

Отзыв
официального оппонента
на диссертацию Маслова Николая Анатольевича
«Лазерно-индуцированная флуоресценция биологических тканей
при импульсном ультрафиолетовом возбуждении»,
представленную на соискание учёной степени
доктора физико-математических наук,
специальность 01.04.21 – лазерная физика

Тема диссертационной работы Н.А. Маслова – исследование биологических тканей животных и человека методом неразрушающей диагностики, основанной на лазерно-индуцированной флуоресценции (ЛИФ) – весьма **актуальна**. Ценность данной работы не только в поиске, разработке и приборном воплощении новых подходов в световой диагностике патологических процессов в биологических тканях, но и в том, что вновь обнаруженные особенности лазерно-индуцированной флуоресценции дают возможность применения в медицинских исследованиях и в лечении, в том числе оперативном, конкретных заболеваний. Речь идет об отложениях минеральных солей в сосудах и тканях сердца, о лечении твердых тканей зубов, об исследовании донорских протезов (миокард и трансплантат аорты), а также об исследовании границ злокачественных новообразований биологических тканей. Следует подчеркнуть, что все перечисленные выше заболевания определяют длительность активной жизни человека и качество его жизни. Отдельная глава диссертационной работы Н.А. Маслова посвящена вновь разработанным методам исследования злокачественных новообразований органов (лёгкие, селезёнка, головной мозг).

Текст диссертационной работы Н.А. Маслова состоит из введения, семи глав, заключения, списка литературы и включает 327 страниц текста, 224 иллюстрации и 275 наименований цитированной литературы.

Во **Введении** проанализирована актуальность исследований данной диссертационной работы, проводимой на стыке физики, химии, биологии и медицины. Перечислены физические методы диагностики, известные на сегодня. Проанализированы преимущества флуоресцентной техники в процессе микрохирургических операций, подчеркнута тенденция использования видимого и ближнего ИК диапазона в силу их глубокого проникновения в ткани и наименее поражающего действия. В то же время, отмечена необходимость освоения флуоресцентной методики с возбуждением ультрафиолетовым излучением. Эта область спектра возбуждения флуоресценции обещает более высокие интенсивности

флуоресцентного сигнала, а также вытекающую из этого перспективу применения метода в реальном времени во время операций. Во введении обозначена цель диссертационной работы – разработка методики анализа флуоресцирующего состава ЛИФ биологических тканей при лазерном возбуждении в диапазоне длин волн 210-350 нм. Перечислены также задачи в развитии методики и перспективы её применения в конкретных областях. В конце введения представлены кратко методики и оборудование, использованные в работе, а также перечислены защищаемые положения с оценкой их достоверности, новизны полученных результатов, их значимости для науки и практики. Указаны ссылки, доказывающие апробацию результатов, подчеркнута их внедрение в практику, проанализирован личный вклад автора диссертации.

Первая глава диссертации Н.А. Маслова представляет обзор литературы. Судя по ссылкам, перекрыт временной диапазон с 1989 по 2017 годы, включены также работы, опубликованные в 1960 и 1963 годах. В рамках этого обзора проанализированы возможности флуоресценции для идентификации биологической ткани по форме сложного спектра и даже для определения структуры, состава, состояния биологического материала, в том числе в динамике, при развитии патологии, которая сопровождается изменением спектра флуоресценции. Подчеркивается, что использование УФ излучения для возбуждения флуоресценции может быть выполнено без разрушения биологического материала, и, что важно, использование ультрафиолетового излучения позволяет возбуждать дополнительно множество различных флуоресцирующих центров (флуорофоров) и, соответственно, получать больше информации. Приведены немногочисленные известные примеры таких исследований, открывающих новые возможности для диагностики. Проведён анализ влияния оптических характеристик ткани на вид спектра ЛИФ за счёт процессов рассеяния и репоглощения. Проанализированы ЛИФ спектры тканей, биологических молекул (триптофан, тирозин, коллаген, другие белковые структуры) в различных тканях, клеток крови. Проведен также анализ возможных фотохимических превращений тканей под действием мощного УФ излучения. Сделан вывод, что облучение биологических тканей УФ излучением с длиной волны 248 нм, плотностью энергии излучения порядка 1 мДж/см^2 и с числом импульсов меньше 200 слабо влияет на спектры, и что дозы облучения меньше 200 мДж/см^2 могут использоваться для диагностических целей. Глава завершается краткими выводами, приводящими к постановке цели данного исследования.

