

ОТЗЫВ

Официального оппонента доктора физико-математических наук Хлебцова Бориса Николаевича на диссертацию Звягина Андрея Васильевича «Применение фотолюминисцентных наноматериалов и лазерных технологий для оптической визуализации биологических систем», представленную на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 03.01.02 – биофизика

Диссертационная работа Звягина А.В. посвящена одному из актуальных направлений современной биофизики – использованию новых типов флуоресцентных наночастиц для оптической визуализации биологических объектов и молекулярных взаимодействий. Несмотря на то, что флуоресцентные наноматериалы используются в оптических технологиях уже более 15 лет, остается ряд нерешенных фундаментальных и прикладных вопросов, касающихся настройки диапазона возбуждения наночастиц, подавления автофлуоресценции биологических объектов, учета эффекта многократного рассеяния света в биотканях и создания многофункциональных наночастиц для тераностики. В связи с этим поиск новых видов флуоресцентных наноматериалов и их эффективное использование в оптической микроскопии представляется актуальной и важной проблемой.

Цель и задачи диссертации соответствуют заявленной специальности 03.01.02 – биофизика. Ознакомление с текстом работы и публикациями Звягина А.В. позволяет заключить, что поставленные задачи решены полностью.

Несомненной является научная новизна полученных результатов. Во-первых, разработаны новые методы получения наноалмазов, нанорубинов и нанофосфоров с улучшенными свойствами. Доказано существование азотно-вакансионных центров окраски в наноалмазах детонационного происхождения, размером около 5 нм. Впервые использованы нанорубины в качестве ФЛ частиц, позволяющих добиться предельно возможного оптического контраста на фоне, создаваемом аутофлуоресценцией клеток и светорассеиванием возбуждающего

лазерного излучения. Во-вторых, продемонстрировано, что наночастицы оксида цинка позволяют получать оптически-контрастные изображения на фоне паразитного оптического фона от биологической ткани при нелинейном оптическом возбуждении ультракороткими импульсами, что позволило провести численные оценки концентрации наночастиц в коже человека. Наконец, был продемонстрирован метод измерения диаметра диэлектрических наночастиц на базе оптической микроскопии одиночных наноалмазов. Была создана оригинальная гибридная атомно-силовая/конфокальная система, позволяющая осуществлять визуализацию, спектрально-оптические и квантовые измерения одиночных наноалмазов и нанорубинов, одиночных центров окраски наноалмазов.

Диссертационная работа Звягина А.В. построена по общепринятой схеме и состоит из введения, обзора литературы по проблемам исследования (глава 1 и глава 2), пяти глав с оригинальными результатами и их обсуждением (глава 3-7), заключением, списком литературы и приложением, содержащем основные методики работы (глава 8). Диссертация изложена на 198 листах текста, содержащего 75 рисунков. Список литературы представлен 231 источником.

Обзор литературы дает объективное представление о современном уровне развития технологий синтеза и биологических применений флуоресцентных наночастиц. Из представленного литературного анализа логичным образом вытекают нерешенные проблемы и задачи исследования.

Работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современных биофизических, химических, биологических и медицинских подходов, которые описаны в тексте работы и отдельно в приложении. Можно однозначно заключить, что работа выполнялась на современном оборудовании в лидирующих научных лабораториях России и зарубежных стран.

Представленная работа является законченным целостным исследованием, внесшим существенный вклад в развитие современной биофизики. Среди

основных результатов, имеющих большое фундаментальное и прикладное значение следует отметить следующие:

1) Разработаны новые и улучшены уже известные методы синтеза флуоресцентных наноалмазов, нанорубинов и антистоксовых наночастиц. Полученные наночастицы имеют улучшенные флуоресцентные и химические свойства по сравнению с известными аналогами, что существенно упростило использование их для оптической визуализации.

