

### **ОТЗЫВ официального оппонента**

на диссертационную работу Мамаевой Саргыланы Николаевны  
на соискание ученой степени доктора физико-математических наук  
на тему: «Наноразмерные структуры на мембране эритроцита при патологии  
и воздействии радиации» по специальности 1.5.1. Радиобиология

Диссертационная работа Мамаевой Саргыланы Николаевны посвящена разработке новых подходов, методов и технологий для обнаружения и изучения наноразмерных структур (НРС) на поверхности эритроцитов при онкологических заболеваниях и воздействии ионизирующего излучения в плане лучевой терапии опухолей.

Актуальность темы диссертационного исследования Мамаевой С.Н. главным образом обусловлена большой распространенностью в мире таких гендерно-специфичных онкологических заболеваний как рак шейки матки (РШМ) и рак молочной железы (РМЖ) и недостаточной изученностью этиологии этих заболеваний, а также процессов метастазирования этих опухолей. В настоящее время есть серьезные основания считать, что вирусы папилломы человека (ВПЧ) могут являться одной из причин возникновения и обширного метастазирования РШМ. Также появляются сведения, что эритроциты способны адсорбировать на своей поверхности экстрацеллюлярные везикулы, часть из которых представлена экзосомами, в том числе, возможно, экзосомами из опухоли. Некоторые могут содержать неклеточные патогены, РНК и ДНК вирусов, в том числе ДНК ВПЧ. Поэтому актуальными можно считать исследования, направленные на изучение причин возникновения НРС на поверхности эритроцитов, а также свойств самих эритроцитов, у которых на поверхности локализованы НРС, при разных заболеваниях, в первую очередь - онкологических. При этом в радиобиологическом плане логично и актуально изучение влияния ионизирующего излучения на количество, размеры и структуру переносимых эритроцитами НРС как дополнительного результата радиотерапии.

Анализ содержания диссертации показывает, что диссертационная работа Мамаевой С.Н. изложена на 325 страницах печатного текста и включает в себя 148 рисунка и 6 таблиц. Структурно диссертация состоит из введения, 5 глав оригинальных исследований, заключения, выводов и списка литературы из 371 наименования. К диссертации имеется автореферат.

*Во введении* к диссертации убедительно обоснована актуальность темы исследования, сформулирована общая цель и задачи исследования, указаны научная новизна и практическая значимость работы, приведены основные защищаемые положения, даны необходимые сведения о личном вкладе автора, об апробации диссертации, о поддержке фрагментов исследования грантами Министерства науки и высшего образования РФ и Эндаумент фонда Северо-Восточного федерального университета им. М.К.Аммосова, о публикациях автора по теме диссертации.

*Глава 1* представляет собой проблемно-ориентированный обзорный раздел диссертации, в котором подробно обоснована актуальность выполненного исследования, сформулированы цель и задачи исследования, приведены известные литературные данные о свойствах эритроцитов и их изменениях при различных заболеваниях и патологиях, а также детально рассмотрены вопросы физики электронной микроскопии в задачах выбора и обоснования режимов работы сканирующих электронных микроскопов (СЭМ). Проанализированы особенности существующих методов пробоподготовки для исследования наноразмерных структур (НРС) в биологических образцах с помощью СЭМ. Убедительно показано, что биообразцы в основном обладают слабой электропроводностью и, соответственно, низкими коэффициентами вторичной и отраженной электронной эмиссии, что затрудняет изучение биологических НРС с помощью СЭМ, а существующие методы пробоподготовки (криосушка, напыление металлического покрытия) сильно меняют свойства биообразца и, как следствие, часто не информативны. Поэтому требуется усовершенствование методики.

*Глава 2* посвящена методологии проведения исследований, методам и



подходам в решении поставленных задач. Сформулированы особенности объектов исследования, приведены характеристики оборудования и программного обеспечения, которые использованы в работе. Объектами исследования в данной работе служили сухие мазки крови, как венозной, так и капиллярной, а также специальным образом подготовленные образцы других биологических жидкостей человека и обезьян (моча, синовиальная жидкость).

Лучевое лечение онкологических больных РШМ проводилось в Якутском республиканском онкологическом диспансере с помощью линейного ускорителя 6-18 МэВ Elekta Synergy и с последующими дополнительными сеансами брахитерапии. Облучение обезьян (макака-резус, самцы) проводилось излучением источника  $Cs^{137}$ , активностью порядка  $7,4 \times 10^{12}$  Бк (200 Кюри).

