

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 Е.А. Ширшина посвящена экспериментальному исследованию механизмов формирования оптического отклика эндогенных флуорофоров и решению обратной задачи диагностики и визуализации компонентов живых систем с использованием этого отклика.

Методы оптической спектроскопии и микроскопии активно применяются в фундаментальных исследованиях живых систем, однако их использование в клинической практике ограничено в связи с двумя принципиальными проблемами. Во-первых, глубина оптического зондирования биотканей относительно мала и варьируется от десятых долей до нескольких единиц миллиметров, в исключительных случаях достигая нескольких сантиметров. Однако данный фактор не является лимитирующим при решении широкого круга задач: исследования межмолекулярных взаимодействий и структурной динамики молекул в растворах, анализа биожидкостей, интраоперационной диагностики, неинвазивной диагностики ряда физиологических параметров. Во-вторых, использование внешних (экзогенных) меток, часто применяемых в научных исследованиях для повышения чувствительности и специфичности оптических методов, затруднено при измерениях на людях *in vivo* и, более того, может влиять на исследуемый процесс – при том, что именно создание новых типов меток привело к прорыву в исследовании живых систем с помощью оптики. Таким образом, интерес представляет использование эндогенного контраста – оптического сигнала от молекул и систем молекул, уже присутствующих в образце (клетке, биожидкости, ткани). Актуальной задачей является фундаментальное исследование механизмов формирования оптического отклика эндогенных флуорофоров и решение обратной задачи диагностики и визуализации компонентов живых систем с использованием этого отклика.

В диссертационной работе предложен комплексный подход к исследованию фотофизических свойств эндогенных флуорофоров с использованием методов оптической спектроскопии и микроскопии на широком диапазоне времен от 100 фс до 100 нс. Основная часть работы посвящена исследованию механизмов формирования оптического отклика эндогенных флуорофоров в различных системах, в том числе, в гетерогенных системах флуорофоров, а также созданию методов диагностики и

визуализации эндогенных флуорофоров в клетках и биологических тканях, в том числе, *in vivo*.

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.

Первая глава содержит обзор современного состояния науки в области фотофизики эндогенных флуорофоров и использования их оптических свойств для биомедицинской диагностики. Рассмотрены фотофизические процессы во всех основных эндогенных хромофорах и флуорофорах в организме человека, механизмы формирования спектральных свойств, пути релаксации возбужденного состояния, влияние межмолекулярного взаимодействия и конформации флуорофоров на их оптические свойства. Обсуждены актуальные примеры использования диагностики или визуализации с использованием сигнала от эндогенных флуорофоров. Указаны и обсуждены нерешенные проблемы в области фотофизики и механизмов формирования флуоресценции эндогенных флуорофоров: формирование флуоресценции в ближней ИК области спектра, влияние межмолекулярного взаимодействия и фотохимических процессов на формирование новых флуорофоров, селективное детектирование и анализ объектов в биотканях по их эндогенной флуоресценции.

Во **второй главе** рассмотрены вопросы из области фотофизики белковых макромолекул, обладающих электронными переходами в УФ области спектра. Получено два основных результата, являющихся новыми. Во-первых, показано, что использование модифицированного уравнения Штерна-Фольмера для определения числа сайтов связывания в системе белок-лиганд на основе анализа эффективности тушения интенсивности флуоресценции является некорректным. Данный факт доказан как теоретически, так и экспериментально. Далее предложен альтернативный подход, позволяющий решить указанную задачу, основанный на одновременной аппроксимации нескольких кривых тушения флуоресценции. Предложенный подход верифицирован на нескольких классах систем. Вторым результатом является создание метода выделения сигнала флуоресценции тирозиновых остатков в триптофан-содержащих белках, в том числе, путем анализа спектральной зависимости кривых затухания флуоресценции в УФ области спектра. Показано, что время жизни флуоресценции тирозиновой флуоресценции

может в ряде случаев являться более чувствительным индикатором структурных изменений белковой молекулы, чем параметры флуоресценции триптофановых остатков (классический метод). Таким образом, в работе расширены возможности исследования межмолекулярного взаимодействия и конформационных изменений белков с использованием их эндогенной флуоресценции.

В третьей главе фокус исследований направлен на изучение влияния агрегации белков на их оптические свойства. В литературе имеется массив литературы, в котором приводятся противоречивые данные относительно появления новых полос флуоресценции в сине-зеленой области спектра, параметры которых можно использовать в качестве индикаторов процесса агрегации. В то же время природа указанного сигнала остается дискуссионной. В первой части главы показано, что использование экзогенных флуоресцентных меток может влиять на процесс взаимодействия белков и пептидов, приводя к радикальным изменениям кинетики взаимодействия и структурных свойств системы. Показана принципиальная значимость использования эндогенной флуоресценции для анализа взаимодействия белков. Дальнейшее исследование флуоресценции белков в сине-зеленой области спектра, возникающей в процессе агрегации, привело к гипотезе о роли процессов окисления в ее формировании. Данная гипотеза была подтверждена в работе на примере нескольких систем и далее расширена на живые клетки. В результате была доказана роль образования химических модификаций макромолекул, возникающих в живых системах в результате окислительных процессов. Исследованию фотофизических процессов в таких системах, получивших название гетерогенных систем флуорофоров, посвящена следующая глава.

