

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Швачкиной Марины Евгеньевны «Исследование влияния оптического иммерсионного просветления на фотосшивание коллагена тканей», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.02 - Биофизика

**Актуальность темы диссертации.** Диссертационная работа Швачкиной Марины Евгеньевны посвящена решению задачи совершенствования техники рибофлавин/УФ фотосшивания (кросслинкинга) коллагенсодержащих тканей. В работе исследуются возможности применения этой техники к сильно рассеивающим биологическим тканям, таким как склера, и оценивается потенциал использования метода иммерсионного просветления ткани как этапа подготовки биоткани к фотосшиванию. Техника рибофлавин/УФ кросслинкинга успешно применяется в офтальмологии для улучшения биомеханических свойств роговицы глаза. Увеличение прочности тканей роговицы в данном случае происходит за счет увеличения количества химических связей (сшивок) между молекулами коллагена посредством рибофлавин-УФ-индуцируемых фотохимических реакций. В настоящее время метод рибофлавин/УФ кросслинкинга, в его применении к склере, рассматривается как возможный метод лечения прогрессирующей близорукости, одной из причин которой является снижение биомеханической прочности склеральной ткани. Серьезным осложняющим фактором при применении рибофлавин/УФ фотосшивания к склере является сильное рассеяние света в ткани. Сильное рассеяние приводит к резкому уменьшению интенсивности УФ излучения при его распространении вглубь ткани, что ограничивает область образования сшивок только слоями склеры, расположенными вблизи ее внешней поверхности. Основной целью данной диссертационной работы явилось изучение возможностей использования перед облучением склеры при рибофлавин/УФ фотосшивании оптического иммерсионного просветления ткани с целью уменьшить рассеяние света в склере и тем самым увеличить глубину проникновения УФ излучения в ткань. Тема работы и рассмотренный круг проблем, безусловно, являются **актуальными** и представляют значительный научный и практический интерес.

**Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов.**

Научные положения, сформулированные автором диссертационной работы, полностью обоснованы, достоверны, логически вытекают из результатов проведенного исследования и полноценно их отражают. В

работе использовались соответствующие поставленным целям и задачам научно обоснованные методы. Достоверность экспериментальных результатов не вызывает сомнения.

**Научная новизна.** В диссертационной работе впервые экспериментально выявлена тенденция к большему увеличению жесткости образца склеры при проведении рибофлавин/УФ фотосшивания в условиях предварительного иммерсионного просветления ткани. Впервые для контроля ориентации коллагеновых волокон в несекционированных образцах склеры применена методика поляризационного картографирования в сочетании с иммерсионным просветлением. Впервые показано, что применение иммерсионного просветления позволяет увеличить интенсивность протекания фотохимических реакций, сопровождающих фотосшивание. Разработана методика оценки относительной концентрации рибофлавина в строме склеры, основанная на декомпозиции функций затухания флуоресценции по эмпирическим базисным функциям. Разработана оригинальная ОКТ-методика оценки содержания воды в ткани, основанная на измерении среднего группового показателя преломления ткани. Также оригинальными являются методики ОКТ-контроля содержания воды и иммерсионного агента в коллагеновых пучках при их иммерсионном просветлении и последующей регидратации и оценки изменения содержания воды в фибриллах и межфибриллярной фазе при дегидратации и регидратации ткани. Впервые показано, что рибофлавин/УФ фотосшивание ткани в дегидратированном состоянии может приводить к уменьшению объема ткани после ее регидратации по сравнению с нативным, также проведена оценка порогового значения степени гидратации, при котором наблюдается фиксирование контрактированного состояния ткани.

**Структура и содержание работы.** Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, приложения и списка использованных источников из 250 наименований, изложена на 194 страницах.

**Первая глава** диссертационной работы является обзорной. Первая часть этой главы на основе литературных данных дает читателю представление о химическом составе, строении и механических свойствах склеры, об изменениях структуры склеры при миопии, а также о составе и строении сухожильных пучков (ряд важных экспериментов в данной работе был проделан на сухожильных пучках). Далее дается достаточно подробный обзор работ по применению рибофлавин/УФ кросслинкинга коллагена для укрепления роговицы и склеры. После этого рассматриваются работы по исследованию оптического просветления склеры *in vitro* и возможности применения этого метода *in vivo*.

