

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В. И.
Разумовского Минздрава России
к.м.н., доцент А.С. Федонников



ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической ценности диссертационной работы
Швачкиной Марины Евгеньевны «Исследование влияния оптического иммерсионного
просветления на фотосшивание коллагена тканей», представленной к защите на соискание
ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности
03.01.02 - Биофизика

Актуальность избранной темы

Диссертационная работа **Швачкиной М. Е.** посвящена исследованию возможностей повышения эффективности метода рибофлавин/УФ фотосшивания ткани при его применении для увеличения механической прочности склеры. В настоящее время этот метод широко используется в клинической практике для коррекции свойств роговицы глаза при кератоконусе. Интерес к этому методу в приложении к склере связан с поиском безопасных методов укрепления склеры при лечении прогрессирующей миопии. Одной из причин прогрессирующей миопии является ослабление и растяжение склеры, что приводит к увеличению размера глазного яблока под воздействием внутриглазного давления, что способствует непрерывному развитию близорукости. Фотосшивание склерального коллагена, как предполагается, способно повысить жесткость склеры, способствуя замедлению развития патологического процесса при прогрессирующей миопии. Одной из проблем, связанных с применением рибофлавин/УФ фотосшивания к склере, является быстрое уменьшение интенсивности ультрафиолетового излучения при его распространении в нативной склере из-за сильного рассеяния света в ткани, в результате чего подверженными фотосшиванию оказываются только приповерхностные слои склеры. Одним из возможных способов увеличения глубины проникновения оптического излучения в ткань при фотосшивании склеры с целью повышения эффективности этой процедуры является метод иммерсионного оптического просветления ткани. В связи с этим тема диссертации, а ее цель сформулирована как "изучение влияния предварительного иммерсионного просветления на результаты процедуры рибофлавин/УФ фотосшивания коллагенсодержащих тканей", представляется актуальной.

Новизна исследования и полученных результатов

В данной диссертационной работе

- впервые экспериментально выявлена тенденция к большему увеличению жесткости склеры при проведении рибофлавин/УФ фотосшивания в условиях предварительного иммерсионного просветления ткани;
- впервые показано, что применение иммерсионного просветления позволяет увеличить интенсивность протекания фотохимических реакций, сопровождающих фотосшивание;
- впервые показано, что рибофлавин/УФ фотосшивание ткани в дегидратированном состоянии может приводить к уменьшению объема ткани после ее регидратации по сравнению с нативным и оценено пороговое значение степени гидратации, при котором наблюдается фиксирование контрактированного состояния ткани;
- разработана оригинальная методика оценки относительной концентрации рибофлавина в строме склеры, основанная на декомпозиции функций затухания флуоресценции по эмпирическим базисным функциям;
- разработана оригинальная методика оценки содержания воды в ткани, основанная на измерении среднего группового показателя преломления ткани с помощью оптической когерентной томографии (ОКТ);
- разработаны оригинальные методики ОКТ-контроля содержания воды и иммерсионного агента в коллагеновых пучках при их иммерсионном просветлении и последующей регидратации, а также оценки изменения содержания воды в фибриллах и межфибриллярной фазе при дегидратации и регидратации ткани.

Теоретическая и практическая значимость результатов диссертации

Экспериментальные результаты, полученные **М.Е. Швачкиной**, дополняют знания о процессах, происходящих при рибофлавин/УФ фотосшивании коллагенсодержащих тканей и взаимодействии коллагенсодержащих тканей с различными иммерсионными агентами. Усилиями автора существенно расширен набор экспериментальных методов, которые могут быть эффективно использованы для изучения коллагенсодержащих тканей и процессов, происходящих в них при их оптическом просветлении и фотосшивании.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

Достоверность научных положений, результатов и выводов подтверждена экспериментально на большом объеме полученных данных. Интерпретация результатов измерений основана на фундаментальных физических принципах и ее корректность не вызывает сомнения. Полученные результаты не противоречат известным по литературе

научным данным. Положения, вынесенные на защиту, в полной мере обоснованы результатами работы.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом

Диссертация **Швачкиной М.Е.** состоит из введения, пяти глав, заключения, приложения, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 194 страницах, включая приложение и список литературы, состоящий из 250 ссылок. Работа проиллюстрирована 76 рисунками и 2 таблицами.