2) Были разработаны, построены и опробованы уникальные системы оптической микроскопии для сверхчувствительной визуализации наночастиц:

(а) дискретных одиночных наночастиц алмаза, используя высокий показатель преломления алмаза и захват изображения камерой с электронным умножением (EMCCD), работающей в режиме счёта одиночных фотонов; (б) дискретных флуоресцентных наноалмазов и нанорубинов с использованием лабораторной системы лазерно-сканирующего конфокального микроскопа; (в) одиночных антистоксовых нанофосфоров с помощью эпифлуоресцентного микроскопа, позволяющего регистрацию с предельной чувствительностью в клетках и тонких тканевых срезах. Также созданы системы оптического фотолюминесцентного имиджинга, позволяющие зондирование локализованных участков ткани, маркированных биогибридными наноконструкциями.

В целом, можно заключить, что диссертационная работа Звягина А.В. выполнена на высоком уровне и отражает решение всех поставленных перед автором задач. Диссертация содержит совокупность новых научных результатов и положений, выдвигаемых для публичной защиты, имеет внутреннее единство и свидетельствует о значительном личном вкладе соискателя в науку. Основные научные положения, выводы являются достоверными и научно-обоснованными, они детально аргументированы в тексте диссертации и являются логическим завершением работы.

Диссертация прошла всестороннюю апробацию в форме многочисленных выступлений на международных конференциях. По теме диссертации опубликованы 69 работ, в том числе статьи в таких

высокорейтинговых журналах как Nature Nanotechnology, Small, PLOS ONE и другие. Удивительно, однако, что список публикаций автора, представленный в автореферате диссертации, не содержит ни одной статьи на русском языке.

Несмотря на общий высокий уровень представленных исследований, текст диссертационной работы несвободен от недостатков. Сформулируем основные замечания и вопросы, возникшие при анализе диссертации.

Замечания, связанные со структурой работы.

- 1) Диссертационная работа изложена на 198 страницах, из которых оригинальная часть (без введения, обзора литературы, списка цитируемых источников и приложения) составляет около 100 страниц. Оригинальная часть разбита на 5 глав. К сожалению, столь лаконичное изложение полученных результатов не позволяет в полной мере оценить объем проделанной работы. В оригинальной части подробно дан ответ на вопросы: «Что было сделано? Какие результаты получены?»; но не всегда понятен ответ на вопрос: «Как это было получено?». Например, пункт 3.4.2 Визуализация ФНА в клетках раскрывается только на одной странице текста и не содержит ни одного рисунка (есть ссылка на рисунок из другого пункта). Для понимания всех деталей работы мне приходилось обращаться к тексту статей автора диссертации, где содержалось большое число рисунков и подробное описание эксперимента.
- 2) Во введении диссертационной работы обсуждаются различные типы, флуоресцентных материалов, используемые для оптических технологий. Вместе с тем, перечень существующих флуоресцентных наночастиц, очень обширен. Например, автор не упоминает в диссертации кремниевые наночастицы, флуоресцирующие металлические нанокластеры, карбоновые (углеродные) квантовые точки и др. Дополнительно, автор приводит только преимущества, предлагаемых в работе наночастиц, совсем не уделяя внимания их

недостаткам (например, низкому квантовому выходу флуоресценции по сравнению с полупроводниковыми квантовыми точками). С моей точки зрения было бы полезно представить основные характеристики всех видов флуоресцентных наночастиц в виде таблицы. Это наглядно продемонстрирует все преимущества и недостатки объектов исследования.

- 3) Глава 6 несколько выпадает из общего контекста работы, так как посвящена исследованию трансдермального транспорта наночастиц оксида цинка (которые только с большой натяжкой можно отнести к флуоресцентным), а не к визуализации биологических систем.

Замечания и вопросы, связанные с полученными данными.