В начале **второй главы** представляются результаты проведенных автором экспериментов по оценке эффективности применения различных

просветляющих агентов для увеличения прозрачности тканей склеры в ультрафиолетовой области. Эти эксперименты показали, что из рассмотренного набора иммерсионных агентов наибольшее увеличение прозрачности склеры в спектральной области фотовоздействия при рибофлавин/УФ фотосшивании (360-380 нм) достигается при использовании 85% раствора глицерина. Именно этот иммерсионный агент использовался в экспериментах по фотосшиванию, описанных в последующих разделах этой главы. В этих экспериментах было проведено сравнение механических свойств образцов склеры, подвергнутых рибофлавин/УФ фотосшиванию без предварительного иммерсионного просветления и с просветлением. Сравнение полученных значений модуля Юнга образцов при малом относительном удлинении показало, что фотосшивание с иммерсионным просветлением приводит в среднем к большему увеличению жесткости склеры, чем фотосшивание без просветления. В то же время отмечен большой разброс данных, полученных для разных образцов, подвергавшихся одинаковой обработке. На основе литературных данных высказано предположение, что такой разброс может быть связан с различием в ориентационной упорядоченности коллагеновых волокон в образцах и разным содержанием воды в них. В работе сделан вывод, что для более точной оценки эффекта предварительного оптического просветления необходимо иметь представление об ориентационной упорядоченности коллагеновой структуры в образцах и проводить мониторинг содержания воды в них в ходе эксперимента.

В **третьей главе** представлены результаты исследований изменений, происходящих в склере на разных стадиях процесса фотосшивания, проведенных с помощью мультифотонного томографа в режимах регистрации сигнала генерации второй гармоники и двухфотонной флуоресценции. Наиболее интересные результаты были получены при использовании режима регистрации двухфотонной флуоресценции с временным разрешением (FLIM). На основе анализа очень большого объема полученных экспериментальных данных были выявлены особенности флуоресценции эндогенных составляющих склеры, позволяющие в экспериментах с образцами ткани, пропитанных рибофлавином, выделять вклад флуоресценции рибофлавина на фоне флуоресценции эндогенных составляющих ткани. На этой основе был разработан оригинальный метод оценки относительного содержания рибофлавина в ткани и его пространственного распределения. С помощью этого метода экспериментально показано, что для образцов склеры, подвергавшихся УФ-обработке в условиях оптического просветления, УФ-обработка приводила к резкому уменьшению содержания рибофлавина в ткани за счет его химических превращений под действием УФ-излучения, чего не

наблюдалось в случае фотосшивания без просветления. Несомненно, это указывает на то, что иммерсионное оптическое просветление способно значительно увеличить интенсивность протекания процесса фотосшивания в толще стромы склеры. Таким образом, экспериментальные результаты, представленные в главах 2 и 3, позволяют считать обоснованным утверждение о возможности повышения эффективности рибофлавин/УФ фотосшивания путем предварительного иммерсионного просветления ткани.

Большая часть **четвертой главы** посвящена методам мониторинга состояния коллагенсодержащих тканей с помощью оптической когерентной томографии (ОКТ) в экспериментах, связанных с иммерсионным просветлением тканей, их дегидратацией и регидратацией. Также в этой главе представляются результаты исследования взаимодействия с коллагеновыми волокнами различных иммерсионных агентов (водных растворов глицерина, глюкозы, пропиленгликоля, полиэтиленгликоля, Омнипак), дающих четкое представление об особенностях взаимодействия этих агентов с тканью и делающих ясной картину изменения содержания воды и иммерсионного агента в ткани во времени. Эти результаты представляются очень важными в контексте основной темы диссертации, поскольку позволяют судить о химическом составе ткани в зависимости от времени контакта ткани с иммерсионным агентом и взаимном расположении коллагеновых фибрилл во время фотосшивания (это использовано в экспериментах главы 5). Разработанная методика исследования взаимодействия иммерсионных агентов с коллагеновыми пучками представляет значительный интерес и вне контекста темы данной диссертации, как и предложенная методика оценки содержания воды в коллагенсодержащих тканях. Следует особо отметить представленные в работе экспериментальные доказательства линейности зависимости среднего показателя преломления коллагенсодержащих тканей от объемного содержания воды в ткани в широком диапазоне значений содержания воды, включающем физиологический диапазон. Это очень важный результат, поскольку предположение о линейности этой зависимости при анализе свойств коллагенсодержащих тканей используется часто, а прямого экспериментального доказательства его применимости для таких тканей в литературе не было. Автором такое доказательство представлено. Проведенные эксперименты позволили автору найти коэффициенты приближенной формулы для расчёта содержания воды в ткани по величине среднего группового показателя преломления ткани на длине волны 930 нм.

