

Отзыв официального оппонента
о диссертационной работе ТРУНИНОЙ НАТАЛЬИ АНДРЕЕВНЫ
«Исследование проницаемости биологических тканей для
иммерсионных агентов и наночастиц методами оптической
когерентной томографии и нелинейной микроскопии»,
представленной на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук по специальности
03.01.02- биофизика

Диссертационная работа Труниной Натальи Андреевны «Исследование проницаемости биологических тканей для иммерсионных агентов и наночастиц методами оптической когерентной томографии и нелинейной микроскопии» имеет выраженный методологический характер. Различные виды оптической когерентной томографии и нелинейной микроскопии как неразрушающие методы нашли широкое применение в биомедицинских исследованиях. Расширение возможностей применения этих методов в диагностических целях для бесконтактного анализа твердых биологических тканей, которым посвящена рецензируемая работа, безусловно, актуально.

Диссертация Н.А. Труниной построена по тематическому плану. Рукопись объёмом 157 страниц включает краткое введение в проблему, основную часть, содержащую 6 разделов, 4 из которых посвящены собственным исследованиям автора (разделы 4–7). Диссертацию завершают заключение и список использованной литературы: 317 публикаций, включая авторские.

Работу предваряет список сокращений, многие из которых входят в список общепринятых для журналов физико-химического профиля, но есть и довольно редкие, например, ЛКСМ, обычно сокращаемое как КЛСМ и встречающееся в тексте 1 раз.

Во введении (раздел 1, 16 страниц) дается общая характеристика диссертации как квалификационной работы, включающая актуальность темы, цель и задачи работы, новые результаты, их теоретическое и практическое значение, личный вклад соискателя, публикацию и апробацию результатов диссертации, ее структуру и объем. Остановимся подробнее на этом разделе. Цель работы заявлена следующим образом: «изучить процессы доставки химических агентов и наночастиц в биоткани путем ОКТ-визуализации с цифровой обработкой изображений для количественного определения диффузионных и оптических свойств биотканей и их изменений под действием внешних факторов, а также с помощью нелинейной микроскопии. Основные объекты – образцы тканей зуба человека и жировой ткани *in vitro*, а также ткани ногтя пальца человека *in vivo*». Цель вполне конкретная и ясная. Замечу лишь, что определение «диффузионные свойства» более подходит к газам и жидкостям, нежели к твердым биологическим тканям.

Задачи исследования сформулированы четко и лаконично. Вопрос вызывает лишь то, *почему иммерсионные жидкости – вода, глицерин и глюкоза (имеются в виду водные растворы), – участвуя в чисто физических процессах – диффузии и просветлении, – называются химическими агентами, в то время как реальный химический агент – перекись водорода, используемая в химическом процессе отбеливания зубов, указана только в четвертой задаче теоретических расчетов? Предвосхищая ссылку на технические причины, хотелось бы узнать подробности.*

Оценивая научную и практическую значимость работы, можно констатировать, что у оппонента, в общем-то, нет сомнений в обоснованности заявленных положений, однако есть претензии к их формулировкам. Декларация того, что те или иные результаты впервые получены с помощью конкретного метода, правомерна лишь в том случае, когда достоверность результатов превосходит альтернативные либо другой альтернативы пока нет. Это относится ко всем пунктам научной новизны, кроме пятого и шестого, в которых указаны конкретные новые данные: «На основе численного решения уравнения диффузии и известной теории формирования ОКТ сигнала в рассеивающей среде с заданными параметрами построена математическая модель эволюции ОКТ сигнала в процессе диффузии иммерсионного агента. В отли-

чие от известных аналитических решений, модель применима к макроскопически неоднородным средам. Показано, что уменьшение сечения рассеяния назад при оптическом просветлении может приводить к немонотонному поведению сигнала ОКТ даже в макроскопически однородной среде <...> Впервые обнаружены заметные изменения формы усредненного сигнала ОКТ после длительной ультразвуковой обработки образца дентина зуба человека, погруженного во взвесь наночастиц TiO_2 ...».

В разделе 2 «МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ» приводятся общие сведения о методах исследования: оптической когерентной томографии, нелинейной микроскопии, в том числе микроскопии с использованием генерации второй гармоники и флуоресцентной микроскопии с двухфотонным возбуждением.

