

## 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 посвящена фундаментальному исследованию оптических свойств эндогенных флуорофоров – молекул в организме человека, ответственных за формирование флуоресценции клеток и тканей. Актуальность работы связана, прежде всего, с тем, что для реализации методов оптической диагностики и воздействия на организм светом *in vivo* ключевым является понимание мишеней воздействия и источников информативного сигнала, при этом использование внешних (экзогенных) меток на человеке в большинстве случаев затруднено или является запрещенным. Таким образом, интерес представляет анализ свойств эндогенных, то есть, исходно присутствующих в организме молекул. В качестве примера научной области, в которой использование эндогенного оптического контраста является ключевым требованием, можно привести оптическую интраоперационную диагностику. За последнее десятилетие были развиты и реализованы в виде коммерчески доступных устройств технологии навигации в урологии (детектирование границы опухоли мочевого пузыря), сердечно-сосудистой хирургии (определение типа атеросклеротических бляшек), эндокринологии (визуализация паращитовидной железы), скрининге рака груди, гистологии, дерматологии. Во всех случаях методики основаны на анализе оптического отклика эндогенных молекул и поиске различий в оптическом отклике в норме и при патологиях. Таким образом, исследование фотофизических процессов в эндогенных флуорофорах и развитие методов анализа и визуализации с использованием эндогенного отклика представляет собой одну из центральных задач биофотоники.

Диссертационная работа Е.А. Ширшина представляет собой комплексное исследование эндогенных флуорофоров, начиная от

ароматических аминокислотных остатков белков, ответственных за их УФ флуоресценцию, до эндогенных флуорофоров, ответственных за ИК флуоресценцию клеток и тканей, выявление механизмов формирования оптического отклика которых явилось одним из центральных результатов диссертации. Также для создания на основе оптического эндогенного контраста диагностических методов необходимо уметь селективно выделять и анализировать сигнал от них. Например, визуализация и анализ некоторых структур в тканях *in vivo* до сих пор не реализованы с помощью оптических методов – таким примером являются иммунные клетки в коже, задача диагностики которых решена в диссертации. Таким образом, в диссертационной работе получены как новые фундаментальные результаты в области оптики эндогенных флуорофоров в организме человека, так и развиты новые подходы к биомедицинской диагностике с использованием сигнала исследованных эндогенных флуорофоров.

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 посвящена обзору литературы по теме диссертационной работы. Рассмотрены методы оптической диагностики, основанные на использовании сигнала эндогенных молекул. На примере конкретных эндогенных хромофоров продемонстрированы возможности применения методов биофотоники для неинвазивной диагностики физиологических параметров организма человека и интраоперационной диагностики. Рассмотрены основные эндогенные флуорофоры, механизмы формирования их спектральных свойств и кинетики релаксации возбужденного состояния.

Проанализировано влияние микроокружения и изменения структуры эндогенных флуорофоров на их фотофизические параметры. Рассмотрены некоторые дискуссионные вопросы, в частности вопрос о формировании эндогенной флуоресценции клеток и тканей в ближней ИК области спектра.

**Вторая** глава посвящена исследованию некоторых вопросов из области эндогенной УФ флуоресценции белковых молекул. Продемонстрирована некорректность подхода на основе модифицированного уравнения Штерна-Фольмера для определения параметров и числа сайтов связывания в системе. Предложен оригинальный алгоритм для решения этой задачи. Разработана методика определения параметров тирозиновой (Tyr) флуоресценции белков (интенсивности и времени жизни) и доказана возможность использования флуоресценции Tyr для отслеживания конформационных изменений белков, когда флуоресценция триптофана (Trp) не является чувствительной.

В **третьей** главе продемонстрировано, что использование экзогенных флуоресцентных меток при анализе межмолекулярных взаимодействий может оказывать на него влияние. Данный факт важен с точки зрения исследования агрегации белков и самоорганизующихся молекулярных систем с использованием различных флуоресцентных зондов. Для преодоления выявленных ограничений в работе был предложен метод анализа кинетики агрегации белков и пептидов, а также их визуализации с использованием эндогенной флуоресценции в видимой области спектра. Был установлен механизм формирования указанной эндогенной флуоресценции, впервые доказано, что принципиальной является роль возникающих химических модификаций биомолекул, приводящих к образованию гетерогенных систем флуорофоров (ГСФ). Показано, что выявленный механизм ответственен за формирование универсального флуоресцентного фона биомолекул в видимой и ближней ИК областях спектра.

