

О Т З Ы В

официального оппонента В.П. Захарова на диссертационную работу Гениной Элины Алексеевны «Управление оптическими свойствами биологических тканей», представленную на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 03.01.02 – биофизика

Нынешний век характеризуется бурным развитием биомедицинских технологий, основанных на технических новациях в различных областях знаний, прорывными достижениями инженерии, позволяющими создать высокоэффективные диагностические системы. Одним из важных направлений является разработка средств биомедицинской визуализации, обеспечивающих диагностику на клеточном уровне. Такое разрешение фактически обеспечивается только в оптическом диапазоне спектра излучения. Это предопределило создание таких методов и устройств как оптические когерентные томографы, флуоресцентные эндоскопы, лазерные микроскопы, оптико-акустические сканаторы и т.д. Однако, достижение высокого разрешения изображения нивелируется относительно небольшой глубиной проникновения оптического излучения в биоткань, которая является многократно рассеивающей и поглощающей средой.

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 управления оптическими свойствами биотканей, в частности, нивелирования неоднородностей коэффициента оптического преломления биоткани при замещении внутриклеточной жидкости биосовместимыми иммерсионными агентами. Не менее важным для отработки технологии просветления является детальное изучение механизмов взаимодействия химических агентов с биотканью, динамики изменения ее свойств, способа введения иммерсионных агентов в ткани, формирование депо лекарственных препаратов с помощью фракционной лазерной микроабляции кожи при использовании в качестве носителей микро- и наночастиц. Следует отметить, что эффективность просветления во многом определяется проницаемостью эпидермиса, скоростью диффузии химических агентов. Управление данными процессами с помощью комбинации физико-химических методов воздействия, введения наночастиц для повышения оптического контраста несомненно является актуальной проблемой, решению которой и посвящена диссертационная работа Э.А. Гениной.

Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения, пяти приложений и списка использованных источников из 986 наименований, изложена на 388 странице, содержит 110 рисунков и 14 таблиц. По теме диссертации опубликовано 55 научных работ, в том числе 37

научных статей, включённых в перечень рекомендованных ВАК, и входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science и Scopus.

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 обзор литературных данных по методам и способам управления оптическими характеристикам различных биологических тканей (склеры, кожи, твердой мозговой оболочки, кости, слизистой и т.д.): за счёт замены внутритканевой жидкости иммерсионным агентом, повышения концентрации белков и мукополисахаридов во внутритканевой жидкости, уплотнения рассеивающих центров, механической компрессии, использования металлических наночастиц и т.д. Особое внимание уделено детальному анализу изменения оптических параметров биологической ткани при технологическом процессе ее иммерсионного просветления с использованием различных химических агентов, а также увеличения контраста с помощью микро- и наночастиц. Это позволило автору убедительно обосновать задачи и методы собственного исследования, нацеленные на повышение скорости диффузии через эпидермальный барьер, применение мультимодальных подходов доставки агентов, исследования механизмов эффективного фотодинамического и фототермического воздействия на патологические объекты.

На основании проведенного анализа во второй главе Э.А. Гениной вводится основной формализм описания иммерсионного просветления, проводится *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* изучение его стадий для различных оптических просветляющих агентов: растворов глюкозы, глицерина, пропиленгликоля, полиэтиленгликолей. Показано, что изменение оптических свойств биоткани обусловлено двумя разнонаправленными процессами: выравниванием показателя преломления коллагеновых волокон и внутритканевой жидкости, приводящему к снижению светорассеяния, и набуханием биоткани, увеличивающае светорассеяние. Это позволило автору диссертации детально исследовать кинетику процессов и установить оптимальное время воздействия иммерсионной жидкости на биоткань, при котором достигается максимально возможная степень оптического просветления. Исследована спектральная зависимость изменения коэффициентов отражения и пропускания в процессе просветления, скоростей дегидратации и замещения воды иммерсионным агентом. Хотелось бы обратить внимание на убедительную доказательную базу полученных результатов, в том числе уникальный метод визуального контроля диффузии агентов в биологической ткани с помощью ОКТ. На основе данных измерений автором введены критерии и предложена методика определения эффективности оптического просветления. Не менее важным результатом исследования Э.А. Гениной является найденные режимы

просветления костной ткани с использованием глицерина и пропиленгликоля. Практически важным результатом является исследование зависимости эффективности оптического просветления от технологии введения иммерсионного гиперосмотического агента в ткани. Установлено, что при инъекционном введении процесс просветления происходит значительно быстрее, но наблюдается постепенный выход иммерсионного агента из области наблюдения, сопровождающийся гемостазом. Интересным представляется сравнительный детальный анализ повышения контраста визуализации сосудов печени, проведенный в главе 3 по единой методике для наночастиц диоксида титана и золота различной конфигурации и диаметра. Е.А. Гениной экспериментально получено повышение контраста в 5 раз на глубине 500 мкм при увеличении общей глубины визуализации до 800 мкм при специализированной ультразвуковой обработке.

