

## 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

В медицинских технологиях физические методы начинают занимать доминирующее место и в настоящее время активно развиваются направления медицинской биофизики, связанные с созданием и внедрением современных клинических технологий, основанных на воздействии физических факторов с одной стороны и диагностических методов, основанных на новейших физических разработках, с другой.

В свете таких представлений работа Швачкиной М.Е. поставлена и выполнена, с одной стороны, для оптимизации и научного обоснования технологии стабилизации коллагенсодержащих материалов и с другой стороны, для неинвазивной оптической диагностики состояния коллагенсодержащих тканей, в том числе в процессе стабилизации. **Цель работы** сформулирована достаточно четко как изучение влияния предварительного иммерсионного просветления на результаты процедуры рибофлавин/УФ фотосшивания коллагенсодержащих тканей. Сшивание коллагенового волокна под действием УФ излучения в присутствии рибофлавина как сенсibilизатора является одним из самых перспективных способов образования поперечных сшивок поскольку, во-первых, протекает без участия химических цитотоксичных агентов, и, во-вторых, достаточно мягкое в том смысле, что само количество сшивок недостаточно для увеличения жесткости ткани сверх меры. Метод применяется в клинической практике для укрепления прозрачно ткани роговицы при кератоконусе. Недостатком этого метода для его применения к остальным соединительным тканям является недостаточная глубина проникновения излучения в ткань, в частности из-за сильного рассеяния. Впервые предложенный в диссертации подход, связанный с одновременным применением оптического просветления в присутствии иммерсионного агента плотного коллагенсодержащего материала и его укрепления

за счет фотосшивания оказался весьма продуктивным. В этом смысле **актуальность, новизна и практическая ценность** работы Швачкиной М.Е. не вызывает сомнений.

Представление диссертационной работы не совсем обычно. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, глав, в которых экспериментально доказаны эффективность метода упрочнения склеры при комплексном применении оптического просветления и рибофлавин/УФ фотосшивания коллагена и увеличение интенсивности протекания первичных фотохимических реакций в условиях просветления материала, далее следует методическая глава, в которой предложен способ определения содержания воды на основе зависимости показателя преломления во вторичном коллагеновом пучке от состава межфибриллярной жидкости. В последней главе основного текста проведено экспериментальное доказательство уменьшения объема облученной зоны после конечной регидратации ткани. Далее следует заключение и два объемных приложения. В первом приложении приведены не вошедшие в основной текст таблицы и рисунки, причем относящиеся как к литературному обзору, так и экспериментальным частям. Во втором приложении рассматривается возможность определения параметров коллагеновой структуры в толстых образцах с помощью поляризационного картографирования. В конце работы приводится список цитируемой литературы, включающего 250 наименований. Список сокращений отсутствует.

Анализ *обзора литературы*, выполненного автором, показывает достаточно глубокую и осмысленную проработку существующих к настоящему времени данных о составе и коллагеновой структуре склеры, ее изменении при миопии, а также составе и структуре сухожилий, вторичные пучки которых которые использовались в работе в качестве модельных объектов. Кроме того, проведен анализ природы стабилизирующих сшивок, обсуждается совокупность реакций, приводящих к образованию сшивок между макромолекулами коллагена при УФ воздействии в присутствии сенсibilизатора рибофлавина. При том рассматривается два варианта для первичной фотохимической реакцией — в первом варианте является образование синглетного кислорода с последующим окислением С-Н связей белка, второй предусматривает и непосредственное взаимодействие возбужденного рибофлавина с белком, образованием радикалов и их рекомбинации. Рассматривая последовательность преобразования для самого рибофлавина, автор замечает, что, в отличие от классических сенсibilизаторов,

рибофлавин претерпевает химические изменения, восстанавливаясь до лейкофлавина. Этот факт автор использует в своей работе для регистрации степени протекания совокупности фотохимических реакций. В заключении литературного обзора рассматриваются принципы оптического просветления тканей и отмечается, что исследования оптического просветления склеры в ультрафиолетовой спектральной области практически не проводилось.

Отдельной Главы, посвященной материалам, методам методикам нет, что существенно усложняет анализ основных результатов работы.