В **четвертой** главе проведены фундаментальные исследования оптических свойств ГСФ и предложена модель формирования оптического отклика в них. Так, впервые исследованы оптические свойства (спектральные свойства и параметры релаксации возбуждения на временном масштабе  $100 \text{ фс} \div 10 \text{ нс}$ ) в ГСФ, полученных в рамках подхода «снизу вверх» (окисление

молекул в растворах) и «сверху вниз» (на примере природного органического вещества). Доказана общность формирования оптических свойств ГСФ и верифицирована гипотеза о ключевой роли электронного взаимодействия в данном процессе. На основе данных кинетики релаксации анизотропии флуоресценции, измеренной с субпикосекундным временным разрешением и анализа флуоресценции молекулярной (<1 кДа) фракции ГСФ доказано, что оптические свойства ГСФ определяются, в первую очередь, суперпозицией оптических свойств флуорофоров и хромофоров в их составе.

**Пятая** глава посвящена исследованию эндогенной флуоресценции плазмы крови, выявлению механизма ее формирования и диагностике патологических процессов на ее основе. В работе исследована варибельность УФ флуоресценции плазмы крови, показана, что она обусловлена, в первую очередь, соотношением вкладов сигналов от триптофановых и тирозиновых остатков в белках, а также соотношением концентраций различных белковых фракций в образце. Установлен механизм формирования эндогенной флуоресценции плазмы крови в видимой области спектра, доказана роль ГСФ, образующихся в результате процессов окисления и гликирования белков. На основе полученных данных о механизмах формирования флуоресценции белков плазмы крови в УФ и видимой областях спектра выявлены параметры спектров, позволяющие производить диагностику патологических процессов, что было продемонстрировано на наборе данных пациентов с онкозаболеваниями.

**В шестой** главе исследованы возможности мультимодального молекулярного имиджинга кожи *in vivo* с эндогенным контрастом. Во-первых, была разработана методика визуализации микроструктур в биоткани методом двухфотонной микроскопии с визуализацией времени затухания флуоресценции (ДФМ-FLIM), в частности, микрососудов в коже. Впервые установлен механизм формирования эндогенной флуоресценции со сверхбыстрым (<100 пс) временем затухания из области сосудов, показано, что за него ответственен процесс образования фотопродукта в результате двухфотонного поглощения. На основе разработанного метода определения исследован механизм чувствительности параметров периваскулярной области

к тяжести сердечной недостаточности у пациентов.

**Седьмая** глава посвящена развитию метода селективной визуализации и анализа субпопуляций клеток *in vivo* методом FLIM. В работе был предложен метод анализа данных FLIM для поиска субпопуляций объектов (клеток), отличающихся параметрами кинетики затухания флуоресценции, на основе которого впервые было реализовано детектирование иммунных клеток *in vivo*, визуализация и анализ состояния которых на людях затруднена или невозможна, с помощью эндогенного контраста.

В **восьмой** главе были разработаны подходы к визуализации и структурному анализу меланина, в том числе, *in vivo*, с помощью методов лазерной спектроскопии. При этом в основе разработанных подходов лежало рассмотрение фотофизических процессов как в ГСФ. Так, была исследована взаимосвязь между формой спектров КР и ИК флуоресценцией меланина, а также проверена гипотеза о резонансном возбуждении меланина при двухфотонном возбуждении методом нелинейной флуориметрии. На основе полученных результатов был разработан и верифицирован метод микроскопии насыщения флуоресценции для картирования абсолютных значений сечения двухфотонного поглощения по образцу.

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) Продемонстрирована некорректность подхода на основе модифицированного уравнения Штерна-Фольмера для определения параметров и числа сайтов связывания в системе и предложен оригинальный алгоритм для решения этой задачи.
- 2) Показано, что использование экзогенных флуоресцентных меток для анализа агрегации белков может влиять на кинетику образования, морфологию и механические свойства образующихся структур, что обуславливает важность эффекта появления у системы эндогенной

флуоресценции в видимой области спектра (ВЭФБ, видимая эндогенная флуоресценция белков). Продемонстрирована возможность использования ВЭФБ для визуализации метаболических амилоидов в живых клетках и для анализа кинетики агрегации белков *in vitro*. На модельных системах, в том числе, живых клетках, показано, что эффект ВЭФБ связан с образованием ГСФ при химических модификациях биомолекул за счет процессов окисления и ответственен за флуоресценцию в красной и ближней ИК области спектра.