Вторая глава представляет методы исследования, использованные в работе, а также перечисляет источники биоматериалов. В **подразделе 2.1** подробно описана установка с многоканальной регистрацией спектров флуоресценции, возбуждённых излучением эксимерного KrF лазера (248 нм). Установка позволяет регистрировать спектр флуоресценции, возбуждённой единичным импульсом лазерного излучения, что позволяет уменьшить влияние УФ излучения на ткань. Для увеличения чувствительности регистрации спектров флуоресценции использовано усиление сигнала в микроканальной пластине с последующей регистрацией ПЗС камерой сигнала от люминофора. Кроме того, применялось накопление и усреднение сигналов, вычитание фонового сигнала. В результате среднеквадратичное отклонение сигнала флуоресценции от среднего значения не превышало 1-2%. Подчёркивается, что в данной измерительной системе удалось существенно снизить плотность энергии облучения образца, до 1 мДж/см^2 , что на два порядка меньше критической величины 200 мДж/см^2 , вызывающей признаки деструктивных изменений в тканях под действием УФ излучения. Подраздел 2.2 второй главы излагает метод анализа ЛИФ спектров методом главных компонент. В **подразделе 2.3** второй главы представлена система визуализации ткани в отдельных спектральных участках ЛИФ. Установка более сложная, чем в подразделе 2.1, но в идейном плане проста и понятна. **Подраздел 2.4** описывает многоканальную систему регистрации спектров ЛИФ, в которой, благодаря использованию излучения параметрического генератора света (ПГС), имеется возможность сканирования длины волны возбуждающего флуоресценцию УФ излучения в спектральной области 220-350 нм. Установка создана с целью получения «портретов» биологической ткани в виде матриц возбуждения-эмиссии. Достоинством этой установки является возможность количественного сопоставления спектров флуоресценции, возбуждённых разными длинами волн лазерного УФ излучения. Здесь же явно указана возможность нормировки получаемых спектров на энергию возбуждающих импульсов в условиях линейной зависимости. В тексте на странице 63 отмечается, что программное обеспечение позволяет более точно контролировать параметры лазера, чем это предусмотрено программой, поставляемой вместе с оборудованием. Эта доработка программы заслуживает более подробного описания. В заключительном **подразделе 2.5** второй главы кратко перечислены достоинства разработанных установок и круг исследований, в которых установки использовались.

Третья глава – наиболее объёмная – ставит целью исследование спектральных особенностей матриц возбуждения-эмиссии ЛИФ различных органов, тканей и культур клеток. Для обоснования методики исследован ряд тестовых объектов, в том числе выполнен поиск и изучение нелинейной зависимости интегральной фотолюминесценции от энергии импульсов лазерного УФ излучения на разных длинах волн. **Подраздел 3.2.1** содержит исследование спектров ФЛ белой офисной бумаги, обычно используемой для простого способа визуализации УФ излучения. Были получены весьма интересные результаты. Не вызывают сомнения зарегистрированные нелинейные зависимости широкой части спектра ФЛ бумаги как функция энергии УФ импульса (Рис. 3.8), сам факт присутствия двух спектральных компонент и их различное поведение (выцветание узкого спектрального пика ФЛ). Похожие эффекты наблюдались и в исследовании линейности флуоресценции и фотовыцветания аминокислоты триптофана (**подраздел 3.2.2**) – наличие спектральных составляющих разной ширины, нелинейные зависимости амплитуд флуоресценции от дозы УФ облучения. Результаты исследования флуоресценции и фотовыцветания тканей крысы при импульсном лазерном возбуждении, изложенные в **подразделе 3.2.3**, производят благоприятное впечатление по качеству экспериментальных данных, их обработке, не вызывают сомнения результаты, касающиеся нелинейных зависимостей ФЛ тканей от параметров УФ излучения (энергия, доза). Интересные результаты получены в сравнительном исследовании флуоресценции бумаги и тканей крысы при возбуждении КгF эксимерным лазером, параметры которого (выше энергия импульсов и их длительность, шире спектр) отличаются от использованного ранее излучения ПГС. Результаты также отличаются от данных, полученных ранее. Общий вывод о необходимости контролировать линейность флуоресценции, ограничивая энергию лазерных УФ импульсов, возбуждающих ФЛ, представляется вполне разумным. Дальнейшее содержание главы 3 (**раздел 3.3**) посвящено фотохимическому воздействию УФ излучения на биологические ткани, в зависимости от дозы облучения, вплоть до их деградации. В **разделе 3.4** излагаются результаты по влиянию лазерного облучения в области длин волн 210-350 нм на опухоли тканей лабораторных животных. На Рис. 3.33 представлены спектральные зависимости количества погибших клеток (контролировалось по изменению окрашивания, различного для живых и погибших клеток) при разных энергетических дозах УФ облучения с явным максимумом для длины волны 250 нм. Дальнейшие исследования показали, что этот эффект может