В Главе 2 в показано, что коэффициенты коллимированного пропускания на длине волны 370 нм в склере кролика при их просветлении возрастает от практически 0 до почти 15% если использовать 85% раствор глицерина, что дает все основания для объемного сшивания коллагенового волокна в ткани. В этой же главе представлен самый важный, на мой взгляд, результат работы — доказано, что оптическое просветление действительно приводит к увеличению механической прочности ткани, а увеличение механической прочности является прямым следствием увеличения числа поперечных сшивок в системе коллагеновых волокон. Достаточная статистическая выборка обеспечивает достоверность полученных данных. Важно, что авторы сначала доказывают, что изменение механической характеристики определялось именно обработкой УФ образцов в присутствии рибофлавина, но не дегидратацией-регидратацией. Следует отметить, что модуль Юнга в экспериментальных образцах возрастает почти на 40%, что является очень хорошим показателем — с одной стороны материал стабилизируется, с другой — не становится слишком жестким. Таким образом, именно в Главе 2 показано, что декларируемая цель работы достигнута. Именно здесь реализована новая идея комбинации оптического просветления и УФ облучения в присутствии рибофлавина для стабилизации объектов значительной толщины.

В Главе 3 представлены результаты исследования изменений ткани склеры в ходе УФ/рибофлавин воздействия методом нелинейной оптической микроскопии с регистрацией генерации второй гармоники (ГВГ) и двухфотонной флюоресценции (ДФФ). Анализ ГВГ микрофотографий не выявил нарушений морфологии образцов, что отличает этот метод сшивания волокон коллагена от сшивания химическими агентами, после которого наблюдаются серьезные искажения волокнистых структур. К сожалению, автор не акцентирует этого отличия, выглядящего как преимущество предложенного в диссертации подхода. А вот на основе анализа

данных ДФФ с временным разрешением автору удалось сделать очень интересную и важную оценку относительного содержания рибофлавина в ткани на заданной глубине в ходе УФ/рибофлавин воздействия. Показано, что после просветления в результате фотохимического превращения рибофлавина его относительная концентрация уменьшается в два раза, в то время как без просветления изменений в концентрации не выявлено. Для того, чтоб сделать это заключение, диссертант создал достаточно разумную модель расчета нормированной функций затухания флуоресценции с учетом влияния эндогенных и экзогенных флуорофоров. В результате сравнения рассчитанных и экспериментальных данных удалось получить относительного содержания рибофлавина в ткани и его распределение по глубине образца. Отмечу, что расчетная модель выглядит обоснованной, кроме того для получения коэффициентов автор провел тщательные предварительные эксперименты. Глава 4. В этой части представлена оригинальная методика оценки содержания воды ткани, основанная на измерении среднего группового показателя преломления ткани с помощью оптической когерентной томографии. Интересным в этой части следует признать методику мониторинга характеристик коллагенового волокна с помощью ОКТ. Весьма оригинальный и тщательно продуманный анализ изменений ОКТ образов при дегидратации и регидратации ткани позволил автору сделать весьма надежное заключение об изменении распределения воды между фибриллами и интерстициальной жидкостью в этих процессах.

Основная часть конкретных замечаний относится именно к этой главе. На мой взгляд, совершенно нелогично представлять ее в результатах, а не создать главу «Материалы и методы». Сама методика

- применима только *in vitro* и только для вторичного пучка;
- включает значительное число переходов и приближений от измеряемой величины (относительного смещение точки изображения верхней поверхности предметного стекла) до оценки содержания в ткани воды и иммерсионного агента при наличии. В связи с этим вводится огромное количество вспомогательных расчетных величин, трудно отличимых друг от друга (например  $k_s$  - коэффициент изменения объема пучка и  $k_{ss}$  - стандартный коэффициент изменения объема).

Второе весьма затрудняет понять логику достижения конечной цели и оценить важность промежуточных и конечного результата. Например, рисунки 4.11 и 4.16 иллюстрируют, что в различных иммерсионных агентах уровень дегидратации ткани и количество иммерсионного агента на этапе быстрой дегидратации зависит

от природы агента (глицерин, ПЭГ и Омнипак). Анализ этого явления и выводы о преимуществах того или иного агента сделаны не были.

Кроме того, все многочисленные пояснения не исключают возможность недопонимания принципа расчета конкретных значений. Так, в таблице 4.1 (стр. 103) даны объемные содержания воды и иммерсионного агента в сухожильных пучках в момент достижения минимального объема. Простейший пересчет показывает, что % массовое содержание глицерина и глюкозы в ткани больше, чем в исходной жидкости. Лишь при чтении раздела 4.3.4 (стр. 111) можно найти косвенные рассуждения, из которых можно понять, что речь идет об объемном содержании не агента, а иммерсионной жидкости.