Для пробоподготовки образцов для микроскопии был разработан авторский метод формирования наноструктурированной подложки из оксида графена с наночастицами серебра. Спектральный анализ мазков крови проводился методом нарушенного полного внутреннего отражения на ИК-спектрометре Varian 7000 FT-IR с разрешением  $2 \text{ см}^{-1}$ . Для обнаружения фрагментов ДНК ВПЧ в крови пациентов использовался метод ПЦР-РВ. Метод флуоресцирующих антител (МФА) был использован для детекции антител и характеристики состава НРС на поверхности эритроцитов. Спектроскопия вынужденного комбинационного рассеяния (КР) использовалась для контроля конформации гема гемоглобина и оценки состояния  $\beta$ -каротина в липидах и белках плазмы крови.

Применение всех указанных выше методов, подходов и приборов можно признать обоснованным и соответствующим задачам исследования.

*Глава 3* описывает оригинальные исследования и разработку новых подходов в сканирующей электронной микроскопии для выявления НРС на поверхности эритроцитов. Для проверки влияния материала и структуры подложек на качество изображений использовали мазки крови детей с гематурией, а также пациенток с диагнозом РШМ, у которых были обнаружены НРС (раз-

меры от 30 до 300 нм). Выбор образцов крови детей с гематурией был обусловлен тем, что существуют предположения о вирусной этиологии некоторых видов гломерулонефритов. Исследовались для указанных образцов подложки на основе стекла, кристаллов кремния (КДБ5-15), восстановленного оксида графена (ВОГ), ВОГ с наночастицами (НЧ) серебра и стеклянные подложки с титановым напылением. Установлено, что для существующей модификации СЭМ при изучении сухих мазков крови на предметном стекле необходимо работать при низком ускоряющем напряжении 1 кВ без напыления проводящего слоя на образец с использованием нижнего детектора вторичных электронов и с выбором рабочего расстояния  $WD=3.9$  мм. Было предположено, что существует зависимость качества изображения от режима работы СЭМ при заданном  $WD$ . Наибольшее пространственное разрешение было получено при использовании подложек на основе ВОГ с НЧ серебра.

Использование выбранных подложек и режимов работы СЭМ позволило автору впервые выявить особенности дисморфии эритроцитов при разных патологиях и травмах (синдромом гематурии, в том числе заболевании Берже, РШМ, холодовые травмы, патологии суставов), а также наличие на поверхности эритроцитов в ряде случаев нанообъектов, размеры которых сопоставимы с размерами вирусов и везикул. Установлено, что на поверхности эритроцитов локализованы в большем количестве НРС, размеры которых составляют 45–50 нм, совпадающие с размерами ВПЧ и вирусов гепатита В и С, и в меньшем количестве НРС с размерами 100–300 нм (соответствует, например, размерам цитомегаловируса).

Таким образом, была доказана возможность эффективного применения СЭМ в качестве метода исследования формирования и распространения НРС в клетках и биологических жидкостях с высоким пространственным разрешением при низких уровнях энергии ускорения электронных пучков, хотя объем выборки в ряде фрагментов исследований и не был статистически достаточным для конкретных выводов при некоторых патологиях и травмах (скажем, переохлаждение – всего 3 случая наблюдения).



*Глава 4* содержит результаты исследования влияния ионизирующего излучения на эритроциты крови и НРС на них у пациентов до, во время и после сеансов лучевой терапии (ЛТ), а также на эритроциты обезьян в модельных экспериментах с облучением  $\gamma$ -квантами от источника  $Cs^{137}$ . С помощью разработанных в главе 3 методов и подходов было установлено, что при ЛТ ионизирующее излучение значительно влияет на размер и морфологию эритроцита. Возрастает как общее количество дисморфных эритроцитов, так и число абсорбированных на них НРС, причем расширяется и диапазон размеров НРС на поверхности эритроцитов. После окончания курса ЛТ морфология эритроцитов восстанавливается, а количество НРС снижается.

Размеры НРС, локализованные на поверхности эритроцитов до ЛТ, соответствуют размерам вирусов, а размеры НРС, появляющихся в большом количестве во время ЛТ, соответствуют размерам экзосом. Впервые объективно удалось показать, что НРС в виде экзосом после ЛТ часто равномерно распределены не только на поверхности эритроцитов, но и обнаруживаются также и в плазме крови.

