

УТВЕРЖДАЮ
Проректор – начальник
Управления научной политики
и организации научных исследований
МГУ имени М.В.Ломоносова,
А.А.Федянин



«14» октября 2015 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Звягина Андрея Васильевича «Применение фотолюминесцентных наноматериалов и лазерных технологий для оптической визуализации биологических систем», представленной на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика.

Актуальность темы.

Диссертационная работа А.В. Звягина посвящена разработке основных концепций, методов и экспериментальной реализации функционального биомедицинского оптического имиджинга на основе фотолюминесцентных нанотехнологий. Важным примером такого развития является разработка биосовместимых фотолюминесцентных наноматериалов с их уникальными физико-химическими и оптическими свойствами, которые позволяют существенно расширить возможности традиционных методов биомедицинского оптического имиджинга. Например, спектрально-селективная регистрация позволяет уменьшить фоновую аутофлуоресценцию ткани и улучшить локализацию маркированного очага. Однако интенсивная аутофлуоресценция клеток и биоткани, их сильное поглощение и светорассеяние существенно снижают чувствительность метода оптического зондирования с использованием флуоресцентных зондов. ФЛ наноматериалы позволяют преодолеть ограничения оптического имиджинга, связанные со свойствами органических флуорофоров. Множество неорганических ФЛ НЧ отличаются исключительной фотостабильностью, «настраиваемыми» узкими спектрами фотолюминесценции и высокой устойчивостью к условиям окружающей среды, в том числе рН и температуре. Эти свойства востребованы для визуализации молекулярного трафика в клетках. В более широкой перспективе неинвазивная визуализация редких биологических событий на уровне отдельных биомолекул в течение биологически значимого интервала времени представляется грандиозной задачей, которая может быть выполнена посредством применения биогибридных фотолюминесцентных нанотехнологий, основанных на соединении неорганического наноматериала (наночастиц) с молекулами биополимеров. Наиболее перспективной платформой для создания соединений для диагностики представляются наночастицы различной природы, обладающие уникальным набором свойств для получения

биогибридных ФЛ наносборок с желаемой избирательностью действия. Это составляет основу конструирования биогибридных ФЛ нанокомплексов для применений в диагностике и терапии живых организмов, в своей совокупности получившей название тераностика.

Также существует необходимость оценки токсикологических последствий применений наноматериалов, изучаемый нанотоксикологией. Токсикологические последствия применений косметических и фармацевтических продуктов на основе наноматериалов, таких как оксид цинка (ZnO), на коже человека находятся в зоне пристального внимания данной дисциплины, а современное состояние исследований не дает однозначного ответа на вопрос о цитотоксичности этих наноматериалов, в частности, проницаемости человеческой кожи для различного типа и размеров наночастиц. Применение нелинейной оптической томографии для прижизненной визуализации НЧ на поверхности человеческой кожи и в свежих биопсийных образцах позволило решить эту проблему, а также позволил расширить возможности диагностики и классификации биологических тканей.

Новизна исследования, полученных результатов и выводов.

В результате проведенных исследований получено несколько принципиально новых и интересных результатов. Разработаны новые методы получения наночастиц, таких как диспергируемые флуоресцентные наноалмазы, нанорубины и антистоксовые нанофосфоры для биомедицинского имиджинга. Впервые было продемонстрировано, что, несмотря на низкий квантовый выход, наночастицы оксида цинка производят оптически-контрастные изображения на фоне паразитного оптического фона от биологической ткани при нелинейном оптическом возбуждении ультракороткими импульсами. Развита метод нелинейной оптической томографии для оценки распределения в биологических тканях наночастиц ZnO, антистоксовых нанофосфоров, квантовых точек и эндогенных меланосом. Продemonстрировано применение технологии модульной самосборки для создания фотолюминесцентных нанокомплексов на основе разработанных наноматериалов. Была создана оригинальная гибридная атомно-силовая/конфокальная система, позволяющая осуществлять визуализацию, спектрально-оптические и квантовые измерения одиночных наноалмазов и нанорубинов, одиночных центров окраски фотолюминесцентных наночастиц. С помощью эпилюминесцентного микроскопа была впервые продемонстрирована предельная чувствительность регистрации одиночных наночастиц, что позволило оценить и продемонстрировать прижизненный имиджинг одиночных ФЛ НЧ в клетках и тонких тканевых срезах. Был впервые продемонстрирован метод отложенной оптической регистрации, инкорпорированный в конфигурации как лазерно-сканирующего конфокального, так и эпилюминесцентного микроскопов, показав улучшение соотношения сигнал-шум, как минимум, в 100 раз.