Таким образом, результаты, представленные в Главе 4 кажутся лишь промежуточными для экспериментальных доказательств, представленных в Главе 5 для факта уменьшения объема всей совокупности - коллагеновый каркас-вода после последовательной обработки просветление-УФ/рибофлавин облучение-регидратация. В заключение в диссертации высказаны предположения о том, что в связи с уменьшением межфибрилярного расстояния возможно образование сшивок между макромолекулами коллагена, расположенных в соседних фибриллах. Как предположение этот тезис имеет право на существование.

По мнению автора конечное фиксирование контрактированного состояния ткани является дополнительным доказательством сшивания коллагенового волокна. Действительно, экспериментаторы, исследовавшие сшивание коллагена химическими агентами отмечают уменьшение объема гидратированной ткани. Однако это уменьшение является вторичным, косвенным признаком и корреляций между количеством сшивок и уменьшением объема не установлены. Утверждение авторов о количественной связи между уменьшением объема (весьма незначительным) и стабильностью коллагенового материала мне не кажется обоснованно доказанным, а лишь разумным предположением. Общее замечание к Главам 4 и 5 (частично к главе 3) связаны с представлением материала как отдельных исследований. 1) В литературном обзоре нет ни основ, ни обзора основных результатов исследования коллагенсодержащих тканей используемыми методами нелинейной микроскопии и оптической когерентной томографии. А таких данных в литературных источниках очень много. Соответственно диссертант не сравнивает свои результаты с результатами других исследователей. Например,

анализ структуры коллагенового каркаса склеры (микроскопия ГВГ), коэффициент двулучепреломления сухожилия (ОКТ), его можно сравнить со значением  $\Delta n$ , полученным с помощью поляризационно-чувствительной ОКТ. Данные близки и это могло бы подтвердить предложенную методику определения  $\Delta n$ . 2) Из-за отсутствия общей Главы «Материалы и методы», в Главах 3-5 диссертант вынужден несколько страниц посвящать материалам и методам. Еще раз подчеркну, что это сильно затрудняет вычленение главной идеи диссертации — особенности механизма образования сшивок коллагенового волокна при малом содержании воды и в присутствии просветляющего агента. Если в литературном обзоре обсуждаются 2 типа последовательных химических реакций, приводящих к образованию сшивок, то в тексте диссертации рассуждений о механизме нет даже в качестве предположений.

Общие замечания к диссертации в целом:

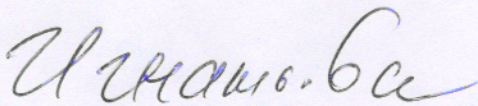
1. Небрежное отношение к представлению материалов: рисунки и их описание могут быть разделены 2-3 страницами. Отсутствие списка сокращений.
2. Не совсем корректна выбрана актуальность темы как обоснование методики увеличения эффективности нанесения иммерсионных агентов на склеру перед процедурой фотосшивания. В литературном обзоре есть ссылка на работы контакта такого агента со склерой *in vivo*. В работах [5,172,173] на склеру наносили раствор глюкозы констатировали раздражение склеры. В работе [174] глицерин вводили путем инъекций. Отмечу, что 1) на фотографиях, представленных в работе отчетливо видны обширные области кровоизлияния и 2) время, за которое оптические свойства восстанавливаются после инъекции (8 мин) существенно меньше времени воздействия УФ (20 минут). Эти факты ставят под сомнение возможность просветления тканей глаза *in vivo*.

Все это, однако, ничуть не умаляет **научной новизны работы** заключающейся в успешной комбинации оптического просветления и УФ/рибофлавин воздействия для многократного увеличения эффективности стабилизации коллагеновых образцов значительной толщины. Достаточная статистическая выборка обеспечивает **достоверность** полученных данных. Возможность контролируемого локального сшивания коллагенсодержащих материалов обеспечивает большую **практическую значимость** работы Швачкиной М.Е.



Сделанные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы Швачкиной М.Е. С учетом актуальности, новизны выполненного исследования, и наличия решения практической задачи стабилизации биологического материала, все вышесказанное позволяет заключить, что представленная работа полностью соответствует требованиям п. 9-11, 13, 14 "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Швачкина Марина Евгеньевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.02 - биофизика.

Доцент кафедры физической химии  
Химического факультета  
Московского государственного университета  
имени М.В. Ломоносова  
доктор химических наук



Н.Ю. Игнатьева

Специальность, по которой официально оппонентом защищена диссертация:  
02.00.04 - физическая химия

Адрес места работы и контактные данные: 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, химический факультет, кафедра физической химии. Тел. 8 (495) 939-34-91

e-mail: nyu@kge.msu.ru

