

## **Отзыв официального оппонента**

на диссертацию Труниной Натальи Андреевны «Исследование проницаемости биологических тканей для иммерсионных агентов и наночастиц методами оптической когерентной томографии и нелинейной микроскопии», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.02 – биофизика

Проницаемость биологических тканей по отношению к химическим агентам и наночастицам имеет решающее значение для доставки вглубь ткани лекарственных и косметических препаратов. Диффузия иммерсионных агентов, уменьшающих рассеяние света в биоткани, позволяет увеличивать глубину зондирования при оптической диагностике биотканей, в частности, оптической когерентной томографии (ОКТ). Визуализация приповерхностных слоев тканей и органов с помощью ОКТ широко применяется не только в лабораторных исследованиях, но и в клинической практике. В связи с этим актуальность выбранной темы представляется очевидной. При этом необходимо подчеркнуть следующее. В отличие от многочисленных публикаций других авторов, предметом исследования Н.А. Труниной является не биоткань как таковая, а процессы, протекающие в ней в результате внешнего воздействия (аппликации иммерсионного агента, механического надавливания, фотодинамического эффекта). Другая специфическая черта работы заключается в том, что ОКТ используется не просто как способ визуализации биоткани с разрешением по глубине, а как источник первичных данных для получения количественной информации о коэффициентах проницаемости тканей и их оптических свойствах путем цифровой обработки ОКТ-изображений с расчетом усредненного ОКТ сигнала и определения временной зависимости его среднего наклона. Исследования, включающие обработку цифровых ОКТ-изображений, позволяющие извлечь количественные данные об оптических параметрах рассеивающей биоткани и ее морфологическом и функциональном состоянии, проводились и до того, но для ограниченного числа биотканей (кровь, склера

глаза, эпителий). Распространение данного подхода на другие биоткани (эмаль и дентин зуба, ткани ногтя, жировая ткань) - актуальная задача, решение которой важно для развития методов их неинвазивной диагностики.

Задачи, поставленные и решенные в диссертации Труниной Н.А., предмет и методы исследования, полученные результаты и выводы полностью соответствуют паспорту специальности 03.01.02 - биофизика (физико-математические науки).

Диссертация Н.А. Труниной состоит из введения, основной части, содержащей 6 разделов, заключения и списка цитируемой литературы, включающего 317 наименований. Диссертация содержит 45 рисунков и 3 таблицы, ее объем составляет 157 страниц.

В разделе 1 (Введение) обоснована актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследования, отмечены научная новизна и практическая значимость, личный вклад автора и достоверность полученных результатов, приведены положения, выносимые на защиту.

Разделы 2 и 3 имеют обзорный характер. Раздел 2 посвящен методам исследования, здесь приведены собранные из различных источников сведения об оптической когерентной томографии (ОКТ) и микроскопии на основе генерации второй гармоники света и флуоресценции, возбуждаемой двухфотонным поглощением. В разделе 3 описываются диффузия химических агентов иммерсионное оптическое просветление в биотканях. Приводятся литературные данные о строении зуба и использовании ОКТ для изучения его тканей. Описывается строение ногтя пальца человека и применение ОКТ для его исследования, а также строение жировой ткани и проблема разрушения адипоцитов.

С раздела 4 начинается изложение оригинальных исследований автора диссертации. Здесь описаны экспериментальные работы по ОКТ-мониторингу проникновения иммерсионных агентов в образцы зубной ткани *in vitro*. Наиболее важными достижениями автора нам представляется, во-первых, то, что методика определения среднего наклона сигнала ОКТ успешно применена

к новому достаточно сложному объекту - образцам дентина зуба человека. Во-вторых, очень важным представляется то, что конечный результат - коэффициент проницаемости агента - получается не из самого наклона, а из характерной постоянной времени его изменения. Если использование самого наклона связано с калибровкой сигнала ОКТ, то временные характеристики его изменения от калибровки не зависят, что повышает достоверность полученных результатов. Представляет интерес также свидетельство необратимых изменений дентина при длительном выдерживании в растворе глюкозы, которые проявляются в заметном повышении проницаемости образца по отношению к воде.

Наиболее интересной особенностью первой части раздела 5, посвященной ОКТ исследованию изменений, происходящих в тканях ногтя пальца человека под действием механического надавливания и аппликации иммерсионного агента (глицерина), является то, что здесь рассмотрен единственный объект *in vivo* в данной работе. Это одновременно и усложняет исследование, и повышает его ценность для возможных биомедицинских приложений. Приведенные данные убедительно свидетельствуют о том, что усредненный А-скан лучше позволяет выявить морфологические особенности слоистой ткани и изменения, вызванные внешним воздействием, чем само ОКТ-изображение. Несмотря на условный характер оцененных по локальному наклону сигнала ОКТ значений коэффициента ослабления, обнаруженные изменения этих значений при внешних воздействиях являются значимыми.

Вторая часть раздела 5 посвящена ОКТ-мониторингу процессов в образцах жировой ткани *in vitro* после окрашивания органическими красителями и/или фотовоздействия с помощью диодного лазера или диодной лампы. Уникальность этого исследования связана с тем, что данный объект позволяет наблюдать долговременные последствия фотодинамического воздействия на клеточном уровне. Результаты согласуются с имеющимися представлениями о последствиях фотодинамического воздействия на жировую ткань и могут быть полезными для более глубокого понимания механизмов гибели адипоцитов.

