

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России
д.б.н., проф., академик РАН
Гинцбург А.Л.
12 ноября 2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

**Федерального государственного бюджетного учреждения
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и
микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
О научно-практической значимости диссертационной работы
Агаповой Ольги Игоревны «Оптическая и зондовая
нанотомография для структурного анализа микро- и макроносителей,
клеток и тканей», представленной на соискание ученой степени доктора
биологических наук по специальности 3.1.14 - трансплантология и
искусственные органы**

Актуальность темы выполненной работы и ее связь с соответствующими отраслями науки и практической деятельности

Актуальность диссертационной работы Ольги Игоревны Агаповой обуславливается растущей необходимостью в разработке и усовершенствовании методов высокоразрешающей микроскопии для изучения клеточных и тканевых структур. С учетом динамичного развития биомедицинских технологий, таких как регенеративная медицина и тканевая инженерия, важность точного анализа микро- и наноструктур становится все более очевидной.

Разработанный автором метод флуоресцентной оптической нанотомографии (ФОНТ) представляет собой передовое решение, позволяющее значительно повысить качество визуализации биологических объектов на субклеточном и молекулярном уровне. Данная технология предоставляет возможность детального изучения пространственного распределения флуоресцентных маркеров, что является ключевым для

понимания взаимодействий между клеточными компонентами и биосовместимыми материалами.

Сравнительный анализ с существующими методами показывает, что ФОНТ не только превосходит их по разрешению, но и открывает новые перспективы для изучения сложных биологических систем. Это особенно важно для задач, связанных с регенерацией тканей, поскольку эффективное взаимодействие клеток с биоматериалами является основой успешной имплантации и интеграции искусственных структур.

Примеры применения данной технологии в исследованиях различных биологических объектов, включая клеточные культуры и полиэлектролитные микрокапсулы, подчеркивают ее универсальность и высокую эффективность. Работа Агаповой О. И. демонстрирует, как разработанные методы могут способствовать развитию новых подходов в трансплантологии и создании искусственных тканей, что делает её диссертацию актуальной и значимой для современного научного сообщества.

Таким образом, диссертационная работа О.И. Агаповой занимает важное место в контексте актуальных проблем биомедицинской науки, предлагая инновационные решения для достижения более глубокого понимания клеточных процессов и взаимодействий в живых системах.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В диссертации О.И. Агаповой представлено новое направление флуоресцентной оптической нанотомографии, основанное на создании уникального экспериментального комплекса для трехмерного анализа распределения флуоресцентных маркеров в клетках, тканях и полимерных носителях. Одним из значительных достижений работы является объединение методов ультрамикротомии с флуоресцентной микроскопией полного внутреннего отражения, что позволяет выполнять послойный анализ образцов, а также проводить последовательный флуоресцентный анализ тончайших срезов непосредственно после их получения.

Одной из ключевых характеристик предложенной технологии является ее высокая разрешающая способность (до 120 нанометров), что значительно улучшает качество трехмерной реконструкции. Новизна и эффективность предложенного подхода подтверждены в рамках нескольких биомедицинских исследований. Так, была подтверждена высокая точность

метода ФОНТ при анализе трехмерной структуры тканей печени крысы и гиппокампа мыши.

Кроме того, диссертация включает исследования, в которых впервые изучены трехмерные распределения доксорубина в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 с использованием коррелирующих методов, таких как ФОНТ и сканирующая зондовая нанотомография (СЗНТ). Использование данных методов позволило получить новые сведения о наноструктуре оболочек полиэлектролитных микрокапсул, которые имеют значение для их функциональных характеристик.

Работа также охватывает характеристики трехмерной наноструктуры макроносителей, созданных на основе децеллюляризированной ткани печени человека и скаффолдов на основе фиброина шелка, содержащих микрочастицы внеклеточного матрикса печени. В экспериментальных исследованиях *in vivo* было показано, что использование микрочастиц внеклеточного матрикса в скаффолдах на основе фиброина шелка способствует более быстрому заживлению полнослойных ран у крыс.

Таким образом, результаты, полученные в ходе исследования, демонстрируют высокую научную новизну работы О.И. Агаповой и их значимость для дальнейшего развития биомедицинских технологий и тканевой инженерии.

Значимость для науки и практической деятельности полученных соискателем результатов

Результаты, представленные в диссертационной работе О.И. Агаповой, имеют значительную научную и практическую ценность для биомедицинской области, способствуя как теоретическим исследованиям, так и разработке новых подходов к диагностике и терапии.

