

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора физико-математических наук Виктора Борисовича Лощенова на диссертацию Амионовой Любови Владимировны «Световодные системы для нейрофотоники», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.21 – лазерная физика.

Диссертация Амионовой Л.В. посвящена исследованию, разработке и экспериментальной реализации волоконно-оптических сенсорных систем и методов линейной и нелинейной оптической визуализации тканей мозга живых бодрствующих животных. Работа с живыми объектами, *in vivo*, накладывает особые требования к устройствам визуализации в отношении их гибкости, компактности, механической прочности и необходимости решать разнообразные функциональные задачи. В диссертационной работе проведено исследование световодных систем для биовизуализации и экспериментально показаны новые стратегии использования различных типов световодов в задачах оптической микроскопии, что открывает новые возможности для *in vivo* многофункциональной визуализации. Таким образом, тема диссертационной работы Л.В. Амионовой «Световодные системы для нейрофотоники» является несомненно актуальной и соответствует выбранной специальности 01.04.21 – лазерная физика.

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и списка литературы. Она изложена достаточно хорошим языком на 145 страницах машинописного текста, включая 49 рисунков. Список литературы насчитывает 156 наименований и соответствует содержанию. Автореферат объективно и полно отражает содержание диссертации.

Во Введении обосновывается актуальность диссертационной работы, сформулированы цель работы, ее научная новизна и практическая значимость, приведены положения, выносимые на защиту, подчеркивается личный вклад автора. Отмечается, что по материалам диссертации опубликованы 28 печатных работ.

Первая глава направлена на обзор литературы в рамках поставленной задачи. Достаточно подробно и критично рассмотрены современные методы исследования нейронной активности *in vivo*, описаны экспериментальные возможности оптической визуализации нейронной активности живых бодрствующих животных и показано, почему именно оптические волокна становятся ключевыми компонентами оптических биосенсоров. Описаны свойства и преимущества микроструктурированных световодов и возможности безмаркерной оптической визуализации.

Во второй главе приведено описание экспериментальной аппаратуры и методик измерений, использованных при проведении представленных в диссертационной работе исследований. Автором продемонстрировано глубокое понимание предмета исследования, как с физико-технической точки зрения, так и с биофизической.

Третья глава посвящена исследованию и оптимизации световодных систем для визуализации нейронной активности живых животных. Был произведен теоретический расчет различных свойств волоконно-оптического зондирования, проделаны эксперименты по определению локальности волоконного зондирования и показано, что теоретическая модель полностью совпадает с экспериментальными данными. На основе предложенной теоретической модели были даны рекомендации по выбору оптимального волоконного зонда для различных задач. Было экспериментально продемонстрировано, что подобранный волоконный зонд обеспечивает *in vivo* визуализацию одновременно нескольких биомаркеров в мозге живых животных с

высоким пространственным и временным разрешением. Также была экспериментально показана возможность оптимизации волоконной дисперсии и оптической нелинейности микроструктурированных световодов для формирования перестраиваемых по частоте сверхкоротких солитонных импульсов для реализации высокоэффективной двухфотонной флуоресценции, а также для формирования широкополосного излучения, необходимого для одновременного возбуждения различных маркерных красителей при визуализации нейронной активности головного мозга.

В заключительном разделе третьей главы описан разработанный и экспериментально реализованный автором волоконно-оптический интерфейс, позволяющий проводить измерения уровня флуоресценции глубоких слоев мозга живых животных при их свободном поведении во время и после обучения в течение длительного времени (несколько недель) одновременно из нескольких пространственно разнесенных структур мозга. Эти тончайшие эксперименты были выполнены технически и методически безупречно.

В четвертой главе диссертационной работы исследуются возможности безмаркерной оптической визуализации на базе методов комбинационного рассеяния света и генерации третьей оптической гармоники. В проведенных экспериментах было показано, что использование пучков оптоволокон позволяет в формате эндоскопа визуализировать с высоким пространственным разрешением структуры и распределение различных веществ по их комбинационно-активными линиям с пространственным разрешением 3 мкм. Было экспериментально показано, что оптические волокна в сочетании с подходящей математической процедурой выделения спектральных рамановских линий могут быть использованы для регистрации характерной симметричной моды колебаний растяжения CH_2 -связи в тканях мозга, а также алкиновой группы характерных маркеров пролиферации клеток EdU. В работе был экспериментально продемонстрирован эффективный метод увеличения чувствительности волоконно-оптического рамановского зондирования, использующий антирезонансные волокна с полый сердцевинной в качестве зондов.

В **Заключении** сформулированы 8 основных результатов, полученных в диссертационной работе.