быть обратимым и, возможно, связан с воздействием УФ излучения на проницаемость клеточных мембран и, соответственно, на степень окрашивания суспензии клеток. Пока не вполне ясно, чем именно выделена длина волны 250 нм. В заключительной части раздела 3.4 изложены результаты с проточными полимерными микрочипами, позволяющими наблюдать за поведением каждой клетки в отдельности. К сожалению, выбранный для микрочипов материал не позволил работать в наиболее интересной области УФ излучения (250 нм). Результаты, полученные для области 310 нм, совпали с результатами, полученными в суспензии. Полученные результаты, несомненно, послужат основой для дальнейших исследований – как с использованием других методов контроля жизнеспособности клеток, так и в исследовании поведения отдельных клеток при УФ облучении. При этом возможно применение микрочипов из прозрачного для УФ излучения материала, например, из кварцевого стекла марки КУ. **Раздел 3.5**, посвященный влиянию лазерного УФ излучения на органы животных *in vivo*, в частности, печени мышей, даёт представление о других методах контроля такого воздействия. Это изменение интенсивности ЛИФ в зависимости от дозы облучения, гистологические исследования, биохимический анализ сыворотки крови. Важный практический вывод этой части исследований заключается в том, что излучение с длиной волны 250 нм с интегральной плотностью энергии вплоть до 5 Дж/см² не вызывает заметных структурных изменений в печени. В **разделе 3.6** изложен богатый фактический материал, представляющий особенности матриц возбуждения-эмиссии флуоресценции биологических тканей. Подробно описана техника получения спектров ЛИФ для разных длин волн УФ лазерного возбуждающего излучения. Сами матрицы представлены в виде каскадных диаграмм возбуждения-эмиссии. По результатам сделаны выводы о наличии многих флуоресцирующих центров. Главный вывод заключается в том, что матрицы возбуждения-эмиссии лазерно-индуцированной флуоресценции различных биологических тканей зависят от их типа, структуры и могут быть использованы для их идентификации, а изменение длины волны лазерного излучения позволяет найти оптимальные параметры возбуждения. **Раздел 3.7** посвящён подробному исследованию матриц возбуждения-эмиссии ЛИФ тканей глаза человека. Эти исследования имеют большое практическое значение для предотвращения осложнений при хирургическом лечении катаракты или при замене хрусталика. Были получены каскадные диаграммы ЛИФ для тканей ядра, эпителия и капсулы хрусталика в спектральной области 300-700 нм

при УФ возбуждении в области 210-350 нм. Для каждого типа тканей были выделены наиболее информативные компоненты спектра ЛИФ, присутствующие для всех длин волн УФ возбуждения и сделана идентификация флуоресцирующего центра. Так, для материала ядра хрусталика это ЛИФ с пиками на 320 и 420 нм; эти пики идентифицированы как принадлежащие аминокислоте триптофана и, предположительно, эластину ткани хрусталика. Для других тканей глаза ЛИФ имеет другие характерные пики, принадлежащие другим флуорофорам (для тканей человеческого глаза их найдено четыре вида). На основании результатов сделан вывод о том, что эти различия спектров ЛИФ можно использовать для построения визуального неразрушающего контроля для каждого вида ткани глаза человека в реальном времени, во время операции. **Подраздел 3.8** суммирует основные результаты главы 3, имеющие наибольшее значение для применения методов флуоресценции, возбуждённой лазерным УФ излучением, в медико-биологической практике.

