

ОТЗЫВ

официального оппонента, член-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессора Морозова Сергея Георгиевича на диссертацию Агаповой Ольги Игоревны «Оптическая и зондовая нанотомография для структурного анализа микро- и макроносителей, клеток и тканей», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.1.14 - трансплантология и искусственные органы

Актуальность

Разработка и совершенствование методов трехмерного микро- и наномасштабного анализа клеточных и тканевых структур, а так же биосовместимых изделий, взаимодействующих с ними, чрезвычайно важно для эффективного развития таких биомедицинских технологий, как регенеративная медицина, тканевая инженерия, биоимиджинг и направленная доставка лекарственных препаратов.

Техники флуоресцентной оптической микроскопии, основанные на использовании флуоресцентных маркеров, специфичных для различных биомолекул и биологических структур, являются важнейшими компонентами современного инструментария биологических исследований, незаменимыми для изучения организации и функциональности живых систем. Разработанные диссертантом метод флуоресцентной оптической нанотомографии (ФОНТ) и экспериментальный комплекс для его реализации позволяют значительно повысить точность и разрешение анализа трехмерных распределений флуоресцентных маркеров в исследуемых биологических объектах и изделиях по сравнению с методом конфокальной микроскопии и имеют ряд преимуществ по сравнению другими существующими оптическими методами. Эффективность применения и

преимущества данной технологии для решения задач тканевой инженерии и регенеративной медицины продемонстрированы на примерах исследований ряда различных объектов и материалов, от клеток и тканей до полиэлектролитных микрокапсул и биосовместимых скаффолдов, что подчеркивает универсальность разработанных подходов, особенно в соединении с ранее разработанной техникой сканирующей зондовой нанотомографии. Исследования полученных скаффолдов на основе фиброина шелка с микрочастицами внеклеточного матрикса печени человека подтверждают их высокий регенеративный потенциал, как перспективных материалов для создания биомедицинских изделий для регенеративной медицины.

Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что диссертационная работа Агаповой О.И. является актуальной и значимой для задач трансплантологии и создания искусственных тканей и органов.

Научная новизна исследования

Диссертантом разработан экспериментальный комплекс для флуоресцентной оптической нанотомографии и принципиально новая методология трехмерного анализа распределений флуоресцентных маркеров в клетках, тканях и полимерных микро- и макроносителях. Впервые продемонстрирована возможность объединения ультрамикротомии и флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения для послойного исследования поверхности образцов после срезов, а также возможность последовательного флуоресцентного анализа сверхтонких срезов образца *in situ* непосредственно после выполнения среза. Определяющей особенностью разработанной технологии ФОНТ является высокое (не более 150 нм) разрешение трехмерной реконструкции по глубине. Эффективность и преимущества новой технологии впервые

продемонстрированы на примере ряда выполненных биомедицинских исследований обладающих самостоятельной значимостью и новизной.

Так, обоснована эффективность метода ФОНТ для повышения точности анализа трехмерной структуры тканей печени крысы и гиппокампа мыши. Впервые с помощью новой технологии в корреляции с методом сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ) изучены особенности трехмерного распределения цитостатика доксорубина внутри клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Коррелятивное использование ФОНТ и СЗНТ позволило получить новые данные о наноструктуре оболочек полиэлектролитных микрокапсул с магнитными наночастицами и флуоресцентными нанокристаллами, определяющей их функциональные свойства.

Впервые охарактеризована трехмерная наноструктура макроносителей на основе биоматериалов: фрагментов децеллюляризированной ткани печени человека и скаффолдов на основе фиброина шелка с включенными в состав микрочастицами внеклеточного матрикса печени человека, полученными при помощи методов децеллюляризации и криоизмельчения. Диссертантом продемонстрировано в экспериментах *in vivo*, что включение микрочастиц внеклеточного матрикса печени человека в скаффолды на основе фиброина шелка ускоряет заживление полнослойной раны кожи у крыс.

Совокупность полученных диссертантом результатов позволяет заключить, что диссертационная работа Агаповой О.И. обладает достаточной научной новизной.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Представленные в диссертационной работе Агаповой О.И. результаты имеют высокую значимость как для фундаментальных биомедицинских исследований, так и для практических применений.

Разработанные диссертантом экспериментальный аппаратный комплекс и методики флуоресцентной нанотомографии дают возможность анализировать с повышенной точностью и достоверностью трехмерные распределения флуоресцентных маркеров в клетках, тканях и различных биоинженерных конструкциях на основе биологических и полимерных материалов. Технология флуоресцентной нанотомографии может быть эффективно использована для решения самых различных биологических и биомедицинских задач.

Представленный подход к трехмерному анализу тканевых структур на примере исследований печени крысы и астроцитов в гиппокампе мыши, маркированных соответствующими флуоресцентными маркерами, может быть использован как для решения фундаментальных задач структурной биологии, так и для разработки новых методов диагностики и детектирования патологических изменений в клетках и тканях.