- 3) Проведен детальный анализ аналитических возможностей, вариабельности и формирования флуоресценции белков плазмы крови. Впервые показана доминирующая роль альбумина в формировании флуоресценции плазмы крови в видимом диапазоне спектра, связанная с формированием ГСФ при его химических модификациях. Предложена классификационная модель, основанная на использовании параметров ЭФ белков плазмы крови, позволяющая диагностировать онкозаболевание с точностью >80%.
- 4) Продемонстрирована возможность визуализации стенок капилляров и окружающих их тканей с помощью ДФТ-FLIM. Доказано, что сигнал двухфотонной ЭФ, локализованный внутри капилляров, связан с необратимым накоплением в эритроцитах флуоресцентного фотопродукта гемоглобина, обладающего сверхбыстрым (менее 100 пс) затуханием флуоресценции. С помощью ДФТ-FLIM установлена природа формирования ПЗ, показано, что ширина ПЗ является диагностически значимым параметром, чувствительным к степени ХСН у пациентов за счет увеличения размера живого эпидермиса, связанного с отечным синдромом.
- 5) Показано, что регистрация методом ДФТ сигнала от эндогенных флуорофоров и анализ параметров его релаксации позволяет при измерении *in vivo* у людей визуализировать макрофаги и тучные клетки, которые другими методами в аналогичных условиях исследовать затруднительно или невозможно.

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 седьмой главе много внимания уделено анализу кинетики флуоресценции кофактора НАДН, для свободной формы которого время жизни флуоресценции является достаточно коротким ( $<400$  пс). Было бы правильным отдельно обсудить вопрос о том, насколько хорошо позволяет использовавшаяся в работе установка определять параметры затухания флуоресценции быстрой компоненты во флуоресцентном отклике НАДН.

2. В работе показано, что появление в результате окислительных процессов гетерогенных систем флуорофоров в клетке может маскировать сигнал от НАДН, поскольку они обладают широким спектром возбуждения флуоресценции. В связи с этим возникает вопрос о том, в каких диапазонах может варьироваться квантовый выход флуоресценции продуктов окисления белков и ДНК.

3. В шестой главе показано, что при реализации метода двухфотонной микроскопии образуются фотопродукты гемоглобина, дающие вклад в детектируемый от кожи флуоресцентный отклик. Потенциально возможно, что флуоресцирующие фотопродукты могут образовываться и при двухфотонном поглощении накачки другими флуорофорами, например, в клетках или во внеклеточном матриксе. Проверилась ли такая гипотеза и, если да, каков масштаб этого вклада?

4. Каким образом при определении сечения двухфотонного поглощения методом микроскопии насыщения флуоресценции (восьмая глава) происходит корректировка на концентрацию и квантовый выход флуорофора?

5. В шестой главе предложен способ визуализации сосудов по сверхбыстрой флуоресценции флуорофоров, возникающих в результате фотохимических процессов, происходящих с гемоглобином. Какой вклад при этом дают в детектируемый сигнал клетки крови, отличные от эритроцитов – возможна ли их селективная визуализация?

6. Насколько может влиять лазерное излучение (при параметрах,

использовавшихся в работе) на времена затухания флуоресценции белков?

Указанные замечания носят рекомендательных характер и не влияют на общее впечатление от диссертационной работы. Результаты, представленные в ней, имеют большую практическую значимость и ценность и вносят существенных 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 – Дунаев Андрей Валерьевич

Доктор технических наук по специальности  
05.11.17 – Приборы, системы и изделия  
медицинского назначения, доцент, ведущий  
научный сотрудник Научно-технологического  
центра биомедицинской фотоники, профессор  
кафедры приборостроения, метрологии и  
сертификации Института приборостроения,  
автоматизации и информационных технологий  
Федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего  
образования «Орловский государственный  
университет имени И.С. Тургенева»

Дунаев Андрей  
Валерьевич

Дата: «02» октября 2023 г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Орловский государственный университет имени И.С.  
Тургенева»

Служебный адрес: 302026, Орловская область, г. Орел, ул. Комсомольская 95.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

E-mail: [dunaev@bmecenter.ru](mailto:dunaev@bmecenter.ru)

Телефон: +7 (4862) 41-98-06

Подпись Дунаева А.В. заверяю:

Проректор по научно-технологической  
деятельности и аттестации научных кадров

Радченко  
Сергей Юрьевич