Анализ содержания диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, двух глав обзора литературы, отражающих современное состояние исследований в области фотолюминесцентных нанобиотехнологии и нанотоксикологии, пяти глав с изложением результатов и их обсуждением, заключения, благодарности, списка цитированной литературы, включающего 231 наименование на иностранном языке и приложения. Работа изложена на 209 страницах, включает 60 рисунков и 2 таблицы.

Во введении автором убедительно и аргументировано обоснована актуальность проблемы, которой посвящена диссертационная работа.

В обзоре литературы представлен анализ имеющихся на сегодняшний день данных литературы по теме исследования. Анализируя имеющиеся в литературе данные, автор в заключении, сделанном по обзору, логично подводит к постановке цели и задач собственных экспериментальных исследований. В целом обзор литературы написан хорошим языком и логично структурирован. Работы, цитирование которых осуществлено в обзоре, опубликованы преимущественно, в течение последних лет. Это лишний раз подтверждает актуальность темы исследования, выбранной диссертантом.

В главе 1 были рассмотрены перспективные типы фотолюминесцентных наночастиц для создания фотолюминесцентных биогибридных неорганических белковых наноструктур. Такие частицы, как флуоресцентные наноалмазы, нанорубины, антистоксовые нанофосфоры в дополнение к широко-известным квантовым точкам, составляют взаимодополняющий набор оптически-контрастных наноматериалов, подходящих для решения множества задач в науках о жизни, особенно, в качестве молекулярных зондов и тераностических агентов. Такие выгодные характеристики рассмотренных НЧ, как фотостабильность, оптический контраст, контролируемый дизайн их физических, химических и оптических свойств, развитая поверхность и др. являются основными факторами, привлекающими внимание исследователей. Были описаны методы синтеза и измерений основных характеристик наночастиц, и продемонстрированы наиболее привлекательные ниши их применений в биомедицине с особым прицелом на оптическом имиджинге клеток и биологических тканей. Также были рассмотрены подходы к модификации поверхности наночастиц для создания стабильных водных и буферных коллоидов. Процесс биоконъюгации позволяет осуществить адресную доставку и сигнальную связь с клетками и другими живыми биосистемами.

Следующая вводная глава посвящена описанию обширных и глубоких исследований в области транспорта наночастиц через кожу. Отмечается, что широкое использование наноматериалов подняло проблему безопасности в связи с возможными токсикологическими последствиями их применений в промышленности, медицине и повседневной практике. В настоящей главе излагаются ключевые положения нанотоксикологии, описывается прогресс в

исследованиях трансдермального транспорта ZnO с особым ударением на инновационные методы прижизненного оптического имиджинга, позволяющими получить важную информацию о распределении фотолюминесцентных наночастиц в биоткани, а также оценить морфологию самой биоткани.

Глава 3 посвящена описанию наноалмазов (НА), и, в частности, флуоресцентных наноалмазов, как наночастичной основы фотолюминесцентных биогибридных структур. Были проведены систематические и детальные исследования флуоресцентных свойств НА, особенно НА сверхмалых размеров (5 нм). На примере наноалмазов была продемонстрирована универсальная платформа сборки биогибридных наноконструктов с использованием высокоспецифичных молекулярных адапторов барназа:барстар, которые оказались устойчивы в биологической среде клеток. Оптический имиджинг биоструктур клеток, маркированных наноалмазами, достигается как за счёт эффективного светорассеяния НА, так и за счёт его флуоресценции.