Четвертая глава посвящена исследованию формирования оптических свойств гетерогенных систем флуорофоров на примере двух принципиально различных классов систем: систем, полученных методом «снизу вверх», то есть, путем воздействия на растворы какой-то одной молекулы, и «сверху вниз», то есть, уже сформированных гетерогенных систем. В обоих случаях показана общность механизмов формирования оптических свойств на широком диапазоне времен от 100 фс до 10 нс. Так, показано существование компоненты со сверхбыстрой релаксацией во всех исследованных системах, а также единообразие спектральной диффузии этой компоненты. Доказано, что оптические свойства гетерогенных систем флуорофоров можно объяснить в рамках суперпозиционной модели, при этом взаимодействие электронных состояний компонентов системы не является определяющим фактором.

В пятой главе продемонстрированы возможности биомедицинской диагностики с использованием сигнала гетерогенных систем флуорофоров на примере плазмы крови пациентов с онкологическими заболеваниями. Доказано, что за флуоресценцию плазмы

крови в видимой области спектра ответственны, в том числе, гетерогенные системы флуорофоров, возникающие в результате окисления белковых молекул. Показано, каким образом можно составить дескрипторы на основе анализа эндогенной флуоресценции белков, чтобы решить задачу классификации образцов онкологических пациентов.

Шестая глава посвящена развитию метода многофотонной томографии для диагностики различных структур в биотканях с использованием их оптического отклика. Во-первых, продемонстрирована возможность визуализации сосудов в биотканях с использованием сигнала двухфотонной флуоресценции. Далее показано, что за этот сигнал ответственным является образование фотопродуктов гемоглобина, которые образуются в результате двухфотонного поглощения. С использованием разработанной методики визуализации микрокапилляров объяснены механизмы, ответственные за изменение морфологии перикапиллярной зоны у пациентов с отеком синдромом – на основе данных многофотонной томографии *in vivo* показано, что в случае пациентов с сердечной недостаточностью имеет место увеличение межклеточного расстояния в верхнем слое кожи.

В **седьмой главе** продемонстрированы возможности метода визуализации времени жизни флуоресценции при его совмещении с многофотонной томографии в решении задач детектирования и визуализации объектов в биотканях на примере иммунных клеток. В первой части главы проведено всестороннее исследование возможности разделения объектов по параметрам релаксации их флуоресценции, показаны возможности и ограничения предложенного подхода. Далее разработанная методика применена *in vivo* для детектирования популяций иммунных клеток. Показано, что предложенные в работе алгоритмы анализа данных релаксации флуоресценции позволяют идентифицировать, разделять и анализировать состояния клеток в биотканях, в частности, иммунных клеток в коже человека, что нельзя на настоящий момент сделать с использованием каких-либо других неинвазивных методик.

Восьмая глава связана с исследованиями гетерогенных систем флуорофоров на примере меланина. Исследована гипотеза о возможности резонансного двухквантового возбуждения меланина, методом нелинейной флуориметрии показано, что сечение возбуждения двухфотонной флуоресценции составляет по порядку 100 ГМ. Предложена методика микроскопии насыщения двухфотонной флуоресценции, позволяющая картировать флуорофоры в образце с использованием их сечения поглощения, продемонстрированы возможности методики в анализе живых клеток.

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

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

1. Предложена модификация метода нелинейной флуориметрии насыщения с однофотонным возбуждением для определения фотофизических параметров флуорофоров с учетом процессов фотоионизации и фотодеградации.
2. Показано, что появление эндогенной флуоресценции и поглощения в видимой и ближней ИК области у биомолекул, в том числе в клетках, связано с образованием гетерогенных систем флуорофоров, появляющихся за счет химических модификаций.
3. Доказана и количественно охарактеризована роль эндогенной флуоресценции белков в формировании флуоресценции плазмы крови в видимой области спектра.
4. Предложена методика детектирования субпопуляций клеток в тканях путем анализа параметров релаксации флуоресценции эндогенных флуорофоров в них. С помощью разработанной методики впервые визуализированы иммунные клетки (макрофаги и тучные клетки) в коже человека *in vivo*.
5. Предложен новый метод микроскопии насыщения флуоресценции, позволяющий визуализировать сечение двухфотонного поглощения флуоресценции в живых клетках.

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.

Автореферат полностью соответствует тексту диссертационной работы.

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

1. В пятой главе показана роль гетерогенных систем флуорофоров в формировании оптических свойств плазмы крови, при этом исследования выполнены, в основном, с помощью методов стационарной флуориметрии. В то же время значительная часть работы, в частности, глава 4, посвящена исследованию таких систем с помощью время-разрешенной флуориметрии. В связи с этим встает вопрос о том, будут ли проявляться характерные для гетерогенных систем флуорофоров закономерности формирования кинетики затухания флуоресценции у образцов плазмы крови.
2. В работе показана общность формирования оптически свойств гетерогенных систем флуорофоров, при этом утверждается, что фотофизические механизмы являются общими для широкого класса систем, в том числе, углеродных наночастиц и оксида графена, однако, в работе не приводится анализ их оптических свойств.
3. В восьмой главе автором предлагается методика микроскопии насыщения

флуоресценции, позволяющая картировать по образцу сечение возбуждения флуорофоров. Такая возможность показана при двухфотонном возбуждении, но можно ли реализовать аналогичную методику при однофотонной накачке?

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, член-корреспондент РАН,
профессор кафедры общей физики и волновых процессов физического факультета
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Шкуринов Александр Павлович

15.09.2023

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 2

Телефон: +7 (495) 939-17-53; E-mail: ashkurinov@physics.msu.ru

Подпись Шкуринова Александра Павловича УДОСТОВЕРЯЮ:

Учёный секретарь учёного совета

физического факультета

МГУ имени М.В. Ломоносова

д.ф.-м.н., профессор

В.А. Караваев