Четвертая глава излагает результаты исследования методом ЛИФ минерализованных биологических тканей. В прикладном смысле эта тема связана с проблемой отложения солей кальция в ключевых органах человека (сердце, почки, печень, кровеносные сосуды). В самом начале главы излагаются медицинские аспекты отложения солей кальция (кальциноза) – возможной причине осложнений после операций на сердце, в частности при замене клапанов. Отмечается, что в ранних исследованиях автора диссертации была обнаружена (считавшаяся ранее не вполне очевидной) флуоресценция гидроксилapatита $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ – основного минерала как солевых отложений кальция в организме, так и костных тканей. Необходимость визуализации гидроксилapatита существует не только в медицине органов и мягких тканей, но также в диагностике патологии костей (кариес зубов, остеопороз) и в хирургических операциях по замене суставов. В **разделе 4.2** перечислены основные результаты, полученные в рамках кандидатской диссертации Н.А.Маслова, которые представляют собой основания для исследований в рамках данной диссертационной работы. Эти результаты касаются исследования возбуждённой УФ лазерным излучением (248 нм) флуоресценции минерализованной ткани сердца человека; микро- и нано- кристаллов гидроксилapatита величиной от 50 до 500 нм, полученных из удалённых при операции клапанов сердца, поражённых кальцинозом; в качестве контрольного образца здорового сердца исследованы ткани сердца свиньи. В спектрах ЛИФ кальцинированных тканей обнаружены характерные

полосы в областях длин волн 300-350 нм и 400-600 нм, с максимумами на длинах волн 330 и 450 нм, а отношение интенсивностей флуоресценции в максимумах на 450 и 330 нм использовано в качестве характеристики спектров ЛИФ таких тканей. Для поражённых кальцинозом тканей это отношение равно 0,4-0,6, а для здоровой ткани – существенно ниже. В тексте диссертации на стр. 136 отмечается, что в доступной литературе нет упоминаний об исследовании спектров ЛИФ кальцинированных тканей. Приведён обзор работ по ЛИФ тканей, поражённых атеросклерозом, упомянуты результаты для УФ облучения выше порога абляции тканей, а также результаты по исследованию ЛИФ, возбуждённой более длинноволновым УФ излучением. Для объяснения своих результатов авторы предположили, что изменение спектра ЛИФ при патологических процессах в тканях может быть обусловлено не только относительным изменением концентрации биологических компонент (коллагена и эластина), но и появлением дополнительной, отсутствующей в здоровой ткани сердца, флуоресценции минерала гидроксилаптата. Для иллюстрации этого предположения была проведена качественная процедура – из спектра кристаллического кальциноза (Рис. 4.2) вычли спектр минеральной компоненты (Рис. 4.2) и получили спектр, соответствующий здоровой ткани. Такой результат впечатляет и, возможно, открывает новый взгляд на причину развития атеросклероза. **Раздел 4.3** излагает развитие методики ЛИФ минерализованных тканей в сторону визуализации поверхностного распределения минерализованных тканей сердечнососудистой системы. Изображения на Рис. 4.4 – 4.6 демонстрируют повышение контраста при использовании фильтра, пропускающего полосу флуоресценции минеральной компоненты. В то же время, изображение, полученное с использованием фильтров, пропускающих полосу излучения триптофана, позволяет рассмотреть саму ткань. Различия, зарегистрированные для этих двух видов изображения, открывают возможность визуализировать степень минерализации тканей сосудов и клапанов сердца при проведении хирургических манипуляций. **Раздел 4.4** посвящён исследованию матриц возбуждения-эмиссии ЛИФ костных тканей. В обзоре материалов и методов подчёркивается, что в настоящее время не существует стандартных методов количественной оценки степени поражения костных тканей остеопорозом – из 77 образцов губчатого вещества кости с этой патологией методом рентгеновской денситометрии, принятым в медицине, удалось уверенно различить лишь 14. Результаты исследования ЛИФ образцов здоровой и патологически изменённой костной ткани человека также не

