

ОТЗЫВ

научного консультанта д.ф.-м.н., профессора Фадеева Виктора Владимировича на диссертационную работу Ширшина Евгения Александровича «Оптика эндогенных флуорофоров: фотофизические процессы и применение для биомедицинской диагностики», представленную на соискание учёной степени доктора физико-математических наук по специальности 1.3.6. Оптика.

Диссертационная работа Е.А. Ширшина посвящена актуальной теме исследования фотофизических свойств эндогенных флуорофоров и создания новых методов диагностики и визуализации структур в организме человека с использованием эндогенного оптического контраста. Актуальность работы определяется развитием биофотоники и ростом её роли в биомедицинской диагностике. В последнее десятилетие ряд методов оптической спектроскопии нашел клинические применения. При этом всё больший интерес представляет использование эндогенных меток-флуорофоров как альтернативы экзогенным меткам, использование которых в организме человека связана со значительными трудностями. Это мотивирует исследования фотофизических процессов в эндогенных флуорофорах с целью создания моделей формирования оптического отклика живых систем и разработки новых методов диагностики, основанных на измерении фотофизических параметров, в частности, параметров релаксации возбужденного состояния. Ключевыми задачами в этой области являются также: установление физических механизмов, ответственных за флуоресценцию эндогенных флуорофоров в ближней ИК области спектра; исследование фотофизических процессов в гетерогенных системах флуорофоров (ГСФ); разработка методов селективного выделения вкладов отдельных эндогенных флуорофоров из общего флуоресцентного отклика сложных биологических систем.

Работа выполнена на кафедре квантовой электроники Физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Научную работу на физическом факультете МГУ Е.А. Ширшин начал в 2006 году, при этом объектом исследований стали флуоресцентные белки, применительно к которым был развит метод нелинейной лазерной флуориметрии (НЛФ) для определения скорости внутримолекулярного переноса энергии внутри локализованных донорно-акцепторных пар. Дипломная работа Е.А. Ширшина на эту тему была удостоена премии Р.В. Хохлова за лучшую дипломную работу, а результаты были опубликованы в журналах *Applied Optics* и *Письма в ЖЭТФ*. Исследования, выполнявшиеся Е.А. Ширшиным в аспирантуре, были посвящены развитию методов лазерной спектроскопии применительно как к белковым макромолекулам, так и к другим классам соединений, в частности, комплексам урана(VI), для которых были исследованы механизмы усиления люминесценции при комплексообразовании с лигандами-анионами и развит метод определения концентраций физико-химических форм урана(VI) в их смеси с помощью нелинейной и кинетической флуориметрии. В 2011 году Е.А. Ширшиным была защищена кандидатская диссертация на тему «Влияние межмолекулярного взаимодействия на фотофизические характеристики комплексов пирена с гуминовыми веществами и уранила с лигандами-анионами в воде» по специальности 01.04.21 — «Лазерная физика».

Дальнейшим направлением научной деятельности Ширшина Е.А., уже в качестве сотруд-

ника кафедры квантовой электроники, стало создание научных основ определения фотофизических параметров сложных органических соединений и разработка новых методов оптической диагностики сложных систем. При этом акцент исследований делался на трансляцию методов биофотоники в клинику, в частности: метода детектирования границы опухоли при раке мочевого пузыря *in vivo* (по заказу компании НПО «ИРЭ-Полюс»); методики оценки тяжести отека при сердечной недостаточности и система для неинвазивного скрининга населения – определения гемоглобина методом SFDI; система для анализа биожидкостей.

