

## ОТЗЫВ

официального оппонента, кандидата физико-математических наук Любина Евгения Валерьевича на диссертационную работу Макарова Владимира Игоревича «Спектральные свойства кристаллических наночастиц фталоцианина алюминия при лазерном возбуждении», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.21 – Лазерная физика

### **Актуальность темы диссертационной работы.**

Использование фталоцианиновых соединений в качестве фотосенсибилизаторов для флуоресцентных методов диагностики и фотодинамической терапии является одним из перспективных направлений в медицине. Однако применение молекулярных форм фталоцианинов сопряжено с некоторыми неудобствами, в первую очередь для пациента. Применение фотосенсибилизаторов в форме наночастиц позволяет повысить селективность, специфичность, чувствительность методов спектроскопии обратного рассеяния, а также минимизировать накопление в коже и здоровых органах, сохранив при этом высокую фототерапевтическую эффективность. Одним из перспективных для исследования типов нанофотосенсибилизаторов являются кристаллические наночастицы фталоцианина алюминия (НЧ-АІРс). В кристаллическом виде они водонерастворимы и нетоксичны, но при контакте с опухолевыми или иммунными клетками и патогенной микрофлорой меняют свои спектроскопические свойства (приобретают способность флуоресцировать и становятся фототоксичными). Это свойство делает их перспективными для медицинской диагностики и фотодинамической терапии. Поэтому тема диссертационной работы Макарова В.И., посвященная изменению спектральных свойств кристаллических наночастиц фталоцианина алюминия при лазерном возбуждении, является актуальной; а объяснение природы возникновения этих эффектов является важной фундаментальной задачей. Оптимизация и изучение фотофизических параметров наноконплексов фталоцианинов является важной прикладной медицинской задачей.

В ходе диссертационного исследования разработан лазерно-спектроскопический аппаратный комплекс с временным разрешением для оценки взаимодействия наночастиц, лазерного излучения и микроокружения. С помощью данного комплекса проведено систематическое исследование НЧ-АІРс в различных биологических системах: в модельных средах, в клеточных культурах, в экспериментальных животных. Разработан комплексный метод приготовления коллоидов наночастиц с оценкой их размеров с помощью методов динамического рассеяния лазерного излучения и лазерной спектроскопии. Исследована динамика изменения интенсивности, длины волны и времени жизни флуоресценции в зависимости от типа микроокружения методами времяразрешенной лазерной спектроскопии на макро- и микроуровне. Исследована зависимость характеристик флуоресценции НЧ-АІРс от типа микроокружения и характеристик лазерного возбуждения. Показана перспективность использования НЧ-АІРс и разработанной аппаратуры для диагностики патологических состояний воспалительных заболеваний. Все решенные

задачи соответствуют поставленной цели диссертационной работы – выявлению механизмов, приводящих к различию флуоресцентных свойств кристаллических НЧ-АІРс в различном микроокружении, а также разработке методов исследования и лазерно-спектроскопического комплекса для оценки состояния НЧ-АІРс в биологических средах с целью их использования для фотодинамической терапии воспалительных заболеваний.

Работа состоит из введения, четырех глав, заключения, списка основных публикаций по теме диссертации и списка литературы. Общий объем диссертации - 136 страниц, включая 90 рисунков, 10 таблиц и список литературы из 143 наименований.

Во Введении обоснована актуальность темы исследования, сформулирована цель и основные задачи работы, изложены основные положения, выносимые на защиту, отмечена научная новизна, достоверность и научно-практическая значимость полученных результатов, перечислены публикации и основные доклады по теме диссертации.

В Первой главе приводится подробный обзор литературы о люминесцентных свойствах и применении различных фталоцианиновых комплексов. Показана перспективность использования фталоцианинов в качестве фотосенсибилизаторов для флуоресцентных методов диагностики и фотодинамической терапии в медицине. Обосновано использование различных наночастиц фталоцианинов: на основе липидов, полимеров и неорганических биоматериалов. Обращено внимание на основные недостатки применения молекулярных форм фталоцианинов в клинической практике и приведен обзор современного состояния исследований и перспектив практического применения нанокристаллических фталоцианинов в областях биофотоники.

