

## ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе  
Ширшина Евгения Александровича «Оптика эндогенных флуорофоров:  
фотофизические процессы и применение для биомедицинской диагностики»,  
представленной на соискание учёной степени доктора  
физико-математических наук по специальности 1.3.6. Оптика

Диссертационная работа представляет собой комплексное исследование оптических свойств эндогенных флуорофоров. Целью работы является исследование фотофизических процессов в эндогенных флуорофорах, а также создание новых методов диагностики и визуализации с использованием фотофизических параметров эндогенных флуорофоров клеток и биотканей человека. Несмотря на то, что оптика биомолекул, клеток и тканей является предметом многолетних исследований в литературе в качестве эндогенных хромофоров и флуорофоров в организме человека рассматривается список из всего лишь примерно десяти молекул. При этом для каждой «классической» молекулы-флуорофора или хромофора есть своя ниша применений в биомедицине. Выявление новых эндогенных молекул-флуорофоров в организме и исследование их фотофизических свойств является центральной задачей биомедицинской фотоники. При этом для ряда случаев природа эндогенной флуоресценции является дискуссионной. Методы диагностики конкретных биологических систем с помощью широкого класса методов оптической спектроскопии также не проработаны с достаточной степенью детализации. Например, применение метода многофотонной томографии (МФТ), позволяющего локализовать распределение эндогенных флуорофоров с субмикронным разрешением на глубинах до нескольких сотен микрон, представлено для анализа ограниченного числа объектов *in vivo*, что связано со сложностью решения обратной задачи и селективного выделения сигнала от определенных структур. Вышеуказанные фундаментальные проблемы определили основные направления исследований диссертационной работы.

Диссертация состоит из введения, восьми глав, заключения и списка использованных источников. Работа изложена на 344 страницах, включает в себя 131 рисунок и 8 таблиц. Общее количество использованных источников составляет 622.

Во **введении** обосновывается актуальность темы исследования, формулируются цели и задачи работы, определяется объект и предмет исследования, подтверждается научная новизна диссертационной работы и практическая значимость результатов, полученных результатов, представлены положения, выносимые на защиту, а также сведения об апробации диссертационной работы.

В **первой** главе представлен обзор состояния науки в области исследования эндогенных флуорофоров и хромофоров. Рассмотрены все «классические» флуорофоры: белки, ДНК, НАДН, флавины, продукты деградации гемоглобина, меланин и др., а также дискуссионные вопросы о природе флуоресценции в системах сложных органических соединений – о возникновении новых полос эмиссии у молекул при их химических модификациях, об источниках ИК флуоресценции, о влиянии межмолекулярного взаимодействия на оптические свойства эндогенных флуорофоров. В случае каждого флуорофора рассмотрены его физиологическая роль, спектральные свойства, механизмы релаксации возбужденного состояния и примеры использования его оптического отклика для диагностики. Обсуждены нерешенные проблемы из области оптической спектроскопии эндогенных флуорофоров.

**Вторая** глава посвящена оптическим свойствам белковых молекул в УФ области спектра, которые исследуются достаточно давно, хорошо описаны теоретически и имеют ряд практических применений. Одним из таких применений является определение константы комплексообразования в системе белок-лиганд на основе анализа данных тушения флуоресценции белка. В диссертационной работе экспериментально и с помощью численного моделирования показано, что используемый в литературе алгоритм для определения числа сайтов связывания в системе на основе модифицированного уравнения Штерна-Фольмера является некорректным. Предложен оригинальный способ для определения параметров взаимодействия в системе белок-лиганд. Вторым важным результатом, полученным в этой главе, является разработка метода селективного определения параметров тирозиновой флуоресценции в триптофан-содержащих белках. Поскольку флуоресценция триптофановых остатков доминирует в УФ-отклике белков, а тирозиновая флуоресценция обычно потушена, в литературе подавляющее большинство работ посвящено исследованию исключительно триптофановой флуоресценции. В диссертационной работе предложено, как можно выделить вклад тирозиновых остатков, в частности, в кинетику затухания флуоресценции белков, и доказано, что при ряде воздействий на белковую молекулу тирозиновая флуоресценция является более чувствительным индикатором структурных изменений, чем триптофановая.