В разделе 3 «ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ» приведены также общие сведения об объектах исследования, к которым, в соответствии с рубрикацией раздела, относятся диффузия химических агентов в биотканях, просветление биотканей при диффузии иммерсионных агентов, строение тканей зуба, строение ногтя пальца человека и строение жировой ткани. Вопросы строения органов и тканей рассмотрены в диссертации в увязке с использованием ОКТ для их исследования, а также проблемой разрушения адипоцитов (основных клеток жировой ткани).

Эти два раздела являются по сути обзорными и нужны, по мнению автора диссертации, «для характеристики современного состояния исследований, близких к теме диссертации, а также для определения основных понятий, необходимых для понимания последующего изложения».

Раздел начинается с описания диффузии химических веществ в биотканях и вызванного ею изменения оптических параметров (оптического просветления). Приводятся известные сведения о строении и свойствах биотканей. Поскольку большая часть работы посвящена экспериментам с образцами дентина и эмали, наиболее подробно рассмотрено строение зуба и свойства образующих его тканей. Обзор литературы дает представление о современном состоянии исследований, направленных на применение ОКТ в стоматологии. Завершают раздел сведения о других тканях, в отдельных исследованиях с которыми автор использовал ОКТ.

После прочтения первых разделов диссертации остается не вполне ясным, какую именно диффузию предполагается исследовать, поскольку в твердом теле обычно выделяют объемную и поверхностную диффузию, а также диффузию по границам зерен (зернограничная диффузия), скорости которых существенно отличаются.

С раздела 4 «ОКТ МОНИТОРИНГ ДИФФУЗИИ ИММЕРСИОННЫХ АГЕНТОВ В ОБРАЗЦАХ ЗУБНОЙ ТКАНИ *IN VITRO*» начинается описание самостоятельных исследований автора. Здесь приводится описание экспериментов по ОКТ-мониторингу проникновения химических агентов (вода, глицерин, глюкоза) в образцы зубной ткани *in vitro*, включающее: подготовку образцов, описание экспериментальной установки, обработку полученных данных. Приводится модель формирования сигнала ОКТ. Далее следуют результаты измерений и их обсуждение: мониторинг проникновения воды и глицерина в ткани зуба методом ОКТ и исследование изменений дентина под действием глюкозы методом ОКТ.

Изложение материала четвертой главы вызывает ряд вопросов.

- Наталья Андреевна приводит формулировку «Если мало различие $\sigma_b(z)$ на глубинах z_2 и z_1 и/или достаточно велико Δz , то СНС ОКТ (1) позволяет определить средний коэффициент ослабления μ_t ... Каковы критерии выбора Δz ? Замечу, что обозначение $\sigma_b(z)$ в тексте не определено.
- Почему для определения проницаемости для глицерина и воды (таблица 4.1, в автореферате 1) выбраны разные образцы?
- На чем кроме ОКТ измерений основано предположение, что «увеличение проницаемости срезов дентина по отношению к воде связано с уплотнением тубулярного дентина и увеличением объема свободного пространства внутри тубул»? На мой взгляд, не менее правдоподобным выглядит предположение об увеличении доли поверхностной составляющей диффузии за счет увеличения гидрофильности дентина.

*В качестве замечания к разделу следует отметить, что утверждение: «Эксперимент можно рассматривать как попытку имитации условий, характерных для зубной ткани *in vivo* при нарушениях сахарного обмена» носит излишне предварительный характер, поскольку реальная концентрация «сахара» в крови не превышает 10 мМ при самых серьезных нарушениях. Это около 0,2%, что более чем на 2 порядка ниже испытанных концентраций.*

Пятый раздел «ОКТ ИЗМЕРЕНИЯ В ТКАНЯХ НОГТЯ *IN VIVO* И ОБРАЗЦАХ ЖИРОВОЙ ТКАНИ» посвящен ОКТ-исследованию изменений, вызванных внешними воздействиями, в других плотных тканях. Сначала описаны ОКТ-исследования *in vivo* тканей пальца человека, позволившие оценить коэффициент ослабления отдельных слоев и его изменения под действием иммерсии и механического сдавливания. Затем излагаются результаты экспериментов по ОКТ визуализации клеток жировой ткани человека в процессе долговременных изменений, вызванных комбинированным воздействием света и красителей, на основании которых «соавторами был выполнен статистический анализ распределения клеток по размерам и сделаны выводы о механизмах их разрушения». Позволю себе сделать замечание, носящее терминологический характер. В работе неоднократно утверждается, что ОКТ исследования проводятся на клеточном уровне. Клеточный уровень предполагает выявление структуры клетки. Уровень выявления распределения клеток по размерам считается **тканевым-органным**. Следующее замечание касается некритичного употребления термина «липолиз», имеющего, как минимум, два значения. Первое, это разрушение жировых клеток, второе – ферментативное расщепление жиров. Утверждение, что «Конечными продуктами липолиза клеток являются глицерин и вода [273]...», вероятно, следует считать опечаткой. Во всяком случае, упоминания о подобном механизме ферментативного гидролиза жиров в цитируемой работе *Yataguchi et al.* мной не обнаружено.

