

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Генина Вадима Дмитриевича «Особенности оптического просветления биологических тканей в задачах плазмонно-резонансной фототермической терапии опухолей», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. - Биофизика

Актуальность работы

Методы лечения онкологических заболеваний, основанные на использовании современных нанотехнологий, сегодня находят все более широкое применение и демонстрируют свою перспективность. К таким методам относится метод лазерной плазмонно-резонансной фототермической терапии (ПФТТ) опухолей. Успешная фототерапия опухолей, сенсibilизированных наночастицами, требует решения целого ряда задач, связанных с выбором протокола введения и дозировки вводимых наночастиц, определением оптимальной дозы лазерного облучения опухоли, а также снижением повреждения здоровых тканей над поверхностью опухоли при ее нагреве. На решение данных проблем и направлена диссертационная работа Генина Вадима Дмитриевича, целью которой является разработка биофизических основ метода лазерной плазмонно-резонансной фототермической терапии модельных опухолей в комбинации с иммерсионным оптическим просветлением кожи.

Успешная фототерапия опухолей, сенсibilизированных наночастицами, требует решения целого ряда задач, связанных с выбором протокола однократного или многократного введения наночастиц, вводимой дозы и распределением частиц опухоли, а также дозы облучения. Очевидно, что знание оптических параметров тканей опухоли является ключевым моментом как для оценки дозы облучения (т.е. поглощенной энергии), так и для оценки освещенности тканей опухоли в курсе фототермической или фотодинамической терапии, что в свою очередь позволяет корректно оценить количество лазерного излучения, доставленного внутрь опухоли, и обеспечить достаточный нагрев тканей, расположенных на различных глубинах, поскольку в ряде случаев отмечается повторный рост опухоли после фотодинамического и фототермического подавления ее роста за счёт сохранения даже небольшого количества живых раковых клеток на периферии опухоли, не подвергнутой обработке.

Известны многочисленные исследования оптических параметров различных опухолевых тканей. Однако исследования оптических параметров проводились на цельной ткани опухоли, без ее дифференциации по слоям. Для решения задачи оптимизации лазерного воздействия на опухолевые ткани необходима информация о степени нагрева её внутренних слоёв *in vivo* при различных способах введения суспензии наночастиц. Эффективность теплового воздействия на опухолевые ткани на разной глубине можно оценить путем сравнения оптических параметров облученной и необлученной ткани.

Для снижения повреждения здоровых тканей над поверхностью опухоли во время ПФТТ возможно использование техники иммерсионного оптического просветления биотканей, заключающейся в выравнивании показателей преломления компонентов ткани путем частичного замещения внутритканевой жидкости биосовместимым оптическим просветляющим агентом.

Научная новизна

В работе впервые выполнена оценка оптических параметров различных слоёв модельной перевитой опухоли альвеолярного рака печени – холангиокарциномы. Впервые измерены оптические параметры слоёв опухолевой ткани, кожи и подкожной соединительной ткани после применения различных способов введения и доз ЗНС и проведения ПФТТ. Впервые проведено комплексное исследование изменения оптических, геометрических и весовых характеристик образцов кожи *ex vivo*, в результате которого выявлены механизмы диффузии и выполнена оценка эффективности оптического просветления кожи под действием растворов глицерина с концентрацией 20-100%. Предложена методика ПФТТ с использованием ЗНС и лазерного излучения (808 нм) в комбинации с иммерсионным оптическим просветлением кожи раствором глицерина.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы обусловлена важностью полученных результатов для уточнения существующих и развития новых моделей распространения лазерного излучения и тепла при проведении ПФТТ. Полученные результаты имеют практическую значимость, поскольку способствуют развитию направления в медицине, связанного с повышением эффективности и безопасности лечения онкологических заболеваний. Уточнение механизмов оптического просветления с помощью растворов глицерина различных концентраций способствует развитию метода оптического просветления кожи *in vivo*, которое может быть востребовано при выборе эффективных и безопасных иммерсионных агентов для использования их как в диагностических, так и терапевтических приложениях современной медицины, в частности, ПФТТ.

Личный вклад автора

В рамках выполнения диссертационного исследования автор принимал непосредственное участие во всех этапах проведенных исследований: от реализации поставленных научным руководителем задач до обсуждения результатов и написания статей.

