

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Якимова Бориса Павловича «Лазерная флуоресцентная спектроскопия эндогенных гетерогенных систем флуорофоров в коже и её применение для биомедицинской диагностики», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.21 – лазерная физика

Актуальность работы

Применение лазерных методов диагностики, в частности, лазерной флуоресцентной спектроскопии и микроскопии для мониторинга состояния единичных клеток и биотканей является актуальной задачей биомедицины. Особенный интерес при этом представляет использование эндогенного флуоресцентного контраста, то есть получение флуоресцентного отклика от тех маркеров, которые исходно присутствуют в организме человека.

В организме человека можно выделить флуорофоры, структура которых известна, а фотофизические характеристики укладываются в рамки стандартных представлений о свойствах единичных молекул. Максимум эмиссии флуоресценции таких флуорофоров не зависит (или слабо зависит) от длины волны возбуждающего излучения, в их спектре поглощения можно выделить характерную полосу с максимумом, связанным с переходом из основного в возбужденное состояние. Характерные для таких флуорофоров ширины полос поглощения и эмиссии составляют 50–100 нм, а величина Стоксова сдвига флуоресценции – 50–100 нм ($\sim 3000\text{--}6000\text{ см}^{-1}$). К эндогенным флуорофорам указанного типа можно отнести ароматические аминокислотные остатки белковых макромолекул, восстановленный никотинамиддинуклеотид (НАДН) и флавины, витамин А (ретинол), билирубин, протопорфирин-IX.

Указанным системам присущи следующие свойства. Во-первых, они обладают гетерогенным молекулярным составом. Так, меланин состоит из большого числа молекул с различным химическим строением. Предполагается, что флуоресценция агрегатов и мономеров некоторых белковых макромолекул в видимом диапазоне спектра может быть связана с возникновением в их структуре продуктов окисления аминокислотных остатков. Во-вторых, указанные системы обычно существуют в форме молекулярных агрегатов, в которых субъединицы находятся на расстоянии менее 1 нм, из-за чего электронное взаимодействие между отдельными молекулами флуорофорами в агрегате может существенно влиять на наблюдаемые оптические свойства (гетерогенные системами флуорофоров (ГСФ)).

Оптические свойства ГСФ, в частности, возможность возбуждения их флуоресцентного отклика в окне прозрачности биотканей (600–900 нм), могут быть использованы для решения задач биомедицинской диагностики. Так, показано, что с помощью флуоресцентного отклика в ближнем инфракрасном (ИК) диапазоне возможна оценка содержания меланина в коже *in vivo*, в том числе для диагностики новообразований кожи.

В большинстве случаев при решении задач биомедицинской диагностики флуоресцентный отклик ГСФ используется исключительно феноменологически, а механизмы его формирования не являются установленными. Исследование механизмов формирования оптических свойств ГСФ представляет не только фундаментальный, но и прикладной интерес, поскольку понимание фотофизических процессов в них может

позволить увеличить чувствительность и селективность детектирования ГСФ, а также анализировать их структурные свойства, в том числе и для *in vivo* диагностики новообразований кожи.

Научная новизна

Методами лазерной спектроскопии и микроскопии впервые показана общность фотофизических свойств – спектральных характеристик, параметров кинетики релаксации возбуждения и их зависимости от размера супрамолекулярных агрегатов в системе – для широкого круга гетерогенных систем флуорофоров, присутствующих в коже: меланина, водных растворов продуктов фотоокисления триптофана, продуктов гликирования белковых макромолекул. Полученные данные можно использовать в прикладных диагностических задачах, например, в диагностике новообразований и патологий сердечно-сосудистой системы для обоснования выбора методов «оптической биопсии» тканей.

Теоретическая и практическая значимость

Выявленная методами лазерной спектроскопии общность оптических свойств ГСФ позволяет предположить природу источников флуоресценции в биотканях, обладающих флуоресцентным откликом, возбуждаемым в красной и ближней инфракрасной области спектра. Такими источниками являются гетерогенные продукты окисления и гликирования белков, аминокислот, липидов. Разработанные лазерные методы анализа свойств меланина в коже *in vivo* по данным спектроскопии комбинационного рассеяния, его двухфотонной флуоресценции и однофотонной флуоресценции в ИК области спектра могут быть использованы не только для определения содержания меланина, но и для анализа его молекулярной организации.

