

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора физико-математических наук Васютинского Олега Святославовича на диссертационную работу Эфендиева Канамата Темботовича «Спектроскопическая интраоперационная диагностика в процессе лазерного облучения», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.19 – Лазерная физика

Диссертационная работа Эфендиева Канамата Темботовича посвящена актуальному направлению современной медицинской физики – исследованию и развитию методов контроля процессов лазерного воздействия на биологические ткани. Работа направлена на разработку спектроскопических методов и устройств контроля процесса воздействия лазерного излучения на сенсibilизированные биологические ткани, позволяющих оценить изменения в распределении фотосенсibilизатора и уровня насыщенности гемоглобина крови кислородом, а также состояние сосудистой системы тканей для оценки эффективности фотодинамического воздействия в режиме реального времени. В диссертационной работе Эфендиева показана возможность флуоресцентной навигации распределения протопорфирина IX и хлорина еб в тканях опухоли за счет регистрации длинноволнового плеча флуоресценции в ближнем инфракрасном диапазоне длин волн 725-800 нм с возбуждением флуоресценции фотосенсibilизатора в красноволновой Q-полосе поглощения. Разработанный спектроскопический метод комбинированного контроля фотодинамической терапии позволяет контролировать распределение фотосенсibilизатора, кинетику уменьшения интенсивности его флуоресценции, состояние сосудистой системы облучаемых тканей и уровня оксигенации гемоглобина, не прерывая лазерно-индуцированного фотодинамического воздействия (ФДВ). Разработаны метод и создано устройство, обеспечивающие локальную инфракрасную визуализацию кровеносных сосудов человека методом регистрации и анализа диффузно рассеянного лазерного излучения, которые позволяют оценить кровенаполненность тканей при проведении фотодинамической терапии (ФДТ). Разработан метод низкоинтенсивного

предварительного лазерного облучения, позволяющий увеличить эффективность ФДТ на основе фотосенсибилизатора Себ в тканях опухоли, а также сократить время экспозиции и/или уменьшить дозу вводимого в организм пациентов фотосенсибилизатора.

Тематика диссертационной работы является актуальной как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения. Широкое внедрение в клиническую практику разработанных методов позволит сократить время проведения процедуры фотодинамической терапии и персонализировать время светового воздействия на разные зоны гетерогенных тканей опухолей. Таким образом, возможность проведения фототераностики опухолей с применением фотосенсибилизатора протопорфирином IX и хлорином еб может увеличить преимущества фотодинамической терапии по сравнению с другими методами терапии.

Научная новизна диссертационной работы:

- Показано, что флуоресцентная навигация распределения фотосенсибилизатора в биологических тканях, содержащих хлорин еб или протопорфирин IX, возможна за счет регистрации их длинноволнового плеча флуоресценции в ближнем инфракрасном диапазоне с возбуждением флуоресценции в красном диапазоне длин волн. Данный подход включает применение одного источника лазерного излучения для флуоресцентной навигации и фотодинамической терапии опухолей пациентов.
- Разработан и реализован в клинической практике метод спектроскопического контроля фотодинамической терапии в процессе лазерного облучения с комбинированной оценкой изменения интенсивности флуоресценции фотосенсибилизатора в ближнем инфракрасном диапазоне, уровня оксигенации тканей и интенсивности рассеянного лазерного излучения, характеризующего оптические свойства биологических тканей.

- Разработано устройство, обеспечивающее визуализацию кровеносных сосудов и оценку кровенаполненности биологических тканей методом обратно рассеянного лазерного излучения. Установлены оптимальные длины волн для инфракрасном визуализации кровеносных сосудов.
- Разработан и реализован метод предварительного лазерного облучения, позволяющий увеличить эффективность ФДТ на основе фотосенсибилизатора Себ в тканях опухоли кожи, а также сократить время экспозиции и/или уменьшить дозу вводимого в организм пациентов фотосенсибилизатора.

Достоверность и надежность представленных в диссертационной работе результатов обеспечивается использованием современных комплексов научного оборудования и передовых экспериментальных методов, а также подтверждается апробацией работы в научных статьях и конференциях. Лабораторные и клинические исследования проводились с применением научного оборудования, которые соответствуют международным стандартам обеспечения единства измерений.

По теме диссертации опубликованы 24 работы в ведущих рецензируемых российских и зарубежных журналах, удовлетворяющих требованиям ВАК, а также докладывались на международных научных конференциях. На основе разработанных методов созданы объекты интеллектуальной собственности, защищенные 4-мя патентами РФ.

Диссертационная работа изложена на 158 страницах и содержит введение, пять глав, заключение и список цитируемой литературы, включающий 195 наименований публикации до 2023 года включительно. Работа хорошо структурирована и последовательно изложена, имеющийся иллюстративный материал достаточен для обоснования и понимания полученных результатов.

