

УТВЕРЖДАЮ

Проректор Саратовского государственного
медицинского университета
имени В.И. Разумовского по науч-
ной работе, д.м.н., профессор

Черненко Ю.В.

«30» 12 «2015»



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ 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.

Работа посвящена изучению процессов доставки химических агентов и наночастиц в биоткани с помощью оптических методов. Объектами экспериментального исследования были выбраны образцы тканей зуба человека и жировой ткани *in vitro*, а также ткани ногтя пальца человека *in vivo*. Количественное определение диффузионных и оптических свойств биотканей и их изменений под действием внешних факторов производилось по результатам визуализации объектов исследования методом оптической когерентной томографии (ОКТ) с последующей цифровой обработкой полученных изображений. Проникновение наночастиц в образцы дентина и эмали зуба человека контролировалось также с помощью нелинейной микроскопии (многофотонной томографии) на основе эффектов генерации второй гармоники света и флуоресценции, возбуждаемой двухфотонным поглощением.

Тема диссертации представляется актуальной по ряду причин. С одной стороны, последние десятилетия характеризуются бурным развитием оптических методов диагностики биологических объектов, в частности, ОКТ и нелинейной микроскопии. ОКТ обладает уникальным сочетанием таких свойств, как неинвазивность, достаточно высокое разрешение, относительная простота и невысокая стоимость и уже широко используется не только в лабораториях, но и в клинической практике. Нелинейная микроскопия - технически более сложный и дорогой метод, который появился позже ОКТ, но уже позволил получить ряд ярких результатов, благодаря значительно более высокому пространственному разрешению. Однако, отмеченное развитие и

внедрение оптической диагностики идет неравномерно. Если на офтальмологические применения ОКТ приходится около половины академических исследований и промышленных разработок, на втором месте идет визуализация сердечно-сосудистой системы и кожи то на другие области применения, включая стоматологию и эндоскопические исследования, приходится значительно меньше. Поэтому актуально расширение круга исследуемых объектов. Причем, в работе Н.А. Труниной особенно важно то, что исследуются не сами по себе биоткани, а процессы, протекающие в них при внешних воздействиях (аппликация иммерсионных жидкостей и суспензий наночастиц, механическое давление, фотодинамическое воздействие). Мониторинг процессов производится в реальном времени, что представляет собой весьма актуальную задачу.

С методической стороны актуальность работы Н.А. Труниной связана с тем обстоятельством, что множество работ, направленных на развитие оптической диагностики биологических объектов, используют ОКТ лишь как средство получения изображений, визуальная оценка которых позволяет говорить о состоянии биоткани, наличии или отсутствии патологических изменений и т.д. Именно таковы большинство применений ОКТ в стоматологии, где основной целью является именно визуализации самой биоткани и ее патологических изменений (кариеса). То же самое можно сказать о тканях ногтя, где для дифференциальной диагностики различных заболеваний представителями Нижегородской научной школы запатентован метод, основанный на распознавании визуальных ОКТ-признаков. Однако, как было показано в предшествующих работах В.В. Тучина, К. Ларина и др., из ОКТ изображений можно извлекать количественную информацию о параметрах биоткани, например, о коэффициенте ослабления света в среде. Этот подход был успешно апробирован, но на ограниченном примере биотканей (склера, кровь, кожа), так что его развитие и распространение на новые биоткани и новые параметры (коэффициент проницаемости) весьма актуально.

В диссертации получен ряд важных и новых результатов. Метод определения среднего наклона сигнала ОКТ, ранее использованный для оценки коэффициента ослабления света в среде, впервые применен для оценки скорости проникновения и коэффициента проницаемости оптически просветляющих химических агентов в образцы *in vitro* дентина зуба человека. По результатам компьютерной обработки цифровых ОКТ изображений впервые получены оценки коэффициентов ослабления света эпителиальными и фиброзными тканями под ногтем пальца человека *in vivo* и, что еще более важно, наглядно продемонстрированы их изменения при аппликации глицерина и механическом надавливании. Мониторинг изменений, происходящих спустя десятки минут после совместного воздействия света и красителя на образцы жировой ткани *in vitro* впервые осуществлен с помощью ОКТ с разрешением,