**В пятой главе** экспериментально определены условия рибофлавин/УФ фотосшивания, при которых фотосшивание способно приводить к увеличению плотности коллагенсодержащей ткани. Показано, что это может происходить, когда фотосшивание осуществляется при столь низком

содержании воды в ткани, что коллагеновые фибриллы плотно соприкасаются между собой. Это повышает вероятность образования межфибриллярных сшивок. Представленные данные убеждают в справедливости сделанного автором заключения о том, что именно образование межфибриллярных сшивок является основной причиной наблюдаемого эффекта фиксирования контрактированного состояния.

Весьма ценными кажутся и выработанные автором рекомендации по выбору иммерсионного агента при поляризационном картировании параметров ориентационной упорядоченности коллагеновой структуры в образцах, представленные в Приложении.

В целом диссертация производит хорошее впечатление, содержит новые научные результаты и представляется законченным научным исследованием.

Основные результаты диссертации опубликованы в 13 научных трудах, в том числе: 7 статьях в изданиях, входящих в список ВАК, или зарубежных журналах, индексируемых библиографическими базами «Web of Science» и «Scopus». Полученные результаты докладывались на международных и российских конференциях. Публикации и автореферат достаточно полно отражают содержание диссертации. Диссертация, автореферат, количество опубликованных по теме диссертации печатных работ соответствуют требованиям ВАК, предъявленным к кандидатским диссертациям.

### **Замечания к диссертационной работе**

1. В главе 2 не указано, как измерялась толщина образцов, и не приведены оценки степени однородности толщины образца по его площади.

2. Не всем рассматриваемым иммерсионным агентам дана оценка в плане их безопасности при применении *in vivo*.

3. На графиках, представленных рисунках 2.7 и 2.8, не подписаны оси ординат.

4. В главе 4 не приведены схемы (или хотя бы фотографии) используемых экспериментальных установок.

5. Уделено мало внимания способу первичной обработки исходных ОКТ-данных в главе 4. В частности, не указан используемый способ определения смещения границ на ОКТ-изображениях.

6. Результаты картирования морфологии склеры, на мой взгляд, было бы более уместным привести в основном тексте диссертации, а не в приложении.

Указанные замечания не являются существенными при общей положительной оценке данного исследования и не снижают ценности выполненной автором работы.

**Заключение.** Диссертационная работа Швачкиной Марины Евгеньевны «Исследование влияния оптического иммерсионного просветления на фотосшивание коллагена тканей» отвечает всем требованиям пунктов 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, Швачкина Марина Евгеньевна, заслуживает присуждения степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика.

Официальный оппонент:  
кандидат физико-  
математических наук,  
доцент кафедры  
«Системотехника и управление в  
технических системах»  
СГТУ имени Гагарина Ю.А.

Ушакова Ольга Валерьевна

28.12.2020

Адрес места работы и контактные данные: 410054, г. Саратов, ул. Политехническая, 77, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.» (СГТУ имени Гагарина Ю.А.), Институт электронной техники и приборостроения, кафедра «Системотехника и управление в технических системах». Тел. 8-917-210-31-30

e-mail: [s\\_sov@rambler.ru](mailto:s_sov@rambler.ru)

Подпись к.ф.-м.н., доцента О.В. Ушаковой заверяю.

Ученый секретарь Ученого совета  
СГТУ имени Гагарина Ю.А.  
доктор культурологии, профессор



Н.В. Тищенко