Во **введении** обоснованы актуальность выполненных исследований, цели и задачи работы, представлены положения, выносимые на защиту, указано, в чем состоит научная новизна и практическая значимость работы.

Глава 1 представляет собой обзор литературы. В ней перечислены структурно-морфологические особенности коллагенсодержащих тканей, рассматриваемых в данной работе (склера, роговица и сухожилие), дан обзор известных способов применения кросслинкинга коллагена для укрепления роговицы. Отмечены работы, исследующие возможности применения данного метода для модификации механических свойств склеры. Также представлен обзор работ, посвященных исследованию изменений оптических свойств склеры под действием иммерсионных просветляющих агентов.

В **главе 2** представлены результаты оценочных оптических и биомеханических измерений, направленных на изучение влияния предварительного иммерсионного просветления ткани на эффективность рибофлавин/УФ фотосшивания. В первом разделе представлены результаты оценки степени увеличения коллимированного пропускания склеры кролика в диапазоне длин волн 360-370 нм под действием различных иммерсионных агентов. Показано, что из рассмотренных иммерсионных агентов наибольшее просветляющее действие на склеру в УФ области оказывал 85% раствор глицерина, на основании чего этот просветляющий агент был использован в биомеханических исследованиях, представленных в последующих разделах данной главы. Показано, что само по себе иммерсионное просветление в растворе глицерина с последующей регидратацией в физиологическом растворе в течение суток не приводит к изменению механической жесткости склеры. В следующих разделах представлены результаты измерений, показывающие, что рибофлавин/УФ фотосшивание склеры в просветленном состоянии приводит к большему увеличению жесткости по сравнению с обычным рибофлавин/УФ фотосшиванием.

В **главе 3** представлены результаты исследования возможностей применения для мониторинга изменений, происходящих в ткани на разных стадиях процесса фотосшивания, нелинейной микроскопии в режимах регистрации сигнала генерации

второй гармоники и двухфотонной флуоресценции с временным разрешением (FLIM). Было установлено, что для приповерхностных областей стромы в условиях двухфотонного возбуждения флуоресценции излучением с длиной волны 760 нм функции затухания флуоресценции склеры в нативном состоянии могут сильно различаться в зависимости от локализации зондируемого участка, однако, средние нормированные функции затухания флуоресценции (НФЗФ), полученные усреднением по нескольким участкам на одной глубине, приблизительно одинаковы для разных глубин и разных образцов. Это дало основание сделать вывод о том, что в среднем по площади на глубинах до 80 мкм исследуемая ткань является почти однородной по содержанию эндогенных флуорофоров. С использованием этого обстоятельства был разработан и апробирован метод оценки вклада флуоресценции рибофлавина и флуоресцирующих продуктов фотолиза рибофлавина в регистрируемый сигнал флуоресценции склеры в процессе ее фотосшивания, основанный на декомпозиции функции затухания флуоресценции по эмпирическим базисным функциям, соответствующим различным компонентам системы. Показано, что иммерсионное оптическое просветление склеры способно значительно увеличить интенсивность протекания процесса фотосшивания склеры и тем самым позволяет увеличить количество образующихся фотосшивков.

В **главе 4** представлена разработанная ОКТ-методика оценки содержания воды в ткани, основанная на измерении среднего группового показателя преломления ткани, которая может быть применена для мониторинга состояния коллагенсодержащих тканей с высоким содержанием коллагена I, как в склере при их дегидратации и регидратации. В главе также представлены результаты экспериментального исследования взаимодействия различных иммерсионных агентов с коллагенсодержащими тканями, полученные с помощью той же ОКТ-методики. Также в главе 4 представлены полученные с помощью той же методики оценки распределение воды в фибриллах и в межфибриллярном пространстве в коллагеновых пучках при изменении содержания воды в ткани.

В **главе 5** представлены экспериментальные результаты, показывающие, что фотосшивание ткани в дегидратированном состоянии может приводить к уменьшению объема ткани после ее регидратации по сравнению с нативным, то есть к фиксации контрактированного состояния ткани (КСТ). На образцах вторичных сухожильных пучков показано, что уменьшение объема ткани, происходящее в результате дегидратации ткани под действием иммерсионных агентов, может быть зафиксировано, если фотосшивание осуществляется при уровнях объемной гидратации ткани меньше 0,8.