В качестве **наиболее важных научных результатов** можно выделить следующие результаты:

1. Показано, что микроструктурированные (МС) волокна с малым размером сердцевинны увеличивают локальность оптического зондирования в волоконно-оптических форматах визуализации.
2. Экспериментально показано, что микросветоводные зондирующие системы, состоящие из пучков оптических волокон, интегрированных с гальваносканирующими зеркалами, обеспечивают одновременную визуализацию пространственного распределения нескольких флуоресцентных маркеров в мозге живого бодрствующего животного с субклеточным пространственным разрешением, а также позволяют строить изображения микрообъектов на основе регистрации комбинационного рассеяния света в режиме эндоскопии с высоким пространственным разрешением.
3. Экспериментально показано, что на основе созданной световодной платформы, состоящей из МС световодов для генерации широкополосного излучения и полых МС-световодов для спектральной фильтрации засветки, обеспечивается комплексная многочастотная оптическая регистрация активности нейронов головного мозга с использованием нелинейно-оптических взаимодействий и флуоресценции маркерных белков.

4. Разработан волоконно-оптический нейроинтерфейс, который, как было экспериментально показано, позволяет минимально инвазивно проводить измерения уровня экспрессии флуоресцентных маркерных белков в глубоких слоях мозга живых животных в течение длительного времени (до одного месяца) при их свободном поведении во время и после разнообразных воздействий, а также позволяет проводить измерения уровня флуоресценции одновременно из нескольких пространственно разнесенных структур мозга живого животного.

5. Экспериментально показано, что антирезонансные волокна с поллой сердцевиной позволяют увеличить до 17 раз чувствительность волоконно-оптической регистрации маркеров пролиферации клеток с помощью спонтанного комбинационного рассеяния по сравнению со стандартными световодами.

Обоснованность и достоверность основных результатов, выводов и защищаемых положений обеспечивается использованием современных методик проведения исследований и подтверждается согласием их между собой, а также с результатами независимых экспериментальных исследований. Полученные диссертантом новые результаты правильно отражают физическую реальность и не противоречат результатам, опубликованным в открытой печати другими исследователями. Достоверность результатов также подтверждается их обсуждением на 16 ведущих международных конференциях и симпозиумах.

Практическая ценность диссертации заключается в обосновании и экспериментальной демонстрации новых волоконно-оптических методов регистрации нейронной активности живых бодрствующих животных с использованием микроструктурированных световодов, пучков волокон, а также разработанных нейроинтерфейсов. Результаты, изложенные в диссертационной работе, могут быть использованы для создания новых подходов и методов многофункциональной волоконно-оптической визуализации живых объектов, что позволяет подойти к исследованию и решению фундаментальных задач биологии и нейрофизиологии.

В диссертации имеются следующие недостатки:

1. Стр. 55. Автор пишет: "Так как рассеяние не играет значительной роли в экспериментах, направленных на достижение максимальной локальности оптического зондирования, оно не было включено в модельные эксперименты." Это справедливо только в небольшом числе частных случаев. Необходимы более развернутые доказательства того, что автор имеет дело именно с таким случаем.

2. Стр. 56. Автор пишет: "Флуоресцентный отклик от молекул красителя собирался тем же волоконным зондом и регистрировался с помощью ФЭУ." Применение технологии, когда одно и то же волокно используется для передачи возбуждающего излучения и приема флуоресцентного сигнала требует более подробного описания возможной области применения с учетом паразитных световых шумов возникающих как в выходном торце волокна так и в дальней зоне исследуемого объекта.

3. Редко, но тем не менее встречаются стилистические огрехи и сленги. стр. 38, 39.

Отмеченные недостатки не снижают ценности выполненной работы и не подвергают сомнению достоверность защищаемых положений. Результаты диссертации могут быть использованы в отечественных и зарубежных центрах, занимающихся исследованиями живых объектов, волоконно-оптическим зондированием, а также методами оптической

микроскопии. Автореферат и публикации по теме диссертации полностью отражают ее содержание.

Диссертационная работа Л.В. Амионовой «Световодные системы для нейрофотоники» обладает теоретической и практической значимостью и удовлетворяет всем требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор, несомненно, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.21 – лазерная физика.

Официальный оппонент,
заведующий лабораторией Лазерной биоспектроскопии,
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института общей физики
им. А.М. Прохорова РАН,
д.ф.-м.н., профессор

В.Б. Лощенов

«21» мая 2013 г.

Подпись официального оппонента заверяю:
Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института общей физики им. А.М. Прохорова РАН,
к.ф.-м.н.



С.Н. Степанов