Вторая глава посвящена экспериментальным методам исследования и разработке аппаратного комплекса оборудования. Представлен уникальный приборный комплекс для экспериментального определения времени жизни флуоресценции в нано- и пикосекундном диапазонах. Одним из преимуществ разработанной методики является возможность проводить измерения *in vivo*. Описана методика и аппаратура для исследования динамики взаимодействия НЧ-АІРс с компонентами клеток при селективном возбуждении лазерным излучением. Разработан приборный комплекс неинвазивной спектроскопической оценки состояния кожного покрова лабораторных животных. Представлены разработанные впервые волоконно-оптические инструменты для лазерной флуоресцентной диагностики и лазерной фотодинамической терапии крупных сосудов и для внутрисуставного использования. Также во второй главе описана методика приготовления и характеристики коллоидных растворов НЧ-АІРс.

В третьей главе приводятся результаты исследования изменения спектрально-люминесцентных свойств НЧ-АІРс при взаимодействии их с различным микроокружением (средами с различными рН, белковыми структурами и лизосомальными ферментами иммунных и раковых клеток). Описаны характерные спектры поглощения и флуоресценции НЧ-АІРс. Показано, что время жизни флуоресценции наночастиц АІРс сильно зависит от конкретного этапа их взаимодействия с макрофагами. На основании полученных результатов сделано предположение о том, что НЧ-АІРс имеют, как минимум, два



возможных варианта состояния, каждое из которых различается характером взаимодействия молекул на поверхности наночастицы с окружением. Приведены результаты расчетов фотодинамической эффективности Фотосенса в культурах опухолевых и иммунных клеток (HeLa и THP-1), а также квантового выхода флуоресценции НЧ-АІРс при взаимодействии с клетками. Предложен новый метод анализа уширения по времени импульса света при его распространении в ткани и показана его корреляция с экспериментальными данными.

Четвертая глава посвящена исследованию возможности использования наночастиц фталоцианина алюминия (НЧ-АІРс) в качестве нового фотосенсибилизатора для клинических применений. Показана возможность применения наночастиц фталоцианина алюминия для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии заболеваний крупных суставов, а также продемонстрированы новые методы и волоконно-оптические инструменты для флуоресцентного контроля за фотодинамической терапией артрозов крупных суставов *in vivo* на экспериментальных животных. Разработан новый спектроскопический метод оценки неоангиогенеза при приживлении кожных трансплантатов с применением НЧ-АІРс. Предложен приборный комплекс для неинвазивной спектроскопической оценки состояния кожного покрова и степени приживления трансплантируемых тканей. Разработаны методы и инструментарий для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии при атеросклерозе крупных сосудов.

В заключении сформулированы основные результаты работы.

Диссертационная работа Макарова В.И. выполнена на высоком научном уровне, оформлена в соответствии с требованиями, написана достаточно грамотно и ясно и подтверждает квалификацию автора. Полученные данные являются основанием для дальнейшего развития исследований. Задачи, поставленные в работе, выполнены полностью, выводы соответствуют полученным результатам.

**Достоверность и обоснованность результатов** обеспечивается использованием комплекса современных общепринятых экспериментальных методов исследования. Результаты исследований согласуются с литературными данными и опубликованы в реферируемых журналах и неоднократно докладывались и обсуждались на российских и международных конференциях по тематике диссертационной работы. Все представленные научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, подтверждены результатами экспериментов и численного моделирования.

**Научная новизна.** В работе получен ряд новых результатов, имеющих как фундаментальный, так и прикладной характер. Обнаружено возникновение флуоресценции не флуоресцирующих в воде НЧ-АІРс в некоторых специфических средах, не вызывающих растворение НЧ, и исследована кинетика затухания флуоресценции при различных режимах лазерного облучения и типа микроокружения. Полученные результаты характерных времен жизни флуоресценции НЧ-АІРс при взаимодействии с иммунокомпетентными клетками, отвечающими за воспалительные реакции в организме, являются новыми.