Кроме этого, в четвертой главе представлены результаты химической идентификации наноразмерных частиц на поверхности эритроцитов – определения их физико-химической природы с помощью методов КР спектроскопии, ПЦР, МФА. Обосновано по результатам исследований, что при РШМ способность гемоглобина связывать кислород снижается, увеличивается текучесть мембраны клеток. Гены, соответствующие участку белка L1 ВПЧ и участку  $\beta$ -глобина ДНК человека, обнаруживались в эритроцитарной массе пациенток с РШМ чаще, чем в плазме. Более того, было обнаружено, что характерная флуоресценция в изображениях некоторых эритроцитов не исчезает и после сеанса ЛТ. Одним словом, в результате совместного использования методов МФА, оптической, атомно-силовой и СЭМ, а также ПЦР-РВ методов исследования эритроцитов подтверждена гипотеза о вирусной природе части НРС, локализованных на поверхности эритроцита у пациентов с РШМ. Вирусы циркулируют в крови пациента, прикрепляются на поверхность эритроцитов, и

это влияет на развитие РШМ, возникновение частых рецидивов и обширного метастазирования.

*Глава 5* посвящена моделированию биофизических свойств эритроцитов, выявленных в экспериментах и представленных в третьей и четвертой главах работы, а также разработке математических моделей эмиссионных характеристик полевых и термополевых электронных катодов, которые являются источниками электронных пучков в СЭМ. В этой главе аккумулированы все основные результаты теоретических исследований автора и физико-математического моделирования.

Одной из задач моделирования было определение размера и формы пучка и основных эмиссионных характеристик термоэлектронного катода Шоттки СЭМ, находящегося под воздействием возбуждающего полевого электронную эмиссию электрического поля совместно с внешним продольным магнитным полем путем описания траектории движения «крайнего электрона» пучка (введенное автором понятие) с учетом влияния пространственного заряда электронов пучка и внешнего магнитного поля. Задача решалась с помощью системы уравнений, включающей дифференциальное уравнение движения крайнего электрона, уравнения Максвелла, уравнение непрерывности для плотности электрического тока, уравнение Ричардсона-Дэшмана с учетом эффекта Шоттки и граничных условий на границе пучок-вакуум для «крайнего электрона». Полученная система, состоящая из 18 обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка, решалась автором численно методом Рунге-Кутты с применением программного обеспечения MathCAD 15 для расчетных параметров, значения которых соответствуют требованиям исследований биологических образцов. В результате были получены значения напряженности электрического поля, плотности тока при различных условиях, разных скоростях электронов и т.д. с учетом пространственного заряда, под влиянием внешнего магнитного поля и при разных значениях индукции внешнего магнитного поля, включая и условия его отсутствия.



В этой же главе представлены оценочные модели ряда биофизических характеристик эритроцитов (поверхностный заряд, форма), которые необходимы для анализа результатов и прогнозирования формирования НРС на поверхности эритроцитов в норме и при патологии. Также предложена модель движения эритроцита в жидкости при воздействии внешнего электрического поля. В этих моделях решена задача определения зарядов наноразмерной биологической частицы, которая взаимодействует с поверхностью клетки за счет поверхностного заряда молекул плазматической мембраны эритроцита. В результате численных расчетов поверхностный заряд дисморфного эритроцита оказался равным  $q_{\text{эр пат}} = 4,95 \cdot 10^{-14}$  Кл, а заряд предполагаемых вирусов оказался примерно равным  $q_{\text{нано}} = 0,63 \cdot 10^{-17}$  Кл, т.е. приблизительный заряд одного предполагаемого вируса составил порядка  $40 e$ , где  $e$  – элементарный заряд электрона. Скорость движения измененных эритроцитов оказалась значительно ниже, чем скорость движения нормальных эритроцитов при разных условиях численного эксперимента, что подтверждается и в некоторых других экспериментальных исследованиях.

*В заключении* к диссертации представлен общий обзор и анализ основных новых научных результатов, полученных автором в ходе исследований.

*В разделе «Выводы»* сформулировано 16 конкретных выводов по результатам исследований.

*Автореферат диссертации* в целом правильно отражает постановку цели и задач исследования, изложен на 53 страницах и кратко содержит все основные результаты и выводы по диссертации, как они изложены в основном тексте диссертации. Основные результаты диссертации отражены в 41 публикации, из которых 21 статья – в центральных научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и входящих в ядро РИНЦ, и еще 7 – в других российских научных журналах. Результаты работы были в плане апробации представлены и доложены на более чем двадцати международных и всероссийских конференциях.