**Третья** глава содержит исследование эндогенной флуоресценции белков и пептидов в сине-зеленой области спектра. Механизм возникновения данной полосы флуоресценции является дискуссионным, в связи с чем его установление являлось актуальной задачей биофотоники. В первой части главы показано, что применение флуоресцентных зондов для отслеживания взаимодействия белков может заметно влиять на его кинетику и морфологию образующихся структур. Так, показано, что использование флуоресцентного зонда тиофлавина Т, широко применяемого для исследования

амилоидных фибрилл, может приводить к увеличению жесткости гидрогеля, образующегося при самосборке коротких пептидов. Полученные в первой части третьей главы результаты убедительно свидетельствуют о том, что предпочтительным для анализа параметров межмолекулярного взаимодействия является именно использование эндогенной флуоресценции. Во второй части третьей главы на примере нескольких классов систем показана общность спектральных свойств эндогенной флуоресценции, возникающей в процессе межмолекулярного взаимодействия. С помощью метода масс-спектрометрии показано, что в ходе исследованных процессов могут образовываться химические модификации молекул, участвующих в процессе агрегации, в связи с чем сформулирована гипотеза о роли окислительно-индуцированных модификаций в появлении эндогенной флуоресценции в видимой области у систем взаимодействующих белков и пептидов. Данная гипотеза была далее верифицирована, доказана роль гетерогенных систем флуорофоров в формировании флуоресценции с широким спектром возбуждения у молекул и клеток.

В **четвертой** главе содержатся результаты исследования фотофизических процессов в гетерогенных системах флуорофоров (ГСФ). В качестве модельных систем рассмотрены смеси, образующиеся в результате окисления растворов молекул, содержащих ароматические фрагменты. Исследована кинетика релаксации флуоресценции ГСФ, впервые продемонстрировано, что у всех исследованных систем присутствует в затухании сверхбыстрая ( $<1$  пс) компонента, вклад которой уменьшается с длиной волны эмиссии, то есть, имеет место спектральная диффузия на масштабах времен  $\sim 10$  пс. Далее в работе представлена серия экспериментов по измерению кинетики анизотропии флуоресценции, в результате которых доказано, что сверхбыстрая компонента связана не с миграцией энергии возбуждения в ГСФ, а с процессом релаксации растворителя. Во второй части этой главы результаты, полученные методом «сверху вниз», расширены на ГСФ, а именно, на природное органическое вещество, для которого были показаны (1) корреляция параметров длинноволнового поглощения и спектральных параметров флуоресценции, (2) наличие сверхбыстрой компоненты в кинетике релаксации и ее спектральная диффузия, (3) взаимосвязь параметров сверхбыстрой компоненты и структурных свойств вещества, полученных методом ЯМР. Таким образом, в четвертой главе впервые показана общность фотофизических процессов в гетерогенных системах флуорофоров, а также выявлены механизмы формирования оптических свойств ГСФ.

В **пятой** главе представлены результаты комплексного исследования плазмы крови как примера биожидкости, путем анализа которой можно осуществлять диагностику патологических процессов в организме. Для анализа вариабельности эндогенной флуоресценции плазмы крови использовался открытый массив данных, представляющий

собой набор матриц возбуждения/эмиссии флуоресценции плазмы крови 289 пациентов с подозрением на колоректальный рак. Поскольку в полном спектре флуоресценции плазмы крови помимо полосы, связанной с УФ флуоресценцией белков, имеется полоса эмиссии в видимой области спектра, механизм формирования которой является дискуссионным, в работе были измерены оптические свойства всех фракций плазмы крови, отобранных при помощи хроматографии. Было показано, что белки плазмы крови помимо УФ флуоресценции обладают и эмиссией в видимой области спектра, при этом >70% от общей флуоресценции плазмы крови в видимом диапазоне приходится на молекулы альбумина, которые в результате процессов окисления и гликирования представляют собой ГСФ. Для демонстрации диагностической значимости параметров флуоресценции белков плазмы крови был построен классификатор, определяющий наличие злокачественной опухоли, чувствительность и специфичность составили >80%.