позволившим визуализировать отдельные адипоциты. Предложены две новые математические модели, одна из которых позволяет быстро оценить коэффициент проницаемости дентина по значениям диаметра тубул и средней плотности их числа, а другая симулирует формирование сигнала ОКТ в среде, где происходит диффузия просветляющего агента. С помощью этой модели теоретически впервые показано, что снижение сечения рассеяния назад при оптическом просветлении среды может качественно менять поведение ОКТ сигнала в ходе диффузии. Наконец, с помощью современного и высоко разрешающего метода нелинейной микроскопии впервые определена глубина проникновения наночастиц TiO_2 и ZnO в образцы дентина и эмали зуба человека.

Научная и практическая значимость работы заключается в расширении возможностей оптической диагностики биотканей как по объектам, так и по методам исследования. В частности, портативный оптический когерентный томограф Spectral Radar OCT, серийно производимый компанией Thorlabs, для визуализации биотканей *in vivo* в условиях медицинского учреждения, успешно применен для мониторинга в реальном времени оптических, диффузионных и морфологических характеристик биотканей при воздействии внешних факторов, включающих аппликацию иммерсионного агента, механическое сжатие, фотодинамическое воздействие. Данный прибор сравнительно доступен по цене и прост в эксплуатации, поэтому отработанная на исследованных в диссертации образцах методика определения коэффициентов проницаемости биотканей может найти широкое применение в исследовательских лабораториях научных и медицинских учреждений. Важной особенностью данного подхода является определение в конечном счете не самого наклона ОКТ сигнала, а скорости его изменения, что уменьшает необходимость тщательной калибровки прибора, упрощает методику и расширяет ее возможности для экспресс-анализа. На примере тканей ногтя человека убедительно показано, что с помощью ОКТ можно проводить не только визуализацию подобных биотканей *in vivo*, но и количественно определять относительные изменения оптических характеристик под действием просветляющего агента или механического сжатия, что расширяет сферу лабораторного (а в будущем - и клинического) применения ОКТ. Выполненные автором диссертации ОКТ исследования образцов жировой ткани человека уже были использованы для получения дополнительной информации о механизмах фотодинамического воздействия на жировую ткань, что важно для медицинских исследований, направленных на борьбу с ожирением. Предложенная в диссертации численная модель формирования сигнала ОКТ в среде, испытывающей оптическое просветление в результате диффузии иммерсионного агента, в отличие от известных аналитических решений уравнения диффузии, применима к неоднородным средам и может найти применение при планиро-

вании и интерпретации соответствующих экспериментов, в частности при решении обратной задачи восстановления распределений оптических и диффузионных параметров среды по данным ОКТ мониторинга. Практическое значение экспериментов автора по оптическому мониторингу проникновения наночастиц в образцы дентина и эмали зуба человека состоит, с одной стороны, в определении возможностей современных методов оптической диагностики для данной цели, а с другой стороны, показывают весьма низкую эффективность «спонтанного» внедрения наночастиц в дентин и, тем более, эмаль зуба при аппликации суспензии наночастиц TiO_2 и ZnO , даже в условиях тонкого среза *in vitro* и при УЗ стимуляции. Эти результаты стимулируют поиск дополнительных мер интенсификации процесса внедрения наночастиц с целью достижения медицинского или косметического эффекта в цельный зуб *in vivo*.

Дополнительным свидетельством высокой значимости диссертации для науки и практики является то, что работы по ее теме были поддержаны целым рядом персональных грантов, а также входили как составная часть в крупные международные и российские проекты, исполнителем которых Н.А.Трунина являлась в течение всего периода подготовки диссертации. Многие исследования выполнены в составе авторитетных международных коллабораций. Результаты диссертации обстоятельно апробированы на международных конференциях высокого уровня, а также отмечены рядом научных наград.