В первой главе, которая является обзором литературы, рассмотрены основы взаимодействия лазерного излучения с многослойными, многокомпонентными и оптически неоднородными биологическими тканями. Описаны процессы

распространения света в биологических тканях с высоким уровнем гетерогенности. Рассмотрены различные механизмы гибели клеток опухоли и фотовыцветания фотосенсибилизатора в процессе фотодинамического воздействия. Проведен обзор влияния фотодинамической терапии на сосудистую систему опухоли с применением различных типов фотосенсибилизаторов.

Во **второй главе** приведены материалы, методы и оборудование, применявшиеся для проведения исследований. Подробно описаны основные этапы подготовки экспериментального исследования фотодинамического воздействия лазерного излучения на модели биологических тканей и способы создания моделей биологических тканей. Описаны методы спектроскопической интраоперационной оценки накопления фотосенсибилизатора и определения уровня оксигенации гемоглобина, при этом особое внимание уделено методам флуоресцентной диагностики.

Третья глава посвящена исследованиям, направленным на разработку метода спектроскопической диагностики фотосенсибилизаторов протопорфирина IX и Себ в растворах, оптических фантомах и живых тканях для оценки эффективности фототераностики. Этот метод включает проведение спектрально-флуоресцентной диагностики в ближнем инфракрасном диапазоне и фотодинамической терапии с применением одного источника лазерного излучения в красном диапазоне спектра. Приведены результаты исследований на фантомных образцах, имитирующих оптические свойства биологических тканей, и результаты интраоперационного применения спектроскопических методов диагностики.

Четвертая глава посвящена исследованиям, направленным на разработку устройства для неинвазивной инфракрасной визуализации кровеносных сосудов. Разработан и апробирован эффективный подход к получению инфракрасных изображений на основе регистрации рассеянного назад лазерного излучения. Приведен метод определения оптимальных длин волн для инфракрасной

визуализации кровеносных сосудов и определен оптимальный диапазон длин волн в диапазоне 700-860 нм.

- В **пятой главе** представлены результаты исследований, направленных на разработку метода предварительного низкоинтенсивного лазерного облучения, позволяющего повысить эффективность ФДТ, а также сократить время экспозиции и/или уменьшить дозу вводимого в организм пациентов фотосенсибилизатора. На опухолях кожи 19 пациентов показано изменение распределения фотосенсибилизатора хлорин еб в процессе предварительного лазерного облучения. Показана клиническая эффективность предложенного метода.

В **заключении** диссертационной работы приведены основные результаты.

По тексту и содержанию работы имеются вопросы и замечания:

- На стр. 72, 108 и в других местах текста диссертации утверждается, что исследование интенсивности флуоресценции позволяет определить распределение фотосенсибилизатора в опухоли. Однако, при этом не принимается во-внимание, что детектируемая интенсивность флуоресценции определяется не только концентрацией фотосенсибилизатора, но и квантовым выходом флуоресценции, а также коэффициентом поглощения лазерного излучения фотосенсибилизатором, которые в свою очередь могут зависеть от параметров среды, в частности от кислотности (рН). Как показано в недавней работе Жихоревой с соавторами (Photochem. Photobiol. B: Biology, 2023, V.243, P.112699), квантовый выход флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин и коэффициент поглощения существенным образом (в разы) возрастают в диапазоне изменения рН от 4 до 8.
- В свете предыдущего замечания, наблюдавшееся автором увеличение интенсивности флуоресценции фотосенсибилизатора Себ непосредственно в области опухоли после предварительного низкоинтенсивного лазерного облучения, представленное на Рис. 5.10, 5.11 может быть интерпретировано не как следствие увеличения концентрации Себ в опухоли в результате

тромбоза сосудов, а как следствие изменения условий микроокружения фотосенсибилизатора (в частности, кислотности) в результате тромбоза.

- На стр. 57 отмечается, что описываемый метод спектрально-флуоресцентной навигации, разработанный на оптических фантомах, был чувствителен к различиям рассеивающих свойств среды на длине волны возбуждения и эмиссии при неизменной концентрации фотосенсибилизатора. Это утверждение на первый взгляд не согласуется с приведенным на стр. 59 утверждением, что «Полученные калибровочные графики могут быть использованы для количественной оценки концентрации РrIX или Себ в тканях опухоли.». Таким образом, остается неясным, как могла быть проведена количественная оценка концентрации в тканях опухолей, демонстрирующих большое разнообразие рассеивающих свойств среды.
- При объяснении причины увеличения интенсивности диффузно рассеянного лазерного излучения при тромбировании кровеносных сосудов на стр. 74 и на Рис. 3.20 автор утверждает, что эта интенсивность увеличивалась за счет увеличения плотности тканей. Однако, сам факт увеличения плотности тканей никак в тексте не обосновывается. Мне представляется, что предположение об увеличении плотности тканей не является необходимым, поскольку увеличение интенсивности рассеянного излучения может осуществляться просто за счет постепенного уменьшения поглощения лазерного излучения гемоглобином при уменьшении его поступления в область опухоли при тромбозе сосудов.
- На стр. 74 и 80 со ссылкой на работу [41] утверждается, что реакция переноса электрона между молекулой Себ в триплетном состоянии T1 и молекулами кислорода $3O_2$ является основным механизмом фотобликинга Себ. Эта ссылка не вполне корректна, поскольку указанный механизм приводит к одноэкспоненциальному фотовыцветанию, который и наблюдался в водном растворе фотосенсибилизатора Радахлорин в работе [41]. Однако, в данной

диссертационной работе при ФДВ наблюдалось двухэкспоненциальное фотовыцветание, что свидетельствует о наличии и других механизмов.

