в ткани при криохранении (разрушение наполненных кровью капилляров), приводит к появлению полосы реабсорбции в гемоглобине. При правильной подготовке трансплантата – удалении лишней адвентиции, процесс замораживания и оттаивания на спектры не влияет. Для другой перспективной технологии, включающей удаление из трансплантата сосуда клеток донора, в процессе обработки образцов в спектрах ЛИФ происходит существенное уменьшение вклада одной из компонент.

В седьмой главе представлены результаты изучения матриц возбуждения-эмиссии опухолевых клеток и тканей. Для различных типов опухолей лабораторных мышей, а также для опухолей головного мозга человека обнаружено, что интервал длин волн лазерного излучения 240-250 нм является оптимальным для наблюдения спектральных изменений, при этом у всех типов образцов наблюдаются сходная динамика спектров при онкологическом поражении тканей. Также здесь представлены результаты применения известного диагностического метода, основанного на регистрации флуоресценции протопорфирина IX, для которого автор предложил использовать импульсно-периодический способ регистрации, позволяющий одновременно получать и изображение флуоресценции и операционного поля.

По тексту диссертации имеется несколько замечаний:

1. В формулах допущены опечатки, в частности вместо символа \hbar в нескольких местах встречается символ η .
2. В описании модельного эксперимента в разделе 2.2 не хватает деталей. Не объяснён выбор красителей. Не указаны использованные концентрации флуорофоров. Не ясно, использовались ли близкие концентрации или в смеси присутствовал превалирующий флуорофор, как на рис. 2.6.
3. На стр. 53 автор вскользь упоминает о недостатках предложенного метода разложения спектра на составляющие при анализе флуорофоров с полностью перекрывающимися спектрами. Здесь было бы уместным более детальное обсуждение, тем более что данный недостаток в полной мере проявляется на рис. 4.10 – провалы в спектре четвёртой компоненты соответствуют пикам прочих компонент.

Эти замечания, однако, не умаляют высокого уровня диссертации, выполненной на современном уровне и имеющей большое практическое значение. Автором предложен подход к УФ лазерной флуоресцентной диагностике и на многочисленных примерах показана его работоспособность. Материалы диссертации опубликованы в достаточном количестве отечественных и зарубежных рецензируемых журналов, неоднократно докладывались на международных конференциях, на найденные технические решения получены патенты. Автореферат диссертации полностью соответствует её содержанию.

Считаю, что диссертационная работа Н.А. Маслова «Лазерно-индуцированная флуоресценция биологических тканей при импульсном ультрафиолетовом возбуждении», представляет собой законченное научное исследование, обладающее научной и практической ценностью, а её автор заслуживает присуждения ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 01.04.21 – лазерная физика.

Зам. проректора по научной работе, проф., д.ф.-м.н.



Юрий Владимирович Кистенёв

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»,
Российская Федерация, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