В главе 4 представлены результаты производства, характеристики и первые демонстрации применения нанорубинов в молекулярной и внутриклеточной визуализации. Оказалось, что нанорубины обладают рядом полезных свойств, многие из которых, включая эффективность конверсии, фотостабильность, химическая инертность, сравнимы с флуоресцентными наноалмазами. Следует особо отметить, что продолжительное время жизни фотолюминесценции нанорубина, измеряемое в миллисекундах, позволяет реализовать схему отложенной регистрации, с помощью которой оптический фон из-за аутофлуоресценции и светорассеяния возбуждающего излучения подавляется полностью. Это предельно увеличивает контраст получаемых оптических изображений структур, маркированных нанорубинами. В настоящей главе были продемонстрированы подобные сценарии предельной чувствительности регистрации нанорубинов в клетках, в органическом красителе, и в клетках, маркированных яркими квантовыми точками.

Глава 5 посвящена созданию и систематическому исследованию недавно появившихся фотолюминесцентных наноматериалов, антистоксовых нанофосфоров, с целью их использования для молекулярно-специфического зондирования биологических процессов в клетках, а также направленных на практические применения в медицинской диагностике и терапии. Очень важной отличительной чертой нанофосфоров является возможность возбуждения и регистрации эмиссии в окне прозрачности биологической ткани, что обеспечивает проникновение оптического излучения вглубь биосистем в суб-сантиметровых масштабах. Все эти характеристики позволяют реализовать прижизненную визуализацию ФЛ биогибридных наночастиц в клетках-мишенях и биотканях вплоть до одиночных наночастиц, что было труднодостижимо на современном уровне развития нанотехнологии и биофотоники, и были про-

демонстрированы в данной работе. Поверхностно-модифицированные ФЛ наночастицы также оказались слабоцитотоксичными, фотостабильными, устойчивыми в водных и физиологических (буферных) растворах, и к их поверхности могут быть пришиты функциональные группы, обеспечивающие надёжную ковалентную привязку биомолекулярных модулей. Изучались преимущества НАФ для оптического имиджинга в клетках и биологических тканях. Так, высокая чувствительность регистрации НАФ позволила продемонстрировать визуализацию одиночной частицы НАФ. Оказалось, что одна наночастица НАФ может быть зарегистрирована в глубине 400 мкм в коже, а ранняя стадия аденокарциномы может зондироваться на глубине до 4 мм в живой ткани молочной железы.

В главе 6 представлены результаты работ соискателя по исследованию взаимодействия наночастиц оксида цинка с верхними слоями кожи, эпидермисом, роговым слоем, и дермой. Соискателем была впервые продемонстрирована оптическая визуализация наночастиц оксида цинка с помощью нелинейной оптической микроскопии и была опубликована в высоко-рейтинговой работе. На основе собранного соискателем объёма экспериментальных данных можно с высокой степенью достоверности утверждать, что наночастицы, включая НЧ ZnO, с размерами более 10 нм, задерживаются в верхнем роговом слое неповреждённой кожи, не пропуская частицы в слой живого эпидермиса. При этом оказалось, что НЧ ZnO способны растворяться в водной среде, особенно при низком рН среды, характерном для рогового слоя, что требует дополнительного экспериментального подтверждения.

Глава 7 посвящена применению разработанных нанотехнологий для адресной доставки контрастных и терапевтических агентов к целевым рецепторам. Это представляет собой задачу, подходы к решению которой рассматриваются в настоящей диссертации. Адресная доставка приобретает всё более важное значение в контексте быстро развивающейся научной дисциплины, называемой тераностика. Фотолюминесцентные наночастицы, описанные в предыдущих главах, представляют удобную технологическую платформу исследования рецепторов посредством их маркирования, позволяющую реализацию сверхчувствительного оптического имиджинга. Настоящая глава посвящена, в основном, взаимодействию НЧ с клетками, где особое внимание уделено созданию и изучению таких гибридных биомолекулярных наносборок, которые способны взаимодействовать с клетками на уровне функционирования самой клетки. Были представлены разработки соискателя по созданию и тестированию ФЛ биогибридных наносборок. Их применение для визуализации молекулярного трафика в клетках, а также для адресной доставки контрастных агентов и терапевтических векторов в целевые клетки является важной целью этой последней главы диссертационной работы.