Результаты диссертации Н.А.Труниной могут быть рекомендованы для использования в практике дальнейших лабораторных исследований в таких учреждениях науки, как Институт Прикладной Физики РАН, Нижегородская государственная медицинская академия, ООО «Биомедицинские технологии» (г. Нижний Новгород), Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Минздрава РФ (г. Москва), Саратовский государственный университет имени Н.Г.Чернышевского, Саратовский государственный медицинский университет имени В.И.Разумовского (г. Саратов), а также в учебном процессе для включения в специальные курсы по оптической диагностике биотканей для студентов биофизических направлений.

По диссертации имеются следующие замечания:

1. На стр. 9 утверждается, что «доказана возможность использования серийного портативного оптического когерентного томографа ... для решения фундаментальной биофизической задачи - мониторинга оптических, диффузионных и морфологических характеристик дентина и эмали ... при воздействии внешних факторов (аппликация иммерсионного агента или взвеси наночастиц...)». Это излишне решительное утверждение не вполне согласуется с

Положением 4 (стр. 11), где говорится, что ОКТ данных о проникновении наночастиц в образцы «... недостаточно для оценки глубины проникновения, которая может быть завышена за счет многократного рассеяния...», что вполне соответствует содержанию раздела 7.1.

2. Автор совершенно прав, когда по результатам раздела 7.1 делает осторожные выводы о проникновении наночастиц TiO_2 , поскольку оценка глубины затруднена возможностью многократного рассеяния. Эту неопределенность можно было бы существенно уменьшить, если бы последующие эксперименты с применением нелинейной микроскопии были проведены на тех же образцах дентина. К сожалению, эта возможность была упущена.

3. Разработанные автором диссертации математические модели, описанные в разделе 6, недостаточно связаны с экспериментальной частью работы. Потенциал модели формирования сигнала ОКТ в условиях диффузии использован лишь в незначительной степени, так как рассмотрены только примеры макроскопически однородной среды.

4. В экспериментах по просветлению образцов дентина водой (раздел 4.3) недостаточное внимание при подготовке образцов уделено исходному содержанию воды в дентине. Образцы хранились в физиологическом растворе, а перед измерениями обдувались потоком горячего воздуха. Насколько при этом снижалось содержание воды в образце, количественно не определялось, а в данном случае это важно, так как просветление связано со смачиванием ткани зуба.

5. Размеры наночастиц, определенные с помощью электронной микроскопии, могут сильно отличаться от размера их агрегатов в суспензии. Автор отмечает этот факт, но не предпринимает попыток хотя бы качественно оценить размеры агрегатов. Мы, впрочем, осознаем, что данная проблема присутствует и во многих других работах в этой области.

Указанные недостатки не снижают высокую оценку уровня проведенного исследования и полученных результатов. По теме диссертации опубликовано 16 статей, из них 13 в рецензируемых изданиях, установленных Министерством образования и науки для публикации результатов диссертационных исследований. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Диссертация Н.А. Труниной «Исследование проницаемости биологических тканей для иммерсионных агентов и наночастиц методами оптической когерентной томографии и нелинейной микроскопии» является законченной научно-квалификационной работой, которая соответствует специальности 03.01.02 - биофизика (физико-математические науки). Диссертация удовлетворяет требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней»,

утвержденного Постановление Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г., а ее автор, Наталья Андреевна Трунина, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.02 - биофизика.

Диссертация Н.А. Труниной обсуждена и отзыв на нее рассмотрен и одобрен на заседании кафедры медбиофизики СГМУ 24 декабря 2015 г., протокол № 3

Зав. кафедрой медбиофизики Саратовского государственного медицинского университета имени В.И. Разумовского, кандидат физ.-мат. наук, доцент



В.А. Дубровский

Адрес: Большая Казачья ул., 112, Саратов, Саратовская обл., 410012

Телефон: (845-2)-27-33-70, (845-2)-51-15-32

Факс: (845-2)-51-15-34

Сайт: www.sgmru.ru

E-mail: meduniv@sgmu.ru