- На стр. 57 в выражении (3.3) введен индекс флуоресценции IF , который определялся как отношение интегральной интенсивности под спектральной кривой флуоресценции к интегральной интенсивности под спектральной кривой лазерного излучения, рассеянного обратно. Однако, из текста и из формулы (3.3) неясно, учитывалась ли при этом интенсивность флуоресценции от живых тканей в отсутствие фотосенсибилизатора и если да, то каким образом?
- На стр. 109 утверждается, что «коэффициент контрастности флуоресценции тканей опухоли и границы составлял 32–35 и 20–23». В то же время из определения коэффициента контрастности флуоресценции в уравнении (3.5) следует, что пределы изменения коэффициента контрастности флуоресценции от 0 до 2. Необходимо пояснение.
- Непонятно название Рис. 4.21: «Результаты спектроскопической оценки оксигенации и лазерно-индуцированной ФД опухоли кожи ...». Необходимо пояснить, как приведенные на этом рисунке интенсивность флуоресценции и коэффициент затухания позволяют оценить оксигенацию тканей.
- На Рис. 4.12, 4.16 и 4.20 не указаны размеры изображений.
- При описании Рис. 1.3 и 1.4. использована некорректная физическая терминология. В частности, термин «Тепловое излучение», обозначающий переход из возбужденного электронного состояния молекулы в основное, с испусканием теплового излучения неверен. Из пояснения к Рис. 1.4 становится ясно, что автор имеет в виду процессы внутренней конверсии с выделением тепла. Однако, в этих процессах происходят безызлучательные переходы из возбужденного состояния в основное, когда излишек энергии переходит не в излучение, а в кинетическую тепловую энергию продуктов реакции. Кроме того, на стр. 22. при описании Рис. 1.4 приведено не вполне

корректное утверждение, что при интеркомбинационной конверсии между синглетным состоянием S1 и триплетным состоянием T1 спины электронов параллельны.

- Объяснении термина «коэффициент флюоресцентной контрастности» на стр.41 запутано и малопонятно. В частности, говорится, что «среднее значение интенсивности пикселей изображения нормируется на параметры камеры». Неясно, что это значит и как осуществлялась процедура нормирования?
- Неконкретный и слишком общий термин «спектроскопическая диагностика» неоднократно приводится в тексте диссертации без объяснений, что запутывает изложение. Поскольку при этом речь всегда идет о наблюдении спектров флуоресценции, то лучше было бы использовать общеупотребимый термин «спектры флуоресценции».
- Приведенное на Рис. 3.9 отношение интегральной интенсивности флуоресценции фантомов к интегральной интенсивности сигнала от оптического фантома без фотосенсибилизатора неудачно названо соотношением сигнал / шум, хотя интенсивность сигнала без фотосенсибилизатора шумом не является. Также, в тексте не объяснены приведенные на Рис. 3.9 нелинейные зависимости сигнала интенсивности от концентрации фотосенсибилизатора.
- Постоянно употребляемый в тексте диссертации термин фотобличинг является научным жаргоном. В русскоязычной литературе по спектроскопии общепринятым является термин фотовыцветание.

Заключение

Приведенные замечания не снижают общей значимости и ценности выполненной диссертационной работы Эфендиева. Представленная работа является законченным научным трудом, который вносит существенный вклад в развитие

физических методов контроля процессов лазерного воздействия на сенсibilизированные биологические ткани. Разработанные методы и устройства позволяют интраоперационно и непосредственно в процессе лазерного облучения контролировать процесс фотодинамической терапии опухолей.

Таким образом, диссертационная работа Эфендиева Канамата Темботовича «Спектроскопическая интраоперационная диагностика в процессе лазерного облучения» соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842 (ред. от 18.03.2023) «О порядке присуждения ученых степеней», а ее автор заслуживает присвоения ему ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.19 – Лазерная физика.

Даю согласие на включение моих персональных данных в документы, связанные с работой Диссертационного совета 24.1.223.02 и их дальнейшую обработку.

Официальный оппонент:

Доктор физико-математических наук по специальности 01.04.08 – Физика и химия плазмы, заведующий лабораторией оптики биомолекул и кластеров Физико-технического института им. А.Ф. Иоффе РАН.



/ Васютинский Олег Святославович

Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе Российской академии наук

Почтовый адрес: 194021 Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д.26

Телефон: +7 (812) 297-22-45

E-mail: osv.pms@mail.ioffe.ru

Сайт организации: www.ioffe.ru

01.09.2023



Подпись Васютинского О.С. удостоверяю
зав.отделом кадров ФТИ им.А.Ф.Иоффе

УСР / Н.С. Бурденко