Разработанный диссертантом экспериментальный аппаратный комплекс и методика флуоресцентной нанотомографии обеспечивают возможность проведения глубокого и точного анализа трехмерных распределений флуоресцентных маркеров в клетках, тканях и различных биоинженерных конструкциях, что имеет широкие перспективы для применения в биомедицинских исследованиях. Эти методы не только увеличивают точность получаемых данных, но и открывают новые возможности для решения задач, связанных с изучением структуры и функционирования клеток.

Методология трехмерного анализа, примененная к исследованиям тканей печени крысы и клеток нейронов гиппокампа мыши, демонстрирует как фундаментальную, так и прикладную значимость. Эти результаты могут быть использованы для решения актуальных задач в области структурной биологии и создания инновационных диагностических средств, направленных на выявление патологий на клеточном уровне.

Метод, позволяющий изучать распределение доксорубина в клетках в контексте их ультраструктуры, значим для разработки новых фармацевтических препаратов и улучшения технологий целевой доставки.

Кроме того, подход к оценке взаимодействия магнитных наночастиц и квантовых точек в полиэлектролитных микрокапсулах представляет интерес для повышения эффективности разработок в области тераностики и доставки лекарств.

Также исследование регенеративного потенциала скаффолдов на основе фиброина шелка, дополненных децеллюляризированной тканью печени человека, открывает возможности для создания новых биоматериалов, которые могут быть успешно использованы в клинической практике.

Таким образом, работа Агаповой О.И. содержит результаты, которые могут быть эффективно внедрены в научные и практические области биомедицинских исследований.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов диссертации

Основные выводы и положения, являются результатом глубокой проработки экспериментальных данных, что придает им научную обоснованность и надежность. В исследовании Агаповой О.И. применены современные методики, что позволяет достигать высокой точности и достоверности результатов.

Диссертационная работа включает практические рекомендации, основанные на полученных результатах, которые могут быть использованы как в теоретических, так и в практических аспектах биомедицинских исследований. Эти рекомендации направлены на внедрение новых методик и материалов в области регенеративной медицины и биоинженерии.

Работа обсуждалась на различных научных семинарах и конференциях, что подчеркивает её актуальность для научного сообщества. Участие в

заседаниях ФГБУ "НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова" и международных симпозиумах свидетельствует о значимости предложенных результатов.

Агапова О.И. опубликовала 31 научную статью в изданиях, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science, из которых 17 опубликованы в изданиях из Перечня рецензируемых научных изданий ФГБУ "НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова" в которых должны быть опубликованы результаты диссертационных работ. Также 8 статей были напечатаны в международных журналах, входящих в первый квартиль Q1, что подтверждает высокий уровень научного вклада автора. Наличие 10 патентов РФ на изобретения дополнительно свидетельствует о новизне и практической значимости работы.

Таким образом, полученные результаты и рекомендации, представленные в диссертации, обладают значительной научной ценностью и подчеркивают важный вклад Агаповой О.И. в развитие методов и технологий в области биомедицинских исследований.

Оценка структуры, содержания, соответствия требованиям, предъявляемым к диссертации

Диссертация включает введение, обзор литературы, описание методов исследования, пять глав, в которых представлены результаты проведенных исследований, заключение, 10 выводов, практические рекомендации, список сокращений и библиографию. Общее количество страниц составляет 233, в работе представлены 103 иллюстрации, 4 таблицы и 3 формулы. Библиография содержит 228 источников.

Во введении обоснована актуальность темы исследования. Четко определены цели, направленные на создание аппаратного комплекса для флуоресцентной оптической нанотомографии и демонстрацию его эффективности в анализе микро- и наноструктур полимерных конструкций, клеток и тканей. Поставленные задачи соответствуют заявленной цели. В главе 1 представлен литературный обзор, в котором подробно рассматриваются современные методики флуоресцентной, электронной и зондовой микроскопии, применяемые для анализа трехмерных структур клеток и тканей. Автор обосновывает необходимость разработки нового комплекса для нанотомографии, выделяя существующие ограничения и предлагая пути их преодоления. В главе 2 представлены методы и материалы исследования, даны детальные описания методов получения, процедур пробоподготовки и методов исследования образцов. Эффективное

