

О Т З Ы В

официального оппонента В.П.Захарова на диссертационную работу Тучиной Дарьи Кирилловны «Исследование диффузии химических агентов в биологических тканях оптическими методами в норме и при модельном диабете», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.02 – биофизика

Разработка технологий оптического просветления биотканей является основой развития качественно новых биомедицинских систем визуализации, обеспечивающих высокое разрешение и качество оптического изображения на достаточно большой глубине за счет нивелирования неоднородностей коэффициента оптического преломления биоткани при замещении внутриклеточной жидкости биосовместимыми иммерсионными агентами. Следует отметить, что эффективность просветления во многом определяется скоростью диффузии химических агентов, которая, в свою очередь, зависит от структуры ткани. Патологические процессы могут приводить к существенному изменению структуры биоткани, особенно при изменении степени гликирования, характерного для больных диабетом. Следовательно, изменение скорости диффузии может быть связано со степенью гликированности биоткани и использовано как диагностический маркер заболевания. Другой важной проблемой в биомедицинской визуализации (микроскопии высокого разрешения, оптической томографии) является корректный подбор иммерсионных химических агентов и методики их применения. Именно достижению этих целей посвящена диссертационная работа Д.К.Тучиной, что определяет ее несомненную **актуальность**.

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, списка использованных источников из 276 наименований, изложенных на 121 странице, содержит 25 рисунков и 23 таблицы. По теме диссертации автором опубликованы 17 научных работ, из которых 8 в реферируемых изданиях.

Во введении обоснована актуальность темы, изложены цель и задачи исследований, дана общая характеристика работы, показана научная новизна полученных результатов, сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе автором проведен детальный анализ структуры и оптических свойств кожи и сердечной мышечной ткани, полученных с использованием различных физических методов исследования. Рассмотрены принципы оптического просветления биотканей, включая детальный анализ каждого из слоев кожи. Особое внимание уделено анализу влияния продуктов гликирования на оптические характеристики тканей, что позволило автору обосновать задачи и методы исследования диабетически измененных тканей, причин и последствий развития диабета. На основании данного обоснования во второй главе Д.К.Тучиной вводится основной формализм описания диффузии химических агентов в биоткани, изменения их плотности, а

также обосновываются экспериментальные методы определения геометрических параметров образцов исследуемой биоткани, коэффициентов коллимированного пропускания, степени оптического просветления. Коэффициенты диффузии восстанавливались на основании измерений кинетики коллимированного пропускания и математической модели, использующий алгоритм моделирования коэффициентов поглощения и рассеяния биоткани в присутствии оптических просветляющих агентов. Интересным представляется сравнительный детальный анализ действия различных гиперосмотических химических агентов *in vitro*, *ex vivo*, проведенных по единой методике. Д.К.Тучиной экспериментально получены коэффициенты пропускания в сердечной мышце *in vitro* и кожи крысы *ex vivo* для растворов глюкозы и глицерина различной концентрации, полиэтиленгликоля разной молекулярной массы и йогексола, на основании которых получены коэффициенты диффузии данных химических агентов. Из анализа кинетики измеренных величин оценено характерное время диффузии агентов в коже и миокарде. Д.К.Тучиной показано, что в отличие от полиэтиленгликоля использование 40%-раствора глюкозы и 60%-раствора глицерина приводит к набуханию ткани.

В главах 3 и 4 диссертационной работы развитый формализм применен к анализу изменения коэффициентов диффузии глюкозы и глицерина в нативной и диабетической коже и сердечной ткани *ex vivo*. Установлен рост эффективности оптического просветления при увеличении концентрации раствора глюкозы при одновременном увеличении характерного времени просветления. Подтверждено, что кинетика диффузии экзогенного агента в различных тканях зависит от соотношения слабосвязанной воды и воды, связанной с белком. Установлено, что изменения в коэффициентах диффузии наблюдаются уже на ранней стадии развития патологии, когда продукты гликирования еще не изменили оптических макросвойств ткани. Важным экспериментально подтвержденным автором результатом является одинаковая тенденция уменьшения скорости диффузии химического агента в миокарде и коже животных с модельным аллоксановым диабетом по сравнению со здоровыми особями.

Однако, наиболее интересно применение развиваемого автором подхода для исследования диффузии химических агентов в коже человека *in vivo*. С этой целью Д.К.Тучина модифицирована методика определения коэффициента диффузии по кинетике коэффициента ослабления света, экспериментально измеряемого с помощью оптической когерентной томографии. Сравнительное исследование различных агентов показало, что наиболее эффективное оптическое просветление наблюдается для водно-спиртового раствора фруктозы, в то время как самую высокую скорость диффузии имеет глюкоза. Добавление ДМСО в раствор глицерина также повышает эффективность просветления ткани. Данный эффект, также как и добавление спирта в раствор фруктозы, автор объясняет механизмом

разрушения липидного слоя эпидермиса кожи, открывающего доступ иммерсионного агента в дерму.

В целом можно констатировать, что к наиболее значимым результатам диссертационной работы Д.К.Тучиной, определяющей ее **новизну, научную и практическую значимость**, относятся развитие методики определения коэффициентов диффузии химических агентов *ex vivo* в биологических тканях, основанной на измерении коллимированного пропускания с последующей математической обработкой, учитывающей изменение показателя преломления компонентов ткани, вызванных диффузией агента, вытеснением воды и набуханием. Развитый подход позволил автору получить коэффициенты диффузии различных химических агентов в сердечной мышце свиньи и коже крысы, а также провести подробные исследования изменения условий диффузии при развитии модельного диабета. Не менее значимым результатом являются экспериментально установленные с помощью оптического томографа коэффициенты диффузии многокомпонентных химических агентов разной концентрации в коже человека, позволившие детально описать процесс просветления кожи *in vivo*, подобрать наиболее приемлемые характеристики иммерсионных агентов.