Практическое применение разработанных методов состоит в возможности интерпретации данных «оптической биопсии» тканей для диагностики социально значимых заболеваний (как рак, диабет, сердечно-сосудистые заболеваний и т.д.), в которые, например, вовлечены меланин, продукты гликирования белков.

Личный вклад автора

Все теоретические и экспериментальные результаты, представленные в диссертационной работе, либо получены автором лично, либо при его непосредственном участии. Основная часть результатов была получена в лаборатории лазерной биофотоники кафедры квантовой электроники Физического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Публикации по теме диссертационной работы были написаны при определяющем участии автора.

Степень обоснованности положений, выносимых на защиту, научных выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертация Якимова Б.П. выполнена на высоком научном уровне, логично структурирована. Достоверность полученных результатов, обоснованность выводов и защищаемых положений не вызывают сомнений. Результаты, представленные в диссертационной работе, составили основу 6 работ в высокорейтинговых научных журналах, являются оригинальными и представляют интерес, как с фундаментальной, так

и с прикладной точек зрения. Апробация результатов проведена на российских и международных конференциях.

Структура и объем работы

Диссертация Якимова Б.П. состоит из введения, трёх глав, заключения и списка цитированной литературы. Работа содержит 170 страниц, 37 иллюстраций и 167 библиографических ссылок.

Во введении обосновывается актуальность исследований, проводимых в рамках данной диссертационной работы, формируется цель, ставятся задачи, излагается научная новизна и практическая значимость представляемой работы.

Глава 1 представляет собой обзор научной литературы по изучаемой проблеме. Установлено место методов лазерной флуоресцентной микроскопии и спектроскопии среди лазерных методов диагностики. Описаны основные эндогенные, то есть исходно присутствующие, флуорофоры в организме человека.

Глава 2 посвящена исследованию свойств и механизмов формирования фотофизических характеристик ГСФ. В начале главы приводится описание объектов и методов исследования, используемых в работе. Исследование оптических свойств ГСФ проводилось для трёх систем: меланина, водных растворов гетерогенных продуктов фотоокисления триптофана, конечных продуктов гликирования модельного белка. Было установлено, что времена затухания флуоресценции и амплитуды вкладов компонент зависят от длины волны эмиссии как для кинетик затухания флуоресцентного отклика, наблюдаемого на пикосекундном временном масштабе, так и для компонент затухания, проявляющихся на масштабе наносекунд.

На основе полученных результатов был сделан вывод о том, что наличие сверхбыстрой компоненты затухания флуоресценции ГСФ связано с эффектом ориентационной релаксации молекул растворителя, находящихся в локальном окружении флуорофора, при этом роль межмолекулярного электронного взаимодействия в формировании флуоресцентных свойств исследуемых гетерогенных систем является незначительной, следовательно, кинетика затухания флуоресценции и анизотропии флуоресценции ГСФ в первую очередь должна быть описана моделью невзаимодействующих флуорофоров.

Глава 3 посвящена представлению результатов исследования возможности детектирования ГСФ на основе особенностей их оптических свойств в некоторых задачах биомедицинской диагностики. Представлены результаты исследования свойств флуоресцентного отклика гетерогенных продуктов окисления в единичных клетках (кератиноцитах) кожи, а также меланина и продуктов окисления белков в коже человека *in vivo*.

Возможность детектирования флуоресцентного отклика от гетерогенных продуктов окисления биомолекул (белков, аминокислот, липидов) была исследована для единичных клеток иммортализованной клеточной линии кератиноцитов человека. Было обнаружено, что наибольшие относительные изменения флуоресцентного отклика клеток спустя 5–20 часов после фотооблучения исследуемых образцов наблюдаются при возбуждении на 638 нм и детектировании эмиссии флуоресценции в диапазоне 655–665 нм.