принесли обнадеживающих результатов. Ни по каскадам спектров, соответствующих разным длинам возбуждения (Рис. 4.8), ни по математическим разложениям спектров на линейные компоненты (Рис. 4.12) не удалось обнаружить существенных различий для здоровой и поражённой остеопорозом костной ткани. Исследование минеральной составляющей ЛИФ также не выявило связи с патологией. Тем не менее, в ходе исследований установлено, что флуоресценция кости в диапазоне длин волн возбуждения 210-350 нм определяется наличием в ней триптофана, тирозина и коллагена, а вклад минеральной составляющей мал, возможно, из-за того, что минеральные компоненты заключены в белково-коллагеновой матрице, и возбуждающее лазерное излучение их не достигает. Не исключено, что полученные результаты могут быть со временем востребованы при решении задач судебно-медицинской экспертизы. **Раздел 4.5** посвящён ЛИФ спектроскопии твёрдых тканей зубов. В спектрах флуоресценции здоровых зубов и поражённых кариесом разной степени (Рис. 4.16 – 4.18) виден нарастающий провал в области 380-400 нм, указывающий на патологию. Рис. 4.20 представляет вклады трёх основных компонент в спектре ЛИФ, которые удалось идентифицировать как принадлежащие спектру белков, содержащих триптофан (максимум на 350 нм), флуорофорам коллагена и эластина (максимум на 400 нм), и минеральной составляющей (два пика, максимум на 420-500 нм). Если предлагаемые методы действительно позволяют определить зарождение кариеса на ранних стадиях, эта методика может стать ценным инструментом в стоматологии. Заключительный **раздел 4.6** суммирует результаты исследований, проведённых в рамках четвертой главы. Наиболее впечатляющие результаты получены при исследовании возбуждённой УФ излучением 248 нм флуоресценции тканей и сосудов сердца при наличии их минерализации. Исследования УФ ЛИФ костных тканей подчёркивают сложность проблемы и её актуальность. Некоторые результаты Главы 4 могут стать отправной точкой диагностических разработок в этой области.

Пятая глава посвящена исследованию методом УФ ЛИФ жизнеспособности тканей миокарда в зависимости от условий и длительности хранения органа. Тема исследований значима в связи с развитием медицинской трансплантации сердца и одной из важнейших задач является поиск признаков, позволяющих судить о пригодности органа либо ткане-инженерного трансплантата (графта) для успешной пересадки. В **подразделе 5.1** перечислены существующие в медицине физические и биохимические подходы для оценки состояния донорского органа. Все они

«инвазивны, трудоёмки, требуют значительных временных затрат и, как следствие, не могут быть методами, дающими оценку состояния органа в режиме реального времени». Отмечается отсутствие работ по оценке состояния донорских органов оптическими методами. Исключение составляет работа 1999 года, в которой была предложена флуоресцентная диагностика для определения степени отторжения уже пересаженного сердца. Упоминается также метод контроля флуоресценции никотинамид аденин динуклеотида (NADH) – кофермента, регулирующего окислительно-восстановительные реакции, то есть снабжение тканей кислородом. Поставлена задача Главы 5: исследование взаимодействия лазерного излучения с тканями сердца и создание на базе ЛИФ метода интегральной оценки физико-химических изменений, свидетельствующих о жизнеспособности тканей сердца. В **разделе 5.2** изложены полученные в кандидатской диссертации Н.А. Маслова результаты, служащие основанием для постановки исследований в рамках данной работы. Отмечается сложность ЛИФ спектров, состоящих из набора широких полос разных флуорофоров, что затрудняет интерпретацию. Для установления причин изменения спектров ЛИФ при хранении органа проводились гистохимические исследования срезов тканей, окрашенных специальными соединениями (флуоресцентные зонды). В частности, удалось проследить кинетику содержания в тканях ионов кальция Ca^{2+} , разрывов ДНК, NADH в процессе хранения. В результате комплексных исследований удалось связать спад интенсивности ЛИФ с процессами отмирания клеток миокарда и утверждать, что изменение интенсивности ЛИФ миокарда в полосе 450-470 нм может использоваться для оперативной (за доли секунды) диагностики состояния жизнеспособности тканей донорского сердца до, во время и после операции. В **разделе 5.3** излагаются результаты УФ ЛИФ спектроскопии клеточных культур различной жизнеспособности. В начале раздела дано подробное описание методов приготовления материалов и питательных сред, способов хранения и методов создания патологии вплоть до гибели клеток. Все измерения спектров ЛИФ проведены с применением многоканальной системы регистрации спектра с ЭОП и эксимерного KrF лазера с длиной волны 248 нм. При медленном снижении жизнеспособности клеток (хранение в физиологическом растворе) в спектрах ЛИФ кроме пиков на 330 нм возникала широкая полоса на 370-450 нм, не всегда воспроизводимая. Спектры ЛИФ клеток, выделенных из мертвой ткани, показали возникновение нового пика на 360 нм, более интенсивного, чем в жизнеспособных культурах, и всегда воспроизводимого. Сделан вывод, что