Теоретический раздел 6 «МОДЕЛЬНЫЕ РАСЧЕТЫ ПРОНИЦАЕМОСТИ ДЕНТИНА И ФОРМИРОВАНИЯ СИГНАЛА ОКТ В ПРОЦЕССЕ ОПТИЧЕСКОГО ПРОСВЕТЛЕНИЯ» содержит описание двух разных моделей. Вначале рассматривается простая модель тубулярной структуры дентина, на основе которой проведен расчет коэффициента проницаемости дентина в зависимости от диаметра и плотности числа тубул. Далее описана математическая модель, основанная на численном решении уравнения диффузии с последующим использованием известной теории формирования сигнала ОКТ в рассеивающей среде с заданными свойствами. В качестве нетривиального примера описан механизм формирования немоного А-скана в условиях, когда оптическое просветление влияет не только на коэффициент ослабления, но и на сечение рассеяния назад, определяющее полезный сигнал.

В качестве несущественного замечания к этой части работы можно привести пример излишне метонимичного выражения «проницаемость модели дентина по отношению к воде и перекиси водорода».

В седьмом разделе «ОПТИЧЕСКИЙ МОНТОРИНГ ПРОНИКНОВЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ В ОБРАЗЦЫ ЗУБНОЙ ТКАНИ *IN VITRO*» описываются эксперименты по оптическому мониторингу проникновения наночастиц в образцы зубной эмали и дентина. Вначале рассмотрены измерения, регистрируемые методом ОКТ-визуализации, а затем – с помощью нелинейной микроскопии с использованием флуоресценции с двухфотонным возбуждением.

Результатом проведенных исследований оказалась убедительная демонстрация глубины проникновения наночастиц в образцы зубных тканей. У оппонента к этой части работы есть только несколько вопросов методологического характера.

- *Чем обусловлено изменение условий обработки тканей суспензиями наночастиц при переходе от ОКТ исследований к нелинейной микроскопии, а именно, концентрации наночастиц и природы модифицирующего полимера?*
- *Как контролировали размер агрегатов наночастиц?*
- *Почему в окончательных предположениях не принимались в расчет форма наночастиц и способность к адгезии?*

В заключении (раздел 8) по утверждению автора обсуждаются итоги проделанной работы и перспективы ее продолжения. Выявление последнего аспекта показалось несколько проблематичным. Если «проникновение наночастиц в дентин и эмаль зуба человека исследовалось с целью последующего использования эффекта при восстановлении зубной ткани (гидроксиапатит) и косметическом отбеливании (двуокись титана), а внедрение частиц производилось из взвеси и стимулировалось ультразвуком, ... мониторинг осуществлялось по ОКТ изображениям», то что предлагается делать в будущем, в чем, собственно, перспектива?

Автореферат полностью отражает содержание и суть диссертации. Более того, в нем, в отличие от текста диссертации, в явном виде выражены результаты работы, оформленные маркированным списком (6 выводов), что делает возможным формальное сопоставление результатов с задачами исследования, позволяющее констатировать выполнение задач и достижение цели.

Работа в целом хорошо оформлена и иллюстрирована качественными рисунками, схемами и микрофотографиями. Однако встречаются некоторые разночтения.

- Рис. 7.4а,б следовало дать в одинаковом масштабе либо сделать врезку в рис. 7.4а с десятикратным увеличением. Не говоря о том, что сканирующая электронная микроскопия – не самый подходящий метод для гранулометрических измерений, можно заметить, что отсутствие сведений о режимах съемки и пробоподготовки делают приведенные изображения малоинформативными.
- Такого же рода замечание можно сделать относительно рис 4.1. Увеличение, указанное в подписи к рисунку 20× и 100× не соответствуют таковому в тексте (32) и масштабным линейкам (барам).