Был сделан вывод о том, что флуоресцирующие продукты биомолекул, накапливающиеся в результате процессов окисления в клетках, могут вносить существенный вклад во флуоресцентный отклик клеток кожи, возбуждаемый в видимом

диапазоне спектра, при этом наибольшие относительные изменения в интенсивности флуоресценции наблюдаются при возбуждении и детектировании оптического отклика в красном диапазоне спектра. Представленные результаты могут быть использованы при анализе параметров эндогенной флуоресценции клеток, подвергнутых окислительному стрессу. Помимо гетерогенных продуктов окисления, накапливающихся в результате окислительного стресса в клетках, в коже также может присутствовать меланин, представляющий собой ГСФ. В Главе 3 также представлены результаты исследования возможности визуализации меланина в коже *in vivo* с использованием двух отличительных характеристик его оптического отклика: 1) наличия сверхбыстрой компоненты в кинетике затухания флуоресценции и 2) возможности возбуждения флуоресцентного отклика в красной и ближней инфракрасной области спектра.

Было установлено, что лазерная конфокальная фемтосекундная микроскопия позволяет визуализировать меланин с помощью короткого (менее 200 пс) времени затухания его флуоресцентного отклика в видимом диапазоне при многофотонном возбуждении флуоресценции; лазерная конфокальная микроспектроскопия с однофотонным возбуждением в ближнем ИК диапазоне позволяет селективно детектировать меланин на различных глубинах в коже по сигналу комбинационного рассеяния по линиям на 1380 см^{-1} и 1570 см^{-1} , в том числе, с помощью метода неотрицательной матричной факторизации; а также по интенсивности сигнала однофотонно-возбуждаемой на 785 нм флуоресценции. Было установлено, что параметры флуоресцентного отклика меланина, в частности, Стоксов сдвиг флуоресценции, взаимосвязаны с изменениями молекулярного состава меланина кожи *in vivo*, проявляющимися в спектрах КР. Полученные результаты могут быть использованы для исследования распределения и свойств меланина при его участии в нормальных и патологических процессах в коже.

В Заключение перечислены основные результаты и выводы работы.

Диссертационная работа представляет собой полное и законченное исследование. Автором проделан большой объем работы, и его квалификация в области проведенных исследований не вызывает сомнений.

К диссертационной работе имеется ряд замечаний:

1. На фоне достаточно подробного обзора литературы по существующим методам флуоресцентного и рамановского анализа белков, описание примеров использования регистрируемого оптического отклика в задачах биомедицинской диагностики выглядит недостаточно полным.

2. В описании проведенных *in vivo* и *ex vivo* исследований тканей и клеточного материала отсутствует указание на получение этических решений на проведение исследований. Хотя стоит отметить, что данные этические решения приведены в научных работах, опубликованных автором.

3. Анализ относительной концентрации меланина в тканях кожи человека (представленный в Главе 3) выполнен всего лишь на 12 добровольцах (7 с фототипом кожи II, 5 с фототипом кожи III). Поэтому внедрение предлагаемых подходов в реальную клиническую практику потребует проведения более масштабных исследований.

4. В подписи к рисунку 3.15 указано, что «Наблюдается статистически значимая линейная корреляция...» для зависимости Стоксового сдвига ИК-флуоресценции от отношения амплитуд рамановских линий меланина. При этом в тексте работы нигде не указывается, что понимается под статистически значимой корреляцией.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 01.04.21 – «лазерная физика» (по физико-математическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Якимов Борис Павлович заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.21 – «лазерная физика».

Официальный оппонент – **Братченко Иван Алексеевич**
к.ф.-м.н., доцент кафедры лазерных и биотехнических
систем ФГАОУ ВО «Самарский национальный
Исследовательский университет имени академика С.П. Королева»



Дата: «7» июня 2022 г.

Адрес: 443086, г. Самара, ул. Московское шоссе, д. 34.

Сайт: <https://ssau.ru/>, Тел.: 8 (846) 267 45 50, e-mail: bratchenko@ssau.ru

Я даю согласие на обработку персональных данных (приказ Минобрнауки России от 01.07.2015 №662)

	Подпись <u>Братченко ИА</u> удостоверяю.
	Начальник отдела сопровождения деятельности научных советов Самарского университета
	 Васильева И.П. <u>Иван</u> 20 <u>22</u> г.