В целом, говоря об экспериментальной части, следует отметить, что рецензируемая работа характеризуется очень хорошим методическим уровнем проводившихся исследований и квалифицированной интерпретацией полученных результатов.

Содержание автореферата и сделанных по работе публикаций полностью отражают основные положения диссертации и соответствуют указанной специальности. Заключение и выводы диссертационной работы соответствуют цели и задачам проводившихся исследований, конкретны, адекватны полученным результатам и не вызывают сомнений. Работа хорошо апробирована на многих конференциях, включая приглашённые и пленарные доклады.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Проведенные автором исследования вносят значительный вклад в создание платформы для нанобиотехнологии. Создана основательная, обширная исследовательская платформа, включающая в себя биогибридные фотолюминесцентные материалы нового типа, средства их интеграции с биомолекулярным содержимым клеток и биотканей, а также инновационные оптические методы визуализации биологических процессов с применением созданных ФЛ наночастичных комплексов.

Создание такой платформы даёт принципиально новые возможности для изучения клеточных процессов на уровне отдельных или дискретных биомолекул, маркированных фотолюминесцентными наночастицами; сверхчувствительной, высокоточной, неинвазивной диагностики физиологических процессов в нормальных и патологически изменённых биологических системах. Таким образом, это представляет собой новое направление в нанотехнологии и биофотонике, созданном на стыке последних достижений физики и биомедицины.

Вопросы и замечания.

1. В обзоре литературы недостаточно освещён вопрос восприимчивости фотолюминесценции наночастиц от окружающей среды, включая сравнительную зависимость квантового выхода фотолюминесцентных наночастиц от биологических сред.
2. Вывод о высокой растворимости наночастиц оксида цинка и проницаемости ионов цинка через кожу требует большей обоснованности. В частности, вызывает сомнения достоверность полученных экспериментальных результатов измерения концентрации экзогенных ионов цинка в рецепторной фазе ячейки Франца (около 80 нг/мл).
3. Оценка коэффициента диффузии наночастиц антистоксовых нанофосфоров, внедрённых в дерму кластера, был измерен как $D_{UC} = (3 - 7) \times 10^{-12} \text{ см}^2\text{с}^{-1}$. Это значение

ных в дерму кластера, был измерен как $D_{UC} = (3 - 7) \times 10^{-12} \text{ см}^2\text{с}^{-1}$. Это значение

представляется слишком низким в сравнении со значениями D , полученными в других

средах для наночастиц похожего диаметра.

4. В диссертации встречаются мелкие погрешности, опечатки. В частности, некоторые термины необоснованно пишутся с заглавных букв.

В то же время высказанные выше замечания не носят принципиального характера и не снижают несомненной высокой научной значимости работы.

Заключение.

Актуальность и новизна полученных данных, высокий методический уровень работы, ее теоретическая значимость позволяют сделать заключение о том, что диссертационная работа Звягина Андрея Васильевича «Применение фотолюминесцентных наноматериалов и лазерных технологий для оптической визуализации биологических систем» соответствует требованиям п.7 "Положения о порядке присуждения ученых степеней" ВАК, а её автор заслуживает присуждения ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика.

Отзыв обсужден и единогласно утвержден на заседании кафедры биофизики биологического факультета Протокол № 10 от 12 октября 2015 г.

Ученый секретарь
кафедры биофизики



/Яковлева О.В./

Зав. каф. биофизики, проф., чл.-корр. РАН



/Рубин А.Б./