Оценивая грамотность текста, следует отметить, что работу существенно улучшила бы корректорская правка. Встречаются нарушения правил согласования, пропуски знаков препинания, союзов, букв в словах и целого слова («с двухфотонным» вместо «с двухфотонным возбуждением»). Как пожелание, можно напомнить, что при стандартной настройке не проверяется правописание в словах, набранных прописными буквами.

Больше всего претензий у оппонента к стилю изложения материала. Очевидно, что в такой междисциплинарной науке, как биофизика, невозможно обойтись без использования узкоспециальных терминов из разных отраслей знания. Однако Наталья Андреевна делает это, на мой взгляд, излишне свободно. Так, например, какой смысл вводить в заключении термин «мониторирование», если в тексте неоднократно использовался «мониторинг»? Термин «латеральный» (боковой), принятый в анатомии, имеет антоним – «медиальный» (срединный), а общенаучному термину «аксиальный» (осевой, продольный) соответствует антоним «радиальный, поперечный», поэтому в одном предложении не следует смешивать разные понятия. Некоторые понятия необходимо было расшифровать хотя бы в списке сокращений. Без таких пояснений очень трудно, особенно при первом прочтении, уловить физический смысл таких понятий, как «средний наклон А-скана» или «функция размеров тубул и плотности их числа». Эта функция отличается чем-либо от «пористости» – строго определенного термина, используемого для описания тепло- и массопереноса в гетерогенных системах, в том числе в работах, цитируемых в диссертации? Следует ли понимать, что «наклон» относится к графику зависимости аксиального сигнала от глубины сканируемого образца в логарифмических координатах, а смысл его – усредненное значение изменения интенсивности сигнала по глубине сканирования?

Оценивая диссертацию Н.А. Труниной в целом, можно заключить, что это оригинальное законченное научно-квалификационное исследование, в котором получены приоритетные данные о возможностях метода оптической когерентной томографии в изучении строения твердых биологических тканей и изменениях в них при пропитке биосовместимыми иммерсионными жидкостями – водными растворами глицерина и глюкозы. Поставленная диссертантом цель, несомненно, актуальна, а полученные результаты обладают высокой степенью научной новизны. Работа выполнена на высоком методическом и теоретическом уровне, достовер-

ность результатов не вызывает сомнения, а выводы автора полностью соответствуют результатам, полученным в ходе экспериментов. Результаты работы в достаточной степени представлены в автореферате. Основные результаты диссертационного исследования, полученные лично соискателем, опубликованы в шестнадцати статьях в престижных отечественных и международных журналах, включая 13 – в рецензируемых изданиях, удовлетворяющих требованиям пунктов 12 и 13 «Положения о присуждении ученых степеней», а именно: 11 статей в изданиях, включенных в систему цитирования SCOPUS, 1 статья в журнале, входящем в Перечень ВАК и включенном в SCOPUS, 1 статья в журнале, входящем в Перечень ВАК, а также доложены на двадцати научных конференциях в нашей стране и за рубежом.

Новые сведения, полученные в работе Н.А. Труниной, могут быть полезны в дальнейших исследованиях, направленных на создание новых типов оптических датчиков для определения содержания диагностически значимых субстанций в тканях, обладающих особо низкой прозрачностью в следствие своей гетерогенности.

Таким образом, диссертационная работа Н.А. Труниной «Исследование проницаемости биологических тканей для иммерсионных агентов и наночастиц методами оптической когерентной томографии и нелинейной микроскопии» по теоретическому уровню, объёму проведённых исследований, научной новизне и практической значимости соответствует критериям, предъявляемым к кандидатской диссертации «Положением о присуждении ученых степеней» (п. 9), утвержденным постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а автор работы, Трунина Наталья Андреевна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.02- биофизика.

Доктор биологических наук
ведущий научный сотрудник
лаборатории нанобиотехнологии
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института биохимии
и физиологии растений и микроорганизмов
Российской академии наук

Владимир Александрович Богатырев

410049, гор. Саратов, просп. Энтузиастов, 13.

Телефон: +7 (8452) 97-04-44.

Электронная почта: bog@ibppm.sgu.ru

6.01.2016

Подпись В.А. Богатырева «ЗАВЕРЯЮ»
Ученый секретарь ИБФРМ РАН, к.б.н.



Т.Е. Пылаев