смещение пика, с 330 нм на 360 нм может говорить о катастрофических изменениях в состоянии ткани. В результате этих исследований сделан вывод о том, что культуры клеток не могут быть хорошей моделью для изучения качества донорских органов. В **разделе 5.4** метод УФ ЛИФ применяется уже к исследованию тканей донорского органа, причём препарат хранился на предметном стекле в условиях, близких к реальным условиям медицинской практики, а спектры ЛИФ нормировались на максимум. На Рис. 5.22, 5.25 и 5.31 видно нарастание максимума люминесценции в области 450 нм; найдены вклады в спектральной области 380 нм; обнаружены скачки вкладов спектральных компонент, соответствующие моментам восполнения физраствора. Поэтому в дальнейшем перешли к регистрации ЛИФ в отсутствие жидкости, с отмыванием ткани и последующей заливкой физраствором. В этих экспериментах выявлено отчётливое снижение интенсивности ЛИФ участков ткани при хранении, изменение формы спектра с нарастанием максимумов на 380 нм и 450 нм (Рис.5.52). Для различных образцов были различными как начальная интенсивность, так и скорость изменения спектра ЛИФ. В подразделе 5.4.4 исследовали спектры ЛИФ фрагментов сердца свиньи, выделенных из целого сердца после заданного периода хранения, и для всех фрагментов наблюдалось снижение интенсивности полосы 400-500 нм, при наличии исходной неоднородности спектров от разных участков. Сделан вывод о неравномерной деградации тканей сердца и о возможности использования полосы 400-500 нм ЛИФ спектра для выводов о жизнеспособности различных участков миокарда. В подразделе 5.4.5 приводятся флуоресцентные изображения срезов миокарда крысы после разных длительностей хранения целого сердца. В обсуждении (**подраздел 5.4.6**) подчеркивается неравномерность спада интенсивности ЛИФ по участкам тканей сердца при хранении в солевом растворе. Основной вклад в спектр вносит белок триптофан (пик на 330 нм); широкая полоса с максимумом на 450 нм частично принадлежит NADH и может использоваться для контроля трансплантата при операции; при этом отмечается вероятное присутствие другого флуорофора, уширяющего полосу. Отмечены трудности ЛИФ диагностики тканей сердца, отмечается необходимость измерений внутри сердечной мышцы, например, путём введения иглы со световым зондом. Этот основной вывод подчёркивается и в **разделе 5.5**, заключающем главу 5.

Шестая глава исследует возможность применения УФ ЛИФ спектроскопии биологических структур, используемых при пересадке аорты. В **разделе 6.1** подчёркивается актуальность проблемы: распространённость патологий сердца как

причины потери трудоспособности, необходимость получения быстрой и точной оценки состояния биопротезов после хранения в замороженном виде, предназначенных к пересадке. Перечисляются и кратко характеризуются методы исследования таких объектов (гистологические исследования, рентгеноскопия, в перспективе – ЛИФ). Приведён краткий обзор литературных данных по исследованию сосудов, спектральные особенности флуоресценции (пики – триптофан на 330 нм, коллаген более узкий пик и эластин более широкий пик на 380 нм, провал на 420 нм – перепоглощение оксигемоглобина). Перечислены лазеры УФ и видимого диапазонов спектра, отмечены слабые места имеющихся публикаций. Раздел завершается постановкой задачи: разработка метода быстрой и точной диагностики состояния клапансодержащего графта аорты на этапах заморозки и размораживания, а также децеллюляризации (удаления донорских клеток во избежание отторжения) с использованием методов, основанных на применении лазерного излучения. **Раздел 6.2** излагает результаты, полученные ранее, в рамках кандидатской диссертации автора. Были получены результаты по изменению УФ ЛИФ спектров внешней и внутренней оболочек аорты свиньи в процессе хранения (физраствор, 4°C): рост пика на длине волны 380 нм, изменения в длинноволновом крыле (450 нм) спектра. Отмечается, в связи с появлением новых подходов в медицине, необходимость контроля на разных технологических этапах ткани, созданной методами био-инженерии. **Раздел 6.3** нацелен на исследование динамики человека в процессе хранения в холодном физиологическом растворе. Подробно описана процедура взятия образцов, методов хранения и частота регистрации ЛИФ спектров. Несмотря на ряд общих для всех образцов картин изменения ЛИФ, была отмечена неоднородность спектров по месту взятия образца аорты на исследования (ЛИФ и затем гистологическое). В связи с этим, **раздел 6.4** посвящён исследованию однородности ЛИФ аорты человека. Сначала была проверена гипотеза влияния анизотропии ткани на разброс спектров ЛИФ; она не подтвердилась в экспериментах. Затем было показано, что ЛИФ спектры с максимумами на 330, 390 и 450 нм могут существенно отличаться, но не обнаружено чёткой зависимости от местоположения взятия образца аорты от расстояния от фиброзного кольца. Влияние атеросклероза также не выходит за рамки полученного разброса. В связи с этим сделан вывод о том, что на фоне такой пространственной неоднородности, которая была показана для аорты, возможные изменения спектра, связанные именно с хранением, скорее всего, не различимы. В **разделе 6.5** метод УФ ЛИФ