**Практическая значимость** работы обусловлена разработкой уникальных исследовательских комплексов для определения динамики изменения флуоресцентных свойств НЧ-АІРс при взаимодействии с микроокружением в воспалительных реакциях, разработкой волоконно-оптических инструментов для лазерной флуоресцентной диагностики и лазерной фотодинамической терапии крупных сосудов, для внутрисуставного использования, а также возможностью использования результатов исследования флуоресцентных свойств НЧ-АІРс в макрофагах, что позволит контролировать процесс терапии не только воспалительных, но и онкологических заболеваний.

При оценке диссертационной работы следует сделать несколько замечаний:

1. В тексте указано что при ФД регистрируются только близкие к центральным моды оптического волокна, это подтверждается небольшим реальным временным уширением сигнала в оптическом волокне. Однако при разработке оптической модели использовалось значение полной числовой апертуры волокна 0,22. Не понятно, как эффективное уменьшение апертуры влияет на разработанную модель.

2. Сказано, что для количественной оценки концентрации АІРс по сигналу флуоресценции проводили калибровку. В качестве стандартных образцов для калибровки использовали растворы НЧ-АІРс в ДМСО и Фотосенса в воде. Однако ранее автор указал, что интенсивность флуоресценции НЧ-АІРс может зависеть от окружения, в том числе от рН среды. Не понятно зависит ли флуоресценция АІРс от рН или других факторов и учитывается ли в экспериментах разница окружения внутри клеток и в модельных растворах.

3 В тексте отсутствует указание количества вещества фотосенсибилизатора в пересчете на единицу площади пересаженной кожи при трансплантации кожи.

4. В четвертой главе при описании схемы эксперимента указано, что трем сеансам фотодинамической терапии подвергся только один кролик. При этом делается обобщающее утверждение, что у кроликов [мн. число], получивших 3 сеанса такой терапии замечено значительно меньшее утолщение интимы и отсутствие бляшек. Таким образом не понятно количество животных, которые участвовали в эксперименте.

5. В работе отсутствует сравнения результатов фотодиагностики и гистологии различных областей одного и того же сосуда, которое бы подтвердило селективный характер накопления фотосенсибилизатора в атеросклеротически измененных участках сосудов.

Диссертационная работа Макарова Владимира Игоревича является актуальным и высоко значимым фундаментальным научным исследованием, обладающим значительным потенциалом для развития результатов работы для практических применений в биомедицине. Представленные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы. На защиту вынесено самостоятельное, оригинальное, хорошо структурированное и целостное научное исследование. Сделанные в диссертации выводы являются обоснованными и имеют высокую научную и практическую значимость.



Автореферат диссертации Макарова В.И. соответствует содержанию и полностью отражает структуру диссертации. По материалам диссертации опубликовано 13 статей в отечественных и зарубежных журналах. Работа прошла апробацию, опубликовано 24 тезисов докладов на российских и международных конференциях. Таким образом, диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» постановления Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук. Представленная к защите диссертационная работа Макаров В.И. полностью удовлетворяет требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а Макаров В.И. заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.21 – лазерная физика.

Официальный оппонент:

кандидат физико-математических наук,  
научный сотрудник кафедры квантовой электроники  
физического факультета Федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего образования «Московский  
государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Любин Евгений Валерьевич

Подпись Е.В. Любина удостоверяю  
Проректор МГУ,  
профессор

Федянин Андрей Анатольевич

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

01.04.21 – лазерная физика

Контактные данные:

Тел.: +7(495)939-39-10, e-mail: [lyubin@nanolab.phys.msu.ru](mailto:lyubin@nanolab.phys.msu.ru),

Сайт лаборатории: <https://www.nanolab.phys.msu.ru>,

Адрес места работы:

119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д.1, стр.2, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, физический факультет.

Сайты организации: <https://www.phys.msu.ru>, <https://www.msu.ru>

С отзывом ознакомлен 15.02.2019