- 1) В диссертации приведено очень мало изображений объектов, полученных с помощью метода просвечивающей электронной микроскопии. Этот метод является эталонным для определения размеров наночастиц. Например, на Рис. 8.2 представлено изображение антистоксовых наночастиц, которое полностью позволяет заключить, что частицы монодисперсны и имеют определенный размер (с небольшим разбросом). В то же самое время, фотографий такого качества для наноалмазов, нанорубинов, наночастиц оксида цинка в диссертации нет. Напротив, на Рис. 3.7 представлено изображение наноалмазов (полученное методом атомно-силовой микроскопии), которое показывает наличие больших субмикронных частиц в образце (наряду с 5 нм частицами). На рисунках 4.1 и 4.2 показаны электронно-микроскопические изображения нанорубинов, демонстрирующие высокую полидисперсность образца. В целом, заявления автора о точном контроле размеров частиц (даже без указания доверительного интервала), мне представляются несколько спекулятивными.
- 2) В работе показана оригинальная установка для прямого измерения квантового выхода флуоресценции антистоксовых наночастиц.

Возникают вопросы, почему подобная техника не была использована для определения квантового выхода наноалмазов и нанорубинов? Почему не были проведены эксперименты по определению квантового выхода флуоресценции по относительной методике (как отношение к флуоресценции эталонного красителя)? Зачем использовалась технология измерения квантового выхода по скорости испускания квантов (раздел 8.6)? Какой квантовый выход флуоресценции наноалмазов?

- 3) На Рис. 4.6 представлен флуоресцентный спектр нанорубина, имеющий полуширину 2 нм. Такие узкие пики характерны для вынужденного лазерного излучения и, в некоторых случаях, для комбинационного рассеяния. Данные эффекты наблюдаются при возбуждении эмиссии органических красителей высокомоощным лазерным излучением. Возможно ли, что на рисунке 4.6d показан спектр вынужденного лазерного излучения, а не флуоресценции?

Технические замечания.

- 1) В диссертации есть ряд неточностей, например на подпись к рисунку 8.1 совпадает с подписью к рисунку 4.6, однако на самом рисунке показана группа детских лиц. На Рис. 1.1 шкала размеров составляет, очевидно, 50 микрометров, а не 50 миллиметров.
- 2) В диссертации есть ряд неудачных или спорных утверждений. Например, на стр. 19 утверждается «На сегодняшний день описан ряд мультифункциональных комплексов, предназначенных для тераностики, сконструированных на основе наночастиц из неорганических (оксид железа [76], золото [92,66], углерод [72,77], кремний [11]), так и из органических (дендримеры [187], липосомы [128], полимерные мицеллы [85]) материалов, большая часть которых не является фотолюминесцентными, а, значит, не позволяет получать контрастные оптические изображения». Очевидно, что контраст

оптического изображения определяется не только флуоресцентными свойствами наночастиц, но и техникой измерения.

Методика эксперимента на фантомах (Рис. 5.10) скорее относится к экспериментам *ex vivo*, а не *in vivo*.

Перечисленные замечания не носят принципиального характера и не умаляют достоинств и значения работы. Фундаментальные закономерности, обнаруженные и проанализированные в ходе проведенных исследований, имеют большое значение для биофизики. По своей актуальности, научно-методическому уровню, новизне полученных результатов и практической значимости диссертация Звягина Андрея Васильевича полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени доктора физико-математических наук по специальности 03.01.02 - биофизика.

Доктор физико-математических наук,
Ведущий научный сотрудник
лаборатории нанобиотехнологии
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института биохимии и
физиологии растений и микроорганизмов
Российской академии наук (ИБФРМ РАН)

Хлебцов Б. Н.

16 сентября 2015 года
410049 г. Саратов, пр. Энтузиастов, д. 13
E-mail: bkhl@ibppm.sgu.ru
Тел. 8(8452)970403

Подпись Хлебцова Б.Н. заверяю
Ученый секретарь ИБФРМ РАН
к.б.н.



Пылаев Т.Е.