Постановка научных задач докторской диссертации Ширшина Е.А. определялась тем фактом, что, в литературе в качестве эндогенных молекул, ответственных за поглощение (хромофоры) и флуоресценцию (флуорофоры) в организме человека, рассматривается список из всего лишь примерно десяти молекул (несмотря на то, что оптика биотканей и клеток исследуется активно). При этом для каждой «классической» молекулы-флуорофора или хромофора есть своя ниша применений в биомедицине. Очевидные примеры таких применений – использование сигнала от гемоглобина в носимых устройствах (фитнес-трекеры, пульс-оксиметры, оптическое измерение артериального давления) в диагностике онкологических заболеваний, нейроимиджинге. Аналогично, на регистрации сигнала флуоресценции молекулы НАД(Ф)Н построен оптический метаболический имиджинг, используемый в персонализированной онкологии для подбора химиотерапии. Выявление новых классов эндогенных молекул-флуорофоров в организме и исследование их фотофизических свойств является центральной задачей биомедицинской фотоники. Второй задачей диссертационной работы являлось создание новых методов спектроскопии и микроскопии, позволяющих реализовывать молекулярный имиджинг, то есть, детектировать сигнал от определенных молекул в клетках.

Как было указано выше, первыми объектами исследований Е.А. Ширшина являлись белковые макромолекулы (флуоресцентные белки, альбумины). Результаты этих исследований сформировали стартовую позицию для развития биомедицинской фотоники, классических и лазерных методов биомедицинской диагностики, в частности, биожидкостей – так, первой работой в этом направлении (2015 г.) было выявление дескрипторов диабета в флуоресценции плазмы крови. Далее стало понятно, что традиционных подходов недостаточно для анализа сложных систем и смесей (той же крови), требуется расширение фронта фундаментальных исследований. Был выполнен поиск оптических флуоресцентных индикаторов конформационных изменений белков. Был предложен новый способ, основанный на выделении сигнала от тирозиновых остатков в белках, что позволило диагностировать изменения структуры белков в сложных системах с большей чувствительностью, чем подход, основанный на триптофановой флуоресценции. Впоследствии (в 2019 году) данные наработки были применены для создания метода анализа пептид-белковых взаимодействий. Также в результате работ 2015-2016 годов, выполненных по заказу компании LG Electronics, был предложен метод анализа белковой компоненты в бытовой пыли с целью создания датчика экспресс-оценки аллергологической опасности в помещении. Было обращено внимание на «неклассическую» синюю флуоресценцию белков, относительно природы которой в литературе имеется несколько гипотез. Такая флуоресценция наблюдается, например, у структурных белков кожи (кератина, коллагена и эластина), а также возникает при агрегации белков в амилоидные фибриллы, которые связаны с патогенезом нейродегенеративных заболеваний. В процессе исследования природы этой флуоресценции были получены принципиально новые сведения о флуоресценции биотканей.

Фотофизика синей флуоресценции, возникающей в результате образования амилоидных фибрилл, была исследована в серии работ Ширшина Е.А., где впервые была высказана гипотеза об образовании гетерогенной системы хромофоров в результате окислительных процессов. Методика детектирования фибриллярных структур в клетках с использованием сигнала синей флуоресценции была опубликована в журнале *Angewandte Chemie*. Дальнейшие исследования были направлены на выявление механизмов, приводящих к единообразию оптических свойств гетерогенных систем флуорофоров. Известно, что системы природного органического вещества имеют поразительно похожие спектральные характеристики несмотря на радикально отличающийся молекулярный состав. Е.А. Ширшиным было показано, что аналогичные оптические свойства наблюдаются и в живых системах, в частности, в клетках при окислительном стрессе и тканях. На исследование фотофизических механизмов, ответственных за единообразие оптических свойств гетерогенных систем флуорофоров, в 2018 году был получен грант международного сообщества *International Humic Substances Society*. Была проведена серия работ, позволившая установить взаимосвязь молекулярного состава гетерогенных систем флуорофоров и их оптических свойств. Центральной стала статья 2021 года, в которой был открыт эффект сверхбыстрого переноса энергии в гетерогенных системах флуорофоров, который эффективно «перемешивает» оптические свойства десятков тысяч разных молекул, входящих в состав системы, и проводит к единообразию их спектральных свойств. Показано, что один и тот же эффект определяет оптику и природного органического вещества, и биофлуорофоров – меланина, окисленных белков, ДНК и липидов. Принципиально важным является факт наличия у гетерогенных систем флуорофоров хвоста поглощения в красной и инфракрасной (ИК) спектральных областях, что отвечает на вопрос о механизме ИК флуоресценции в тканях.