исследование полимерных и биологических образцов при помощи новой технологии нанотомографии во многих случаях требует корректировки и переработки стандартных методик пробоподготовки, поэтому их подробное описание важно для получения надежных и воспроизводимых результатов. Следующая глава включает описание технических решений, предложенных в рамках разработки нового аппаратного комплекса для флуоресцентной оптической нанотомографии, с акцентом на два основных режима работы – режима с использованием техники флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения и режима анализа серийных сверхтонких срезов *in situ*. Приведены данные о проведенных экспериментах, которые подтверждают работоспособность предложенной технологии на примерах трехмерного анализа полимерных микросфер с флуоресцентными квантовыми точками и ткани печени крысы. Обсуждены достоинства и недостатки основных режимов работы приборного комплекса. В следующей главе представлены исследования трехмерной структуры астроцитов в ткани гиппокампа мыши, выполненные с помощью разработанной технологии. Полученные данные показывают, что данная методика позволяет получать высококачественные реконструкции морфологии астроцитов, в том числе их тонких отростков, соответствующие литературным данным, полученным с использованием других методов микроскопии. Это открывает широкие возможности для использования технологии ФОНТ в нейробиологии и биомедицинских исследованиях нервной ткани. Следующая глава посвящена изучению микрокапсул, созданных на основе полиэлектролитов с добавлением магнитных наночастиц и квантовых точек. Выполненные исследования наноструктуры полиэлектролитных слоев, содержащих магнитные и флуоресцентные наночастицы, и их взаимного пространственного расположения касаются ключевых характеристик, определяющих стабильность и функциональность этих микрокапсул в контексте их биомедицинского применения. Показано, что разработанные методы оптической и зондовой нанотомографии предоставляют эффективный инструментарий для анализа и контроля качества подобных наноинженерных конструкций, предназначенных для задач биоимиджинга и тераностики. Следующая глава посвящена анализу внутриклеточного распределения цитостатика доксорубина в клетках MCF-7. Использование корреляционных методов зондовой и флуоресцентной оптической нанотомографии позволило описать особенности распределения цитостатика в корреляции с ультраструктурой клетки с разрешением, превосходящим разрешение конфокальных методов. Достигнутые результаты доказывают,

что технология зондовой и оптической нанотомографии может успешно применяться для исследований внутриклеточного траффика препаратов для онкотерапии. Особое место в диссертации занимают результаты исследований биосовместимых скаффолдов, построенных на основе биоматериалов, а именно фиброина шелка и децеллюляризованного матрикса печени человека. Подробно описаны наноструктуры полученных скаффолдов и клеточно-инженерных конструкций на их основе, проанализированные методами зондовой и флуоресцентной нанотомографии. Исследование регенеративных свойств полученных скаффолдов *in vivo* в модели полнослойной раны кожи крысы подтвердило их высокий потенциал для задач регенеративной медицины. В заключении подводятся итоги работы, формулируются выводы и практические рекомендации по использованию разработанной технологии и исследуемых материалов в регенеративной медицине. Выводы работы четкие и логично обоснованные, опираются на достаточно объемный экспериментальный материал и соответствуют задачам исследования.

Практические рекомендации полностью обоснованы полученным результатам исследования и значимы для использования в различных областях биомедицинских исследований.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации, представляя собой краткое и ясное изложение основных положений диссертационной работы, результатов проведенных исследований и их значимости.

Принципиальных замечаний по диссертации нет.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные результаты исследования были успешно интегрированы в научно-практические работы, проводимые в таких подразделениях ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, как отдел биомедицинских технологий и тканевой инженерии, лаборатория биотехнических систем и лаборатория бионанотехнологий. Разработанные технологии можно также рекомендовать для использования в других научно-исследовательских учреждениях, выполняющих разработки биоматериалов и изделий на их основе, средств доставки лекарственных препаратов, а также специализирующихся на исследованиях ультраструктуры клеток и тканей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

По своей актуальности, новизне, объему проведенного исследования, научно-практической значимости и методическому уровню диссертационная работа О.И.Агаповой 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, достойна присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук.

Настоящий отзыв и диссертация обсуждены и одобрены на семинаре лаборатории биологически активных наноструктур Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 7/27 от 7 ноября 2024г).

Доктор биологических наук,
зав лабораторией биологически активных наноструктур
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

В.Г. Лунин

Подпись д.б.н. Лунина Владимира Глебовича заверяю:
Ученый секретарь ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России
к.б.н. Сысолятина Е.В.

М.П.

Почтовый адрес: 123098, г. Москва ул. Гамалеи д. 18, тел. +7 (499) 193-30-01
info@gamaleya.org <https://gamaleya.org/>.