Разработанный метод исследования трехмерного распределения доксорубина внутри клеток в корреляции с клеточной ультраструктурой может применяться в разработке фармацевтических препаратов и способов их адресной доставки.

Представленный метод оценки взаимного пространственного расположения магнитных наночастиц и квантовых точек в оболочках полиэлектролитных микрокапсул может использоваться для повышения эффективности разработок микрокапсул с двойным флуоресцентно-магнитным кодированием, предназначенных для использования в медицинских системах тераностики и доставки лекарственных средств.

Выполненный анализ регенеративного потенциала и особенностей трехмерной наноструктуры скаффолдов на основе фиброина шелка с микрочастицами децеллюляризированной ткани печени человека дает возможность рекомендовать данные материалы для доклинических

исследований, направленных на создание на их основе изделий для задач регенеративной медицины.

Разработанные диссертантом технологии нанотомографических исследований внедрены в практику научно-исследовательских работ, выполняемых в ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России и могут быть предложены для применения в других исследовательских центрах для решения задач, требующих анализа ультраструктуры биоматериалов, биоинженерных конструкций, клеток и тканей различных органов.

Обоснованность и достоверность основных положений, результатов и выводов диссертации

Выводы и основные положения, выносимые на защиту, в достаточной степени подкреплены анализом значительного объема результатов экспериментальных исследований, выполненных диссертантом. Достоверность результатов подтверждается использованием современных экспериментальных техник и методов исследования и статистической обработки.

Анализ полученных результатов исследований позволил диссертанту сформулировать и обосновать 10 выводов и 4 практические рекомендации на их основе, направленные как на эффективное использование разработанных техник нанотомографии, так и на применение полученных и исследованных биоматериалов для регенеративной медицины.

Основные положения диссертационной работы заслушаны и обсуждены на межинститутских семинарах ФГБУ "НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова" Минздрава России в 2019 – 2023 гг. а также на всероссийских и международных научных симпозиумах и конференциях.

По теме диссертации автором опубликована 31 научная статья в ведущих рецензируемых журналах, из них 17 статей опубликованы в журналах, входящих в Перечень научных изданий, в которых должны быть

опубликованы основные результаты исследований в рамках диссертаций, представляемых к защите в диссертационном совете ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, а 14 – в зарубежных журналах, индексируемых в международных базах данных Scopus и Web of Science, получено 10 патентов РФ на изобретения. Совокупность данных публикаций также подтверждает как достоверность данных, так и обоснованность выводов диссертационной работы и положений, выносимых на защиту.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности в целом, замечания по оформлению

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, описания экспериментальных методов исследования, пяти глав, содержащих результаты собственных исследований и их обсуждение, заключения, 10 выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Диссертация изложена на 233 страницах машинописного текста, содержит 103 рисунка, 4 таблицы и 3 формулы. Список литературы включает в себя 228 наименований, из них 22 российских и 206 зарубежных источников.

Во введении обоснована актуальность исследования, четко сформулированы его цель, состоящая в разработке аппаратного-методического комплекса флуоресцентной оптической нанотомографии и доказательстве эффективности его применения для трехмерного анализа микро- и наноструктуры биоматериалов, клеток и тканей, поставлены соответствующие заданной цели задачи. Показана научная новизна и практическая значимость полученных результатов и представлены основные положения, выносимые на защиту.

Глава 1 представляет из себя литературный обзор и изложена на 42 страницах машинописного текста. В данной главе описаны и проанализированы современные методы флуоресцентной, электронной и зондовой микроскопии и нанотомографии в применении к анализу трехмерных структур клеток, тканей и

полимерных носителей. Проведенный автором анализ существующих методик и их ограничений позволил сформулировать техническую задачу для разработки комплекса для флуоресцентной оптической нанотомографии и обосновать актуальность выполнения диссертационного исследования.

Глава 2 «Материалы и методы» изложена на 25 страницах машинописного текста. Она включает себя 17 подразделов, в которых подробно описаны методы получения экспериментальных образцов изучаемых микро- и макроносителей, клеток и тканей и их пробоподготовки к исследованиям методами флуоресцентной и зондовой нанотомографии, а также специализированные методики самих микроскопических исследований. Необходимо отметить важность приведенных подробных описаний разработанных диссертантом методов пробоподготовки для каждого вида исследуемых объектов, имеющих ключевое значение для получения качественных результатов.

Выбранные диссертантом методы исследования соответствуют поставленным автором цели и задачам исследования и адекватны современному научному уровню.