**Шестая** глава посвящена решению задачи визуализации и анализа структур в коже с использованием эндогенного контраста и метода двухфотонной томографии (ДФТ), совмещенной с визуализацией времени жизни флуоресценции (fluorescence lifetime imaging, FLIM). Рассмотрен вопрос о возможности визуализации микрососудов (капилляров) с помощью ДФТ и эндогенного контраста. Показано, что капилляры могут быть визуализированы по сигналу эндогенной флуоресценции с быстрым (<100 пс) затуханием флуоресценции. Исследован механизм формирования данного сигнала, показано, что он является следствием образования флуоресцентных фотопродуктов гемоглобина. С использованием разработанного подхода исследован вопрос о свойствах области в коже вокруг капилляров – периваскулярной зоны.

**Седьмая** глава посвящена созданию и верификации метода, основанного на ДФТ-FLIM с эндогенным контрастом, для визуализации и анализа структур в биологических тканях *in vivo*, которые другими методами в аналогичных условиях исследовать затруднительно или невозможно. Технически, одной из основных задач метода FLIM с эндогенным контрастом является поиск субпопуляций клеток с различным метаболическим статусом, который проявляется в значениях параметров флуоресцентного отклика НАДН. В диссертационной работе изучен вопрос о том, насколько сильно должны отличаться параметры затухания флуоресценции в субпопуляциях клеток, чтобы их можно было достоверно разделить, а также какие методы анализа данных FLIM являются наиболее чувствительными к наличию субпопуляций. Возможность классификации клеток с использованием ДФТ-FLIM была далее использована для анализа клеток в коже *in vivo* на примере макрофагов и тучных клеток.

В **восьмой** главе рассмотрены возможности диагностики меланина как гетерогенной системы флуорофоров. На основе конфокальной микроспектроскопии путем одновременного измерения спектров КР и ИК флуоресценции был предложен метод анализа распределения меланина в пространственно-неоднородной среде (в частности, в коже *in vivo*). Было показано, что спектрам КР с преобладающим вкладом линий меланина соответствует высокий флуоресцентный отклик, а сигнал ИК флуоресценции скоррелирован с долей меланина. Получено, что сигнал ИК флуоресценции не затухает в дерме, где меланина нет, а в ИК флуоресцентный отклик вносят вклад флуорофоры, локализованные на белках внеклеточного матрикса. Указанное наблюдение является свидетельством в пользу гипотезы о роли ГСФ в формировании флуоресцентного фона в живых системах при возбуждении в красной и ИК спектральных областях. Была разработана методика оценки абсолютных значений двухфотонного поглощения по кривым насыщения двухфотонной флуоресценции. В результате работ было установлено, что величина сечения двухфотонного поглощения исследованных систем варьируется в диапазоне 100–300 ГМ, тогда как сечение двухфотонного поглощения меланина составляло 300 ГМ, что говорит об отсутствии резонансного возбуждения флуоресценции меланина при используемых условиях возбуждения. Таким образом, повышенный на порядок (в сравнении с другими эндогенными флуорофорами кожи) сигнал флуоресценции меланина, наблюдаемый *in vivo* методом двухфотонной микроскопии, связан, прежде всего, с высокой локальной концентрацией флуорофоров в частицах меланина.

В **заключении** приводятся основные результаты диссертационной работы, список публикаций автора по материалам диссертации и список используемых литературных источников.

Автореферат полностью соответствует тексту диссертационной работы.