В главах 4 и 5 диссертационной работы, развитый формализм применен к анализу повышения контрастности за счет использования биосовместимых красителей, а также изучению механизмов доставки фотосенсибилизаторов, иммерсионных агентов и наночастиц в кожу *in vivo* с помощью химических энхансеров. Несомненным достижением автора диссертации является установление изменений спектров поглощения красителей в дерме (в частности, смещения до 40 нм максимума спектра поглощения), агрегатирование красителя при использовании растворов глицерина. Э.А. Гениной впервые были получены данные о транспорте красителей в слизистых оболочках, что позволило предложить новые методики фототерапии гайморита и гингивита. Автор диссертации приложил большие усилия для выяснения влияния на процесс просветления гидратации рогового слоя, а также типа используемого раствора на скорость диффузии красителей и время окрашивания исследуемого образца ткани. Мультиmodalный подход к проблеме позволил автору предложить метод физико-химического усиления трансдермального транспорта иммерсионного раствора за счет комбинация ДМСО и ультразвукофореза. Показано, что применение физико-химических воздействий увеличивает эффективность просветления на треть. Однако, если при патологических изменениях кожи, связанных с повреждением защитного барьера, достаточно использование только ультразвукового воздействия, то при отсутствии нарушения рогового слоя эпидермиса внедрение наночастиц в дерму неэффективно.

В качестве средства повышения проницаемости кожи для лекарств автором диссертации рассматривается фракционная оптотермическая микроабляция кожи, результаты исследований которой представлены в главе 6 диссертации. В принципе, данный подход известен, но Э.А. Гениной была предложена оригинальная методика, включающая лазерную микроабляцию, воздействие ультразвуком. Ей также впервые предложено использование ударной волны для внедрения наночастиц в кожу. Данный подход позволяет создать в коже человека депо наночастиц на глубинах до 400 нм при использовании эрбиевого лазера с энергией в импульсе 3

Дж. Автором установлено, что абляция рогового слоя эпидермиса снижает эффективность оптического просветления кожи иммерсионными агентами сразу после абляции по сравнению с просветлением без абляции за счёт притока к месту повреждения внутритканевой жидкости и лимфы. Немаловажное практическое значение имеют длительные *in vivo* наблюдения, позволившие наряду с динамикой просветления выяснить механизмы вывода внедренных наночастиц.

В целом можно констатировать, что к наиболее значимым результатам диссертационной работы Э.А. Гениной, определяющей ее **новизну и научную значимость**, относятся развитие методики определения коэффициентов диффузии химических агентов в биологических тканях, детальное теоретическое и экспериментальное изучение механизмов взаимодействия иммерсионных агентов с мышечной и соединительной тканями *in vitro* и *in vivo*, включая взаимодействие с макромолекулами коллагена, вторичную гидратацию и т.д. Развитый подход позволил автору установить критерии и найти оптимальные времена воздействия иммерсионной жидкости на биоткань, при котором достигается максимально возможная степень оптического просветления. Большой фактический материал по изменению оптических характеристик различных биотканей в присутствии иммерсионных химических агентов и фотосенсибилизаторов, способов их ввода дал возможность Э.А. Гениной сформулировать **практически** значимые критерии и рекомендации. К последним можно отнести: увеличение в 2.4 раза глубины детектирования скелетной мышцы под действием 40%-ного раствора глюкозы; мультимодальный безинъекционный метод введения иммерсионных оптических агентов в кожу; увеличение контраста ОКТ-изображения сосудов печени в 1.5 раза через 24 часа после внутривенного введения суспензии золотых наночастиц; скорость диффузии метиленового синего и индоцианинового зелёного через эпидермальный барьер; метод доставки нано- и микрочастиц в глубокие слои дермы и создание там долговременного депо с помощью фракционной лазерной микроабляции.