Особое внимание хотелось бы обратить на подробность проведенного анализа использования предложенного метода для определения коэффициентов диффузии химических агентов в тканях и оптимизации характеристик агентов для обеспечения эффективного просветления, кинетики изменения данного процесса и его зависимости от степени гликирования. Это позволяет сделать однозначный вывод о **достоверности** полученных результатов исследований. Каждое научное положение и выводы диссертационной работы Д.К.Тучиной подкрепляются обширными экспериментальными исследованиями. Это позволяет сделать вывод о высокой степени **обоснованности** выносимых на защиту научных положений.

Разработанные методы позволили автору предложить ряд новых схем диагностики диабета, основанных на обнаруженной связи скорости диффузии химических агентов в ткани со степенью ее гликированности. А экспериментально зарегистрированная корреляция в изменениях в коэффициентах диффузии кожи и миокарда открывает возможности мониторинга патологических нарушений при лечении сахарного диабета по изменению эффективности просветления покровных тканей, что показывает высокую **практическую значимость** диссертационной работы.

К сожалению, диссертационная работа Д.К.Тучиной содержит ряд недостатков:

1. Автором используются одинаковые обозначения и термин «эффективность просветления» для определения степени изменения коэффициента интегрального пропускания (формула

(6)), и удельной эффективности просветления, определенной как изменение коэффициента рассеяния (формула (7)). Это затрудняет чтение диссертации и понимание тех или иных выводов автора. Кроме того, более корректно вводить удельную степень пропускания с учетом не только коэффициента рассеяния, но и коэффициента поглощения, т.к. несмотря на многократность рассеяния в исследуемых биотканях, изменения в коэффициенте поглощения могут быть того же порядка, как и изменения в коэффициенте рассеяния при замещении воды химическим агентом.

2. При определении коэффициентов диффузии в коже *ex vivo* автор использовал как экспериментальные значения пропускания на разных длинах волн, так и данные об изменении геометрических параметров ткани: веса, толщины и плотности образца. Поскольку в естественных условиях граница образца упруго-связанна с биотканью, не подвергшейся воздействию химических агентов, а при проведении *ex vivo* экспериментов граница образца была свободна, то возникает вопрос каким образом результаты *ex vivo* экспериментов могут быть экстраполированы на ткани, находящиеся в нативном состоянии. Не будет ли упругая связь на границе нивелировать значения коэффициентов диффузии, полученных *ex vivo*?
3. Приведенные в главе 3 результаты исследований кинетики весовых и геометрических параметров образцов нативной и диабетической кожи в иммерсионном растворе глюкозы демонстрируют определенную нелинейность по концентрации раствора химического агента, автор обращает внимание на специфичность экспериментальных результатов при концентрации 43%, однако не дает этому факту должного объяснения.
4. При определении коэффициентов диффузии гиперосмотических химических агентов в коже *in vivo* автор использует экспоненциальную зависимость коэффициента ослабления μ_t от глубины и модель полубесконечной среды. Однако, зона поверхностного ввода химического агента ограничена в поперечном направлении, что предопределяет как латеральную, так и продольную диффузию агентов, соотношение скоростей которых может определяться многими факторами, включая структуру и ориентацию коллагеновых волокон. С моей точки зрения данный фактор надо было оценить, прежде чем «сбрасывать» априорно со счета вклад от данных процессов и их влияние на приведенные значения восстановленных коэффициентов диффузии.
5. В тексте присутствуют жаргонизмы. Например, «неотраженный свет проникает внутрь биоткани... поглощается по причине вариации показателя преломления» на стр 10, «увеличение содержания коллагена» на стр.22, «кинетика изменения толщины» на стр.43, «количество экспериментальных точек кинетики изменения коэффициент ослабления света» на странице 93 и ряд других неудачных выражений.

Характеризуя диссертацию Д.К.Тучиной следует отметить следующее. Диссертация имеет четкую структуру, написана понятным и грамотным литературным языком, хорошо оформлена. Основные положения, результаты и выводы в ней сформулированы корректно и правильно отражают оригинальные результаты, полученные в исследованиях Д.К.Тучиной. Опубликованные по теме научные работы Д.К.Тучиной известны исследователям, специализирующимся в области биофотоники и биофизики. По совокупности полученных результатов и выводов диссертационная работа является законченным научным исследованием. Автореферат диссертации с достаточной полнотой отражает ее содержание.

Оценивая диссертационную работу Д.К.Тучиной в целом, можно сделать вывод, что она отвечает всем требованиям пунктов 9 - 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.02 «Биофизика».

17 ноября 2016 года

Заведующий кафедрой лазерных и биотехнических систем
ФГАОУ ВО "Самарский национальный исследовательский
университет имени академика С.П. Королева"
д.ф.-м.н., профессор



В.П.Захаров

443086 Россия, г.Самара, Московское шоссе 34
Тел. 8-(846)-267-4550
E-Mail: zakharov@ssau.ru

Подпись профессора Захарова В.П. подтверждаю



Ученый секретарь Самарского университета
Кузьмичев В.С.