В **приложении** представлен метод поляризационного картографирования коллагенсодержащих тканей, таких как склера, выявлены условия, при которых

поляризационное картографирование способно обеспечить достаточно точные оценки параметров ориентации коллагеновых волокон в толстых (до 2 мм толщиной) образцах.

В **заключении** сформулированы основные результаты и выводы, полученные в ходе выполнения диссертационной работы.

Автореферат диссертации **М.Е. Швачкиной** полностью соответствует содержанию диссертационной работы и оформлен в соответствии с предъявляемыми требованиями. Выводы, представленные в автореферате, полностью соответствуют выводам, приведенным в диссертации.

Характеристика публикаций по теме диссертации.

Работы, опубликованные по теме диссертации, полностью отражают ее основное содержание. По материалам диссертационной работы опубликовано 13 работ, из которых 7 статей – в изданиях, входящих в перечень ВАК или включенных в базу данных SCOPUS, 6 статей – в трудах всероссийских и международных конференций.

Замечания диссертационной работе:

- Не указано, чем мотивирован выбор иммерсионных агентов в экспериментах, описанных в главе 2.
- Не сказано, почему в экспериментах главы 3 фотосшивание проводилось в состоянии минимального объема ткани.
- Не указано, как выбиралась область усреднения при расчете средней интенсивности по данным SHG.
- В тексте не определен параметр $R_{ост}$, присутствующий на рисунке А.4 в приложении.
- Отсутствуют списки сокращений и обозначений, наличие которых значительно бы упростило чтение текста.
- В работе имеется некоторое количество опечаток, например, на странице 2 "является" вместо "является", на странице 45 "глицеринас" вместо "глицерина с".

Однако, данные замечания не снижают общую положительную оценку диссертации.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты работы могут быть основой для дальнейших исследований, направленных на разработку более совершенных протоколов рибофлавин/УФ фотосшивания и химического сшивания склеры и других коллагенсодержащих тканей. Разработанная методика FLIM-мониторинга концентрации флуоресцирующих экзогенных агентов в ткани может быть широко использована в фармакокинетических исследованиях. Особую ценность этой методике придает то, что она может быть использована *in vivo*. Разработанные ОКТ-методики мониторинга содержания воды и иммерсионных агентов в коллагенсодержащих

тканях могут быть широко использованы при исследовании динамики воздействия различных иммерсионных агентов и других экзогенных веществ на такие биоткани. Выработанные рекомендации по подготовке образцов для проведения поляризационного картирования ориентации коллагеновых волокон в толстых образцах ткани, будут полезны при изучении биомеханики соединительных тканей, в исследованиях, требующих характеристики макроструктуры коллагенового матрикса таких тканей, как склера, дерма, сухожилие, хрящ и т.п. Разработанные методики измерений могут быть очень полезны в учебном процессе, будучи реализованными в лабораторных работах.

Заключение

С учетом актуальности работы, ее научной новизны и практической значимости считаю, что диссертация **Швачкиной Марины Евгеньевны** «Исследование влияния оптического иммерсионного просветления на фотосшивание коллагена тканей» полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук (п. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.), а её автор, **Швачкина Марина Евгеньевна**, заслуживает присуждения степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика.

Диссертация и отзыв обсуждены и одобрены на заседании кафедры медицинской и биологической физики имени профессора Д.В. Зернова ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России (Протокол №5 от 10.12.2020 года).

Заведующий кафедрой медицинской и биологической физики имени профессора Д.В. Зернова
ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского,
кандидат физико-математических наук
(научная специальность 01.04.05 – Оптика), доцент

Дубровский Валерий Александрович

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации.
410012, Приволжский федеральный округ, Саратовская область, г. Саратов, ул. Большая Казачья, 112. E-mail: meduniv@sgmu.ru Телефон: +7(845-2)-27-33-70

Подпись к.ф.-м.н. Дубровского В.А. заверяю:
Ученый Секретарь ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ
им. В.И. Разумовского Минздрава России
д.м.н., доцент

Т.Е. Липатова