Автор лично принимал участие в проведении экспериментов по облучению опухолей *in vivo* и оптическому просветлению *ex vivo*; измерении оптических, геометрических и весовых параметров образцов; аналитической и статистической обработке полученных результатов; интерпретации результатов исследования; изложении полученных фактических данных в материалах диссертационной работы, статьях и главе монографии; подготовке докладов на научно-практических конференциях.

Структура и объем работы

Диссертация Генина В.Д. включает введение, обзорную главу, 3 главы с изложением полученных результатов, заключение, в котором обсуждаются результаты, подводятся итоги выполненной работы и даны перспективы развития. Материал изложен на 127 страницах печатного текста, содержит 10 таблиц и иллюстрирован 27 рисунками. Список литературы содержит 304 источника.

Во введении обосновывается актуальность исследований, проводимых в рамках данной диссертационной работы, формулируется цель, ставятся задачи, излагается научная новизна и практическая значимость представляемой работы.

Глава 1 представляет собой обзор научной литературы по изучаемой проблеме. Описываются история развития метода гипертермии опухолей, его слабые стороны (токсичность, низкая селективность), современные методы повышения его эффективности (применение лазерных технологий, плазмонно-резонансных наночастиц, техники оптического просветления биотканей), а также данные об оптических параметрах биотканей (печени, кожи), их зависимости от теплового воздействия и методике их оценки.

Глава 2 посвящена исследованиям влияния дозы и способа введения золотых наностержней (ЗНС) в опухоль и степени васкуляризации опухоли на температуру нагрева биотканей и их оптические параметры. Описана методика исследования зависимости температуры нагрева опухолей от дозировки и способа введения золотых наностержней. Анализ экспериментальных данных и параметров аппроксимации показывает, что температура, необходимая для поражения раковых клеток, достигается при двукратном и трехкратном введении дозы суспензии с 400 мкг ЗНС. Также описана методика определения оптических параметров различных слоев опухоли, алгоритм вычисления оптических параметров (коэффициента поглощения и транспортного коэффициента рассеяния) слоев опухоли и представлен анализ оптических свойств исследуемых опухолей из контрольной группы и группы животных, испытавших однократное внутриопухолевое введение суспензии ЗНС (всего 1200 мкг ЗНС) за 3 часа до снятия оптических параметров. В области локализации ЗНС наблюдалось увеличение поглощения ткани опухоли в спектральной области, соответствующей области максимума оптической плотности суспензии ЗНС (~800 нм). Анализ изменения оптических свойств слоев опухолей при различной температуре нагрева поверхности при ПФТТ показал, что в зависимости от достигнутой максимальной температуры нагрева ткани в исследуемых подгруппах, происходят различные изменения амплитуды полос поглощения.

Глава 3 посвящена влиянию иммерсионного оптического просветления на ткани кожи, поскольку для разработки и оптимизации методов оптического просветления кожи при проведении процедуры ПФТТ необходимо знание механизмов взаимодействия исследуемых иммерсионных агентов с кожей и значений эффективных коэффициентов диффузии. Описывается методика исследования изменения структурных и оптических параметров тканей кожи под действием гиперосмотических иммерсионных агентов. Приведены результаты анализа изменения структурных и оптических параметров тканей кожи под действием водных растворов глицерина. Из временных зависимостей коллимированного пропускания кожи крысы *ex vivo* под действием водных растворов глицерина следует, что эффект согласования показателей преломления, вызванный проникновением глицерина во внутритканевую жидкость и одновременным осмотическим обезвоживанием кожи, влечет увеличение коллимированного пропускания образцов. Установлено, что для концентраций 20-40% кинетика коллимированного пропускания образцов кожи подразделяется на две стадии: на первой стадии наблюдается быстрое увеличение, а на второй - медленное снижение, а масса и объем образцов уменьшаются на первом этапе и увеличивается на втором. При более высоких концентрациях растворов двунаправленный процесс в период наблюдения сменяется однонаправленным: увеличением коллимированного пропускания и снижением значений остальных исследуемых параметров, что связано с преобладанием дегидратации ткани. Однако однонаправленный процесс дегидратации также является двухстадийным, характеризующимся разными скоростями; снижение скорости обусловлено увеличением