спектроскопии применён к разным этапам получения графта из более однородной ткани, чем у человека и свиньи – из тканей кролика. Действительно, как показывает Рис. 6.14 и даже Рис. 6.15, ткани кролика гораздо более однородны, чем ткани аорты человека или свиньи, разброс по расстоянию от фиброзного кольца практически отсутствует, а максимально наблюдавшийся разброс в свежих спектрах ЛИФ тканей кролика невелик. Дальнейшие исследования в этом материале показали, что зависимость спектров ЛИФ от длительности хранения удаётся наблюдать (Рис. 6.16). Было исследовано также влияние заморозки в разных растворах на спектры ЛИФ ткани аорты кролика после их восстановления (влияние криосохранения). Результат слабо зависит от вида раствора (см. Рис. 6.23) и свидетельствует о слабом влиянии криосохранения на спектры ЛИФ. В то же время ЛИФ спектры самих растворов отличаются значительно. **Раздел 6.6** исследует методом УФ ЛИФ процесс удаления донорских клеток из графта аорты (децеллюляризации). Рис. 6.26 чётко демонстрирует удаление пика на 450 нм после начала процесса. Делается вывод о том, что наблюдаемые изменения связаны с удалением при децеллюляризации межклеточного вещества, состоящего из белков, липопигментов, гликопротеинов и пр. Таким образом, по исчезновению данной спектральной полосы можно судить о степени завершенности процесса. Дальнейшие исследования децеллюляризации проведены на тканях аорты человека (**раздел 6.6**). Результаты процесса отслеживались по удалению флуоресцентных меток от ядродержащих клеток (гистологические снимки), по содержанию ионов кальция (гистохимия) и по спектрам ЛИФ (снижение интенсивности пика с центром 450 нм по сравнению с основным пиком на 330 нм). Основные выводы главы 6 перечислены в **разделе 6.7**. Установлено, что Спектры ЛИФ образцов, подготовленных с соблюдением технологии, в процессе криохранения не изменяются. Качество подготовки трансплантата (недостаточное удаление клеток крови донора) можно контролировать с помощью ЛИФ спектроскопии по наличию полосы перепоглощения флуоресценции в окси-гемоглобине. И, наконец, возможно контролировать процесс децеллюляризации по уменьшению интенсивности компоненты флуоресценции в области 400-500 нм, по сравнению с основным пиком на 330 нм.

Седьмая глава излагает результаты исследования методом УФ ЛИФ матриц возбуждения-эмиссии нормальных и опухолевых клеток и тканей. В **разделе 7.1** приведён обзор литературы, посвящённой поиску в спектрах флуоресценции, возбуждаемой лазерами видимого и ближнего УФ диапазона, признаков

онкологического поражения тканей человека. В некоторых работах демонстрируется отличие спектров здоровой и больной тканей, с минимальным анализом природы явления. Подчёркивается отсутствие систематического изучения возможностей УФ ЛИФ спектроскопии применительно к этим задачам. Для исследования ЛИФ здоровых и поражённых опухолями тканей лёгкого мыши (**раздел 7.2**) использована установка на базе ПГС с перестройкой длин волн лазерного излучения в диапазоне 210-355 нм. Полученные ЛИФ матрицы возбуждения-эмиссии представлены в виде каскадов спектры флуоресценции и имеют сложную форму. Для возбуждения УФ излучением с длиной волны 250 нм выделяются четыре характерные спектральные области: пик на длине волны 325 нм, обусловленный флуоресценцией триптофана; максимумы на длинах волн 440 и 520 нм, соответствующие вкладу флуорофоров соединительных тканей. В качестве результата, пригодного для диагностики заболевания, отмечается, что у опухолевых тканей (по сравнению с контрольными образцами) достоверно уширяется основной триптофановый пик, при этом спектры возбуждения не меняются. Наблюдаемый эффект может быть связан с изменением окружения триптофана, так и с появлением нового флуорофора, излучающего в диапазоне длин волн 350-370 нм. В **разделе 7.3** исследованы ЛИФ спектры суспензии здоровых клеток селезёнки мыши и клеток опухоли. По сравнению с предыдущим исследованием, в образце отсутствовала соединительная ткань, и соответственно, в спектре ЛИФ не проявлялись пики на длинах волн 430, 440 и 520 нм. Спектр ЛИФ, зарегистрированный для возбуждающего излучения с длиной волны 230 нм, состоял из пика на 325 нм и «плеча» в диапазоне 350-370 нм, причём у опухолевых клеток это «плечо» с максимумом на длине волны излучения 360 нм более интенсивное. Было также обнаружено различие в спектрах возбуждения в области 210-230 нм (для длины волны флуоресценции 325 нм) между спектрами карциномы и здоровых клеток селезёнки: эффективность возбуждения здоровых клеток оказалась в несколько раз выше, чем для клеток, поражённых опухолью. В качестве диагностического метода высокой точности (до 1%) предлагается использовать более простой подход: регистрировать интенсивность флуоресценции на длине волны 360 нм при возбуждении флуоресценции на длине волны излучения 230 нм. Рис. 7.10 убедителен в этом смысле – интенсивность флуоресценции нарастает с увеличением процентного содержания опухолевых клеток в суспензии. Раздел 7.4 посвящён исследованию ЛИФ тканей головного мозга человека, в том числе поражённых злокачественной опухолью – глиомой. В начале раздела указана