Раздел 6 содержит изложение теоретических работ автора. Хотя на ОКТ изображениях не видна тубулярная структура дентина, ее влияние на проницаемость дентина очевидна и подтверждается результатами раздела 4. Поэтому автор рассматривает простую трубчатую модель дентина и с ее помощью рассчитывает зависимость коэффициента проницаемости от среднего диаметра тубул и плотности их числа. Далее рассматривается другая задача - численное моделирование сигнала ОКТ в условиях диффузии иммерсионного агента, вызывающей оптическое просветление рассеивающей среды. Численное решение уравнения диффузии позволяет применять построенную модель к средам с произвольно заданной неоднородностью. Наиболее интересным результатом моделирования является демонстрация того, что влияние иммерсионного агента на сечение рассеяния назад, ответственное за возникновение сигнала ОКТ и его величину, может приводить к немонотонному ходу сигнала ОКТ.

Раздел 7 посвящен оптическому мониторингу проникновения наночастиц в образцы тканей зуба. Вначале автор предпринял попытку использовать для этой цели ОКТ. После длительного выдерживания образцов дентина и эмали, в суспензии частиц  $TiO_2$  с периодическим воздействием ультразвука действительно удалось обнаружить значимые изменения формы сигнала ОКТ. Однако, сделать на основании этих данных вывод о глубине проникновения частиц не представляется возможным из-за сильного многократного рассеяния. Поэтому дальнейшие исследования проводятся уже другим оптическим методом - с помощью нелинейной микроскопии, более высокое разрешение которой позволяет регистрировать сигналы от отдельных наночастиц или их кластеров. Наряду с  $TiO_2$ , исследовались наночастицы  $ZnO$ . В этой части работы следует отметить высокий уровень экспериментальной техники и применение весьма совершенной и современной аппаратуры на основе фемтосекундного лазера. С практической точки зрения важен вывод о том, что даже для специально подготовленных срезов дентина и при применении ультразвука частицы проникают в образец на небольшую глубину и в

незначительных количествах. При простой аппликации к эмали живого зуба вероятность проникновения наночастиц внутрь зуба будет еще меньше, поэтому нужен поиск способов увеличения этой вероятности.

В разделе 8 (заключении) представлены основные результаты и выводы. Выводы научно обоснованы, являются обобщением полученного экспериментального материала и правильно отражают результаты проделанной работы.

**Научная новизна** работы заключается в применении метода оценки коэффициента проницаемости по скорости изменения среднего наклона сигнала ОКТ к проникновению химических агентов (вода, глицерин, глюкоза) в образцы дентина, в оценках изменений ослабления света эпителиальными и фиброзными тканями под ногтем пальца человека, впервые полученных из ОКТ-изображений, в осуществленном впервые ОКТ-мониторинге долговременных (десятки и сотни минут) последствий совместного воздействия света и красителя на образцы жировой ткани на клеточном уровне. Модель формирования ОКТ сигнала позволила предсказать новый эффект немонотонности А-скана. Наконец, впервые обнаружены заметные изменения формы усредненного сигнала ОКТ после длительной ультразвуковой обработки образца дентина зуба человека, погруженного во взвесь наночастиц  $TiO_2$ , а глубина проникновения наночастиц  $TiO_2$  и  $ZnO$  в образцы дентина и эмали впервые определена методами нелинейной микроскопии.

Представленная работа имеет высокую **практическую значимость**, определяемую перспективами применения ее результатов в биологии и медицине.

По диссертационной работе имеются следующие **замечания**:

- 1) Обзорные разделы 2 и 3 несколько перегружены, как и список цитируемой литературы. Далеко не все цитируемые работы действительно используются, многие лишь перечисляются.

- 2) Описание методов исследования также содержит много лишнего, следовало бы более подробно остановиться на спектральной ОКТ, а не перечислять все разновидности, которые в работе не используются.
- 3) Незначительное число исследованных образцов тканей зуба не позволяет провести статистическую обработку результатов.
- 4) Интерпретация изменений, которые происходят в тканях ногтя при сдавливании и аппликации иммерсионного агента, дана на основании общих представлений о функционировании тканей и недостаточно привязана к тому, что видно на графиках.
- 5) Раздел, посвященный математическому моделированию, слабо связан с экспериментальными разделами работы. Заложенные в модели формирования ОКТ-сигнала в среде с диффузией возможности (неоднородность среды, учет геометрии пучка, учет многократного рассеяния) не реализованы в расчетах.
- 6) В ОКТ эксперименте при длительном выдерживании образца в суспензии наночастиц не исключена возможность того, что наблюдаемые изменения связаны не с наночастицами, а с влиянием растворителя. Эту неоднозначность можно было бы исключить, сравнивая сигналы после одинакового воздействия суспензии и чистого растворителя.

Указанные замечания не имеют принципиального характера и не снижают общей высокой оценки работы, представляющей собой завершённое научное исследование. Основные результаты доложены на международных и всероссийских научных и научно-технических конференциях, опубликованы в виде ряда статей в рецензируемых российских и международных научных журналах. Полученные результаты обладают научной новизной и достоверностью, выводы обоснованы. Ключевой личный вклад автора в данное исследование не вызывает сомнений. Автореферат и публикации автора полностью отражают содержание диссертации.

В целом, по своей актуальности, научной новизне и практической значимости представленная диссертация отвечает всем требованиям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г., № 842, и является научно-квалификационной работой, в которой решена задача оптического мониторинга проникновения химических агентов и наночастиц в образцы плотных сильно рассеивающих биотканей, имеющая важное значение для развития биофизики. Трунина Наталья Андреевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

15.12.2015

Официальный оппонент

Приязжев Александр Васильевич

кандидат физико-математических наук,

доцент кафедры общей физики и волновых процессов

Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ имени М.В. Ломоносова,

физический факультет, кафедра ОФ и ВП

Телефон: +7(495)939-2612

Факс: +7(495)939-3113

e-mail: [avp2@mail.ru](mailto:avp2@mail.ru)

Декан Физического факультета

МГУ имени М.В.Ломоносова

профессор



Н.Н. Сысоев