извилистости водных путей при постепенном увеличении обезвоживания тканей. Таким образом, наблюдаемые в течение часа эффекты позволяют разделить механизмы взаимодействия исследуемых образцов и растворов на четыре группы: преимущественная иммерсия (20-40%), переход от преимущественной иммерсии к преимущественной дегидратации (50-60%), преимущественная дегидратация (70-90%) и дегидратация (100%). Также исследования продемонстрировали, что наибольшая эффективность оптического просветления принадлежит 60-70% растворам глицерина, в то время как при повышении и понижении концентрации эффективность просветления значительно снижается. Высокая эффективность оптического просветления под действием чистого глицерина объясняется значительным снижением толщины образцов при их дегидратации.

Глава 4 посвящена разработке методики оптического просветления биотканей при фототермической терапии опухолей. Представлен анализ изменения оптических свойств кожи под действием иммерсионного оптического просветления и лазерного нагрева слоев опухоли при ПФТТ и иммерсионном оптическом просветлении. Результаты анализа экспериментальных данных показывают, что основные различия в поглощении вызваны дегидратацией тканей в области облучения, в то время как увеличение рассеяния вызвано разрушением микрососудов с последующей коагуляцией белков. Отмечено снижение термического повреждения кожи в результате проведения ПФТТ при предварительном оптическом просветлении с использованием иммерсионного агента и низкоинтенсивного лазерного облучения.

В Заключении перечислены основные результаты и выводы работы.

Диссертационная работа представляет собой полное и законченное исследование. Автором проделан большой объем работы, и его квалификация в области теоретических и экспериментальных исследований не вызывает сомнений.

К диссертационной работе имеется ряд замечаний:

1. На фоне достаточно подробного обзора литературы по существующим просветляющим агентам, описание техники оптического просветления в задачах фототермической терапии опухолей выглядит недостаточно полным.

2. Исследование оптического просветления при фототермической терапии опухолей выполнено всего на 11 лабораторных животных с привитыми экспериментальными моделями холангиокарциномы.

3. Анализ кинетики нагрева тканей был выполнен с использованием эмпирического уравнения, выбор которого недостаточно полно обоснован.

4. В тексте диссертации присутствуют неточности. В ряде таблиц (например, 2.2 и др.) представленные значения не соотносятся по разрядам используемых значащих цифр для среднего и СКО (например, $1,4 \pm 0,96$ и т.д.). Некоторые отсылки на иллюстрации должны отсылать к другим иллюстрациям (например, на стр. 47 указано, что на рисунке 2.3 представлена кинетика нагрева, при этом на самом рисунке 2.3 приведены гистологические изображения).

Вышеуказанные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы. Диссертация выполнена на высоком научно-методическом уровне. Результаты работы апробированы на международных и всероссийских конференциях, а их достоверность обусловлена применением известных верифицированных методов и подходов, а также хорошей согласованностью с результатами, полученными другими научными группами. По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 11 работ в изданиях, рекомендованных ВАК,

и зарубежных изданиях, индексируемых Scopus и Web of Science. Опубликовано глава в зарубежной монографии издательства CRC Press. Автореферат полностью отражает содержание работы.

С учетом всего вышеизложенного считаю, что диссертационная работа является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком уровне и полностью соответствующей требованиям новизны, научно-практической значимости и достоверности, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук в соответствии с пунктами 9-11, 13, 14 действующего «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.2. – Биофизика. Ее автор, Генин Вадим Дмитриевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. – Биофизика.

Официальный оппонент – **Братченко Иван Алексеевич**
к.ф.-м.н., доцент кафедры лазерных и биотехнических систем ФГАОУ ВО «Самарский национальный Исследовательский университет имени академика С.П. Королева»
Дата: «23» мая 2022 г.

Адрес: 443086, г. Самара, ул. Московское шоссе, д. 34.
Сайт: <https://ssau.ru/>, Тел.: 8 (846) 267 45 50, e-mail: iabratchenko@gmail.com

Я даю согласие на обработку персональных данных (приказ Минобрнауки России от 01.07.2015 №662)

Подпись Братченко И.А. заверяю.