Особое внимание хотелось бы обратить на подробность и всесторонность проведенного анализа оптического просветления биотканей, адресной доставки фотосенсибилизаторов и металлических наночастиц, огромную накопленную базу экспериментальных данных по коэффициентам поглощения, рассеяния, скоростям диффузии агентов и гидратации различных тканей. Это позволяет сделать однозначный вывод о **достоверности** полученных результатов исследований. Каждое научное положение и выводы диссертационной работы Э.А. Гениной подкрепляются обширными экспериментальными исследованиями. Это позволяет сделать вывод о высокой степени **обоснованности** выносимых на защиту научных положений.

Тем не менее, диссертационная работа Э.А. Гениной содержит ряд недостатков:

1. Автором для оценки эффективности оптического просветления наряду с глубинами зондирования и детектирования использовался контраст получаемого изображения, который определялся на странице 97 диссертации формулой (2.4) как относительная разность между максимальной и минимальной амплитудами усредненного ОКТ сигнала. При этом автором указывается, что усреднение амплитуды проводилось по 10 А-сканам, однако не указывается разброс в экспериментальных данных. С моей точки зрения, для определения контраста было бы более правильным проводить не усреднение амплитуд, а непосредственно значений контраста, рассчитанного для каждого А-скана. Это должно давать меньшую погрешность в определении значения контраста.
2. При определении эффективности просветления биоткани автор использовал экспериментально полученные данные о дегидратации и набухании, в связи с чем автор скрупулезно приводит данные о толщинах образцов в различных *ex vivo* и *in vitro* экспериментах. Вместе с тем, на указанные характеристики могут влиять краевые эффекты (свободная торцевая граница образца), т.е. измеренные величины могут зависеть от размера используемых в экспериментах образцов. Из материалов диссертации не понятно исследовался ли данный вопрос и какова его степень влияния на результаты, в частности, погрешности измерения эффективности просветления.
3. Для увеличения глубины проникновения металлических наночастиц в сосуды печени автором применялась ультразвуковая установка с плотностью мощности $1,5 \text{ Вт/см}^2$ и частотой 1 МГц, однако обоснований выбора именно указанных частот не проведено.
4. Большой разброс в значениях экспериментально измеренного коэффициента диффузии красителя МС, приведенных на странице 163 диссертации, автор объясняет разбросом оптических параметров исходных образцов. Однако, исходный разброс параметров не приведен. Вместе с тем, данные экспериментальных измерений (рис. 4.4 диссертации) также имеют существенные отличия в спектрах оптической плотности, которая к тому же существенно меняется во времени. Было бы более корректным провести сравнение данных эффектов.
5. Исследование применения мультимодального подхода к усилению проникновения иммерсионных агентов и наночастиц в коже (глава 5) проводилась на 8 группах животных с ограниченным количеством животных в каждой группе. Не понятно какую долю в приводимом разбросе экспериментальных данных составляет статистический разброс параметров.

6. На рисунке 6.7 (страница 203 диссертации) представлены временные зависимости усредненного коэффициента рассеяния по данным ОКТ-исследования. Не понятно с чем связана существенная вариация разброса измеренных параметров в разные моменты времени.

Характеризуя диссертацию Э.А. Гениной следует отметить следующее. Диссертация имеет четкую структуру, написана понятным литературным языком, хорошо оформлена. Основные положения, результаты и выводы сформулированы корректно и правильно отражают оригинальные результаты, полученные в исследованиях Э.А. Гениной.

Опубликованные по теме научные работы Э.А. Гениной известны исследователям, специализирующимся в области биомедицинской оптики и биофизики.

По совокупности полученных результатов и выводов диссертационная работа является законченным научным исследованием, в котором решена крупная научная проблема – создана технология управления оптическим просветлением соединительных и мышечных тканей, эпидермиса и слизистой оболочки на основании новых фундаментальных знаний о механизмах воздействия иммерсионных жидкостей, красителей, наночастиц и фотосенсибилизаторов с биотканью. Автореферат с достаточной полнотой отражает ее содержание.

Оценивая диссертационную работу Э.А. Гениной 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 доктора физико-математических наук по специальности 03.01.02 «Биофизика».



4 октября 2017 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
В.С. Кузьмичев