К основным результатам работы можно, в первую очередь, отнести следующие:

1. Предложен метод анализа фотофизических параметров флуоресценции тирозина в триптофан-содержащих белках и на примере альбумина, подвергнутого воздействию денатурирующих агентов, доказано, что флуоресценция тирозина может служить индикатором конформационных изменений, не проявляющихся в сигнале триптофана.
2. Продемонстрировано, что поведение спектральных свойств и параметров релаксации флуоресценции на масштабе времени от 100 фс до 10 нс для гетерогенных систем флуорофоров, полученных методом снизу вверх, путем окисления монокомпонентных растворов органических молекул, и сверху вниз, в

частности, природного органического вещества, определяется единообразием фотофизических механизмов в них – статистическим усреднением свойств входящих в их состав молекулярных флуорофоров.

3. Продемонстрировано, что эндогенная флуоресценция белков плазмы крови в диапазоне длин волн возбуждения 280-450 нм может быть использована для диагностики онкологических заболеваний, при этом флуоресценция при возбуждении >350 нм связана с наличием гетерогенных систем флуорофоров, образующихся за счет химических модификаций белковых макромолекул.
4. Показано, что в случае, если средние времена затухания флуоресценции эндогенных флуорофоров отличаются не менее, чем на ~200 пс, возможна селективная визуализация содержащих их структур в биотканях, в частности, иммунных клеток в коже человека *in vivo*.
5. Показана возможность восстановления распределения меланина на различной глубине в коже по отличительному отклику спектров его КР и ИК флуоресценции. С помощью микроскопии насыщения двухфотонной ЭФ показано отсутствие эффекта резонансного возбуждения меланина в ИК области. Предложен и экспериментально реализован метод микроскопии насыщения флуоресценции для картирования по образцу сечения двухфотонного поглощения в абсолютных единицах.

Диссертационная работа выполнена на высоком научном уровне, написана грамотным языком, хорошо структурирована. Результаты ее выполнения были апробированы на российских и международных конференциях. Результаты опубликованы в ведущих рецензируемых научных журналах.

Вместе с тем, при общей высокой оценке проделанной работы, имеется ряд замечаний:

1. В четвертой главе показано, что в молекулярной фракции (<1 кДа), выделенной из гетерогенных систем флуорофоров, полученных методом «снизу вверх», наблюдается сверхбыстрая компонента в кинетике релаксации флуоресценции. Наблюдается ли такая же компонента для молекулярной фракции, выделенной из природного органического вещества (т.е. гетерогенной системы флуорофоров, полученной методом сверху вниз)?
2. Каким образом можно однозначно разделить вклады НАДН и продуктов окисления белков во флуоресцентный сигнал, детектируемый от клеток?
3. В восьмой главе представлено исследование свойств комбинационного рассеяния (КР) меланина, показано, что в спектре КР доминируют две полосы

(1380 см<sup>-1</sup> и 1570 см<sup>-1</sup>). Также показана общность оптических свойств меланина с другими гетерогенными системами флуорофоров. В связи с этим возникает вопрос о том, обладают ли гетерогенные системы флуорофоров, исследованные в четвертой главе, аналогичными меланину спектрами КР?

Указанные замечания носят рекомендательный характер и не влияют на общее впечатление от диссертационной работы. Результаты, представленные в ней, имеют большую практическую значимость и ценность и вносят существенный вклад в область оптической спектроскопии макромолекул, биофотоники и биомедицинской оптики.

Считаю, что диссертационная работа «Оптика эндогенных флуорофоров: фотофизические процессы и применение для биомедицинской диагностики» полностью соответствует специальности 1.3.6. «Оптика» и требованиям «Положения о присуждении учёных степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова», предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор — Ширшин Евгений Александрович — заслуживает присуждения учёной степени доктора физико-математических наук по специальности 1.3.6. «Оптика».

Официальный оппонент:

доктор физико-математических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой оптики и биофотоники Института физики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Тучин Валерий Викторович

05.10.2023

Адрес места работы: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83

Телефон, e-mail: +7 (8452) 21-07-16, rector@sgu.ru

Подпись В.В. Тучина удостоверяю:

Проректор по научной работе и цифровому развитию

ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского»

д-р физ.-мат. Наук, профессор

А.А. Короновский