Глава 3, озаглавленная «Разработка экспериментального аппаратного комплекса для флуоресцентной оптической нанотомографии» посвящена описанию разработанных диссертантом технических решений приборного комплекса для флуоресцентной оптической нанотомографии, и двух основных режимов его работы: ФОНТ полного внутреннего отражения с использованием ножа ультрамикротомы как оптического элемента и ФОНТ сверхтонких срезов *in situ* непосредственно после среза в ванночке ножа ультрамикротомы. Приведены результаты экспериментов, доказывающих функциональность и эффективность разработанной технологии, на примере трехмерных реконструкций полимерных микросфер, покрытых квантовыми точками, и ткани печени крысы с флуоресцентным окрашиванием красителем FITC.

В главе 4 приведены результаты исследований трехмерной структуры астроцитов в ткани гиппокампа мыши, выполненных с использованием разработанного метода ФОНТ. Диссертантом показано, что ФОНТ позволяет на основе последовательных флуоресцентных изображений реконструировать структуру тонких отростков астроцитов с разрешением до 150 нм по глубине, при этом полученные интегральные характеристики морфологии астроцитов в объеме ткани гиппокампа согласуются с литературными данными, полученными другими методами.

В главе 5 объектами исследования выступают микрокапсулы на основе полиэлектролитов, кодированные магнитными наночастицами и флуоресцентными квантовыми точками. Подобные микрокапсулы широко применяются в настоящее время для ряда различных биомедицинских задач, включая современные техники тераностики, биоимиджинга и адресной доставки фармацевтических препаратов. Использование методов ФОНТ, атомно-силовой и магнитно-силовой микроскопии позволило диссертанту определить ключевые параметры наноструктуры кодированных наночастицами оболочек микрокапсул, влияющие на их стабильность и функциональность.

Глава 6 посвящена исследованиям внутриклеточного распределения доксорубина в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 методом корреляционной сканирующей флуоресцентно-зондовой нанотомографии. Применение методов сканирующей зондовой микроскопии и флуоресцентной нанотомографии в коррелятивном режиме дало возможность диссертанту охарактеризовать особенности распределения цитостатика в клетках с недостижимым ранее аксиальным разрешением.

Глава 7 содержит результаты исследований биосовместимых скаффолдов на основе фиброина шелка и фрагментов децеллюляризованного матрикса печени человека. В данной главе охарактеризована трехмерная наноструктура скаффолдов и вычислены количественные параметры их трехмерной наноморфологии, а также выполнено исследование

регенеративного потенциала полученных скаффолдов в модели заживления полнослойной раны кожи крысы, показавшее их высокую способность к стимуляции регенерации кожи. Выполнено исследование трехмерной структуры клеток различных линий, адгезированных на скаффолды в виде пленок на основе фиброина шелка.

В заключении диссертации приведены основные результаты работы, сформулированы выводы и практические рекомендации по дальнейшему применению как разработанной технологии флуоресцентной оптической нанотомографии, так и исследованных биоматериалов для регенеративной медицины.

Выводы диссертационной работы конкретны, обоснованы, подкреплены достаточным экспериментальным материалом и соответствуют поставленным задачам.

Практические рекомендации обоснованы полученными результатами исследований автора и логично следуют из сформулированных выводов.

Автореферат соответствует предъявленным требованиям, содержит в себе основные положения диссертации, оформлен грамотно, дополнен достаточным количеством иллюстративного материала.

Принципиальных замечаний по диссертации нет.

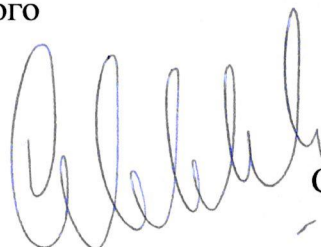
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Агаповой Ольги Игоревны на тему «Оптическая и зондовая нанотомография для структурного анализа микро- и макроносителей, клеток и тканей» является законченным самостоятельным научно-квалификационным исследованием, в котором представлено решение актуальной научно-практической проблемы анализа трехмерных распределений флуоресцентных маркеров и наноструктурных особенностей в полимерных микро- и макроносителях, клетках и тканях.

По своей актуальности, новизне, научно-практической значимости она полностью соответствует требованиям п. 16 «Положения о присуждении ученых степеней в ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России», утвержденного приказом директора от 12.02.2021 №70/8, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук и соответствует специальности 3.1.14 – трансплантология и искусственные органы, а ее автор, Агапова Ольга Игоревна, достоин присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук.

Официальный оппонент:

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор,
директор Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт
общей патологии и патофизиологии»



С.Г. Морозов

Подпись член-корреспондента РАН, д.м.н., профессора
Морозова Сергея Георгиевича заверяю:

учёный секретарь ФГБУ «НМИЦ ТИО»
Котлявшекова Е.Н.

М.П.



21.10.2024г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Почтовый адрес: 125315, Москва, ул. Балтийская, д.8.

Телефон: +7 (499) 151-1756. Электронная почта: niiopp@mail.ru