Часть работ, легших в основу докторской диссертации Е.А. Ширшина, сфокусирована на методе многофотонной томографии (МФТ), который позволяет проводить 3D анализ ткани *in vivo* с субклеточным пространственным разрешением. Было показано, как с помощью МФТ проводить диагностику микрососудов и локализовать структурные белки разного типа в ткани, а также описан механизм формирования флуоресценции крови под действием двухфотонного возбуждения. Далее метод МФТ был использован для анализа отечного синдрома на уровне клеток, что легло в основу метода диагностики пациентов с сердечной недостаточностью. Также впервые с помощью МФТ было показано, как можно детектировать и анализировать состояние единичных иммунных клеток у пациентов *in vivo*. Метод МФТ совместно с методом микроспектроскопии комбинационного рассеяния был также использован для исследования природы ИК флуоресценции тканей и локализации в них различных молекулярных компонент.

Приведенная выше информация о том, как развивались исследования по теме диссертации Е.А. Ширшина, иллюстрирует продуктивность развитых в ней подходов, в которых органично сочетаются фундаментальные и прикладные аспекты. И это отражает высокий уровень квалификации диссертанта, который одинаково свободно владеет как методами теоретической физики, так и современной экспериментальной техникой.

Результаты, полученные Е.А. Ширшиным при выполнении диссертационной работы, составили основу 34 публикаций, в том числе, в изданиях *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, *Advanced Materials*, *Angewandte Chemie*, *Nature Communications*, *eLife*, были многократно представлены на российских и международных конференциях, в том числе, в рамках пленарных и приглашенных докладов.

За время работы над диссертацией Е.А. Ширшин проявил себя высококвалифицированным, мотивированным, инициативным и целеустремленным исследователем, способным творчески решать сложные научно-технические задачи, преодолевать трудности, многократно повторять эксперименты, добиваясь получения достоверных результатов, последовательно и творчески их анализировать. Эти качества определили высокий уровень научно-педагогической деятельности Е.А. Ширшина в качестве сотрудника кафедры квантовой электроники, стать преемником автора этого отзыва на позиции руководителя лаборатории лазерной биофотоники. Не могу не отметить и такие привлекательные качества Ширшина Е.А. как оптимизм, доброжелательность, целеустремленность, ответственность, коммуникабельность и способность работать в команде. Эти качества делают работу с Евгением Александровичем комфортной и продуктивной.

Считаю, что диссертационная работа «Оптика эндогенных флуорофоров: фотофизические процессы и применение для биомедицинской диагностики» Ширшина Евгения Александровича соответствует паспорту специальности 1.3.6. «Оптика» (отрасль — физико-математические науки) по направлению исследований 7. «Излучение, поглощение и рассеяние света изолированными и взаимодействующими атомами, молекулами и ионами. Физические основы процессов люминесценции и спектроскопических методов исследования веществ. Поляризационные явления» и требованиям «Положения о присуждении учёных степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова», предъявляемым к докторским диссертациям.

Рекомендую диссертационную работу «Оптика эндогенных флуорофоров: фотофизические процессы и применение для биомедицинской диагностики» Ширшина Евгения Александровича к защите на соискание учёной степени доктора физико-математических наук по специальности 1.3.6. Оптика.

Научный консультант:

профессор кафедры квантовой электроники физического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
доктор физико-математических наук, профессор,
Заслуженный профессор Московского университета,
лауреат Государственной премии СССР

В.В. Фадеев

Дата составления отзыва: 11 ноября 2022 года.

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

Телефон: +7 (495) 939-16-53, E-mail: chair@shg.phys.msu.ru

Подпись Фадеева Виктора Владимировича УДОСТОВЕРЯЮ:

Учёный секретарь Учёного совета

физического факультета

МГУ имени М.В. Ломоносова,

доктор физико-математических наук, профессор

В.А. Караваев