актуальность определения границ опухоли при оперативном лечении, и в соответствии с этим ставится задача исследовать возможности применения лазерных технологий для интраоперационной диагностики во время хирургического удаления злокачественной глиомы головного мозга с использованием лазерно-индуцированной флуоресценции клеток опухолей. В конце сделаны предположения о природе наблюдаемых изменений. В **подразделе 7.5** представлен комплекс аппаратуры, с помощью которого решена задача точного установления границ злокачественной опухоли мозга – на основе регистрации флуоресценции протопорфина IX, накопленного опухолью после фотосенсибилизации (введения пациенту 5-аминолевулиновой кислоты). В этом случае длина волны лазерного излучения 405 нм (ближний УФ диапазон) возбуждает флуоресценцию фотосенсибилизатора в области 630-640 нм. Изображение формируется компьютером циклически (на частоте 60 Гц, уже незаметной глазу), либо однократно. Сравнение изображений на фотографиях Рис. 7.21 и 7.22 отчётливо показывает преимущество разработанной методики по сравнению с фотографией той же опухоли при фоновом освещении. На основе прототипа аппаратного комплекса была разработана насадка для операционного микроскопа, проведено её испытание. В **пункте 7.6** кратко перечислены основные результаты седьмой главы.

В разделе диссертационной работы **Заключение** перечислены основные выводы, полученные в ходе исследований разнообразного биологического материала методом УФ ЛИФ спектроскопии. Текст завершается выражением благодарности коллегам и организациям, принимавшим участие в экспериментальных исследованиях.

Замечания, возникавшие по ходу чтения текста в начале диссертации, нашли ответы при прочтении последующих глав. Ответы на конкретные вопросы были получены оппонентом в ходе обсуждения с диссертантом.

Научная новизна и практическая значимость работы не вызывают сомнения. На базе исследований диссертации был создан аппаратный комплекс для интраоперационной диагностики границ злокачественной опухоли. Об использовании результатов данной работы в медицине имеются акты внедрения от руководства Новосибирского НИИТО им. Я.Л. Цивьяна, а также от представителей Европейского медицинского центра.

Диссертационная работа написана ясным, понятным языком. Сделанные замечания и некоторое количество опечаток не снижают общего положительного впечатления. Автореферат вполне отражает основное содержание диссертации.

Представленная диссертация соответствует требованиям ВАК Российской Федерации, и её автор, Николай Анатольевич Маслов, достоин присуждения учёной степени доктора физико-математических наук по специальности 01.04.21 – лазерная физика.

Отзыв составила:

Доктор физико-математических наук,
заведующая лабораторией
лазерной спектроскопии и лазерных технологий
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института физики полупроводников
им. А.В. Ржанова Сибирского отделения
Российской академии наук (ИФП СО РАН)

 – Н.Н. Рубцова

Почтовый адрес:

630090, проспект Академика Лаврентьева, 13, ИФП СО РАН,
тел. +7(383)333-27-69, электронный адрес: rubtsova@isp.nsc.ru

Подпись Н.Н. Рубцовой заверяю,
Учёный секретарь ИФП СО РАН,
к.ф.-м.н.





С.А. Аржанникова