Научная новизна диссертационной работы Мамаевой С.Н. несомненна и определяется в плане радиобиологии по совокупности впервые полученных научных данных о наличии, природе, биофизических характеристиках и динамике НРС на поверхности эритроцитов при онкологических заболеваниях и воздействии ионизирующего излучения при проведении лучевой терапии (ЛТ), а также в модельных экспериментах с воздействием радиации на кровь обезьян. Эти новые экспериментальные данные удалось получить в исследовании благодаря предложенной и разработанной автором новой технологии визуализации НРС на базе СЭМ без напыления проводящего слоя на образец. Для ее эффективной реализации были разработаны оригинальные проблемно-ориентированные физико-математические модели формирования электронных пучков в СЭМ и определены по результатам моделирования основные необходимые эмиссионные характеристики (скорость электронов, ток пучка, размер электронного зонда и др.) термополевого и полевого электронного катодов разных конфигураций с учетом влияния пространственного заряда, управляющего и фокусирующего внешнего магнитного поля, а также особенностей взаимодействия электронного излучения с веществом с малым атомным номером (биологических образцов). Отдельно авторские физико-математические модели были разработаны для теоретического описания свойств эритроцитов при патологиях и в процессе проведения ЛТ. Эти модели впервые позволили автору теоретически оценить изменения поверхностного заряда эритроцитов и вклад в общий заряд заряда от НРС, а также смоделировать динамику движения эритроцитов под воздействием внешнего электрического поля с учетом форм и размеров эритроцитов, адсорбции НРС на их поверхности и т.п.

Практическая значимость диссертационной работы заключается в том, что создан серьезный научный задел и разработана уникальная авторская методика для дальнейшего объективного изучения механизма формирования НРС на поверхности эритроцитов при развитии онкологических заболеваний,



в том числе с учетом воздействия радиации. Дополнительно открывается возможность для разработки методик дифференциальной диагностики ряда патологий на основе мониторинга НРС, включая заболевания почек у детей с синдромом гематурии. Предложенные физико-математические модели формирования электронных пучков в СЭМ с учетом особенностей взаимодействия электронного пучка с биологическими образцами могут быть использованы для автоматизации выбора режимов работы с целью улучшения качества визуализации и создания нового программного обеспечения для СЭМ в биомедицинских исследованиях, а также для выработки рекомендаций для создания новых модификаций СЭМ для задач медицины. Собранный банк данных СЭМ-изображений эритроцитов с НРС в норме и при разных патологиях может использоваться также для образовательного процесса в качестве учебного материала для студентов медицинских ВУЗов, при подготовке медицинских физиков и специалистов смежных областей.

Достоверность полученных результатов и выводов обусловлена, в первую очередь, большим объемом экспериментального материала, не противоречащего другим известным научным данным и полученного с использованием совокупности разных современных экспериментальных методов исследования. Правдоподобность и применимость предложенных физико-математических моделей подтверждаются возможностью с их помощью обосновывать выбор режима работы СЭМ в зависимости от требуемого качества визуализации, а также объяснять экспериментальные результаты, связанные с оценкой электрофоретической подвижности эритроцитов в норме, при развитии заболеваний, в зависимости от проведения сеансов ЛТ, а также в условиях прикрепления к эритроцитам НРС, и оценить вклад в общий заряд системы эритроцит-НРС заряда от НРС.

Однако нельзя не высказать в рамках дискуссии и ряд определенных замечаний к диссертационной работе Мамаевой С.Н.:

1. По ряду разделов исследований результаты получены на статистически небольшой выборке образцов крови (Глава 2), поэтому выводы должны

носить лишь предварительный характер. Не для всех фрагментов исследования в диссертации и автореферате четко обоснованы и прописаны применяемые методы и результаты статистической обработки данных.

2. Защищаемое положение №2, фактически, состоит из двух положений: о возможности нового подхода в визуализации и о результатах, полученных с его использованием. Следовало бы разделить эти два положения.

3. В главе 5, раздел 5.1, а также в автореферате просматривается недостаточность графической иллюстрации при моделировании эмиссионных характеристик катода, что затрудняет восприятие. Так, постановка задачи рис. 5.1 в тексте диссертации проиллюстрирована в координатах Y-Z, а моделируемая траектория «крайних электронов» на рис. 5.2 - в координатах Z-X. А на рис. 5.3 ориентация катода не вполне соответствует рис. 5.1 (не по оси Z).

4. Уравнения (5.1) и (5.3) – суть одно и то же уравнение для разных значений напряженности электрического поля. Их можно было сразу объединить в одно уравнение.

5. В разделе 5.2 допущение, что напряженность приповерхностного электрического поля можно считать неизменным с изменением формы эритроцитов, слабо обосновано, особенно для случаев, отличных от нормы. Также не проиллюстрирована постановка задачи моделирования движения эритроцитов во внешнем электрическом поле.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют научной значимости, целостности и научной новизны диссертационного исследования. Диссертация полностью отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.1. «Радиобиология» (по физико-математическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой



степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Мамаева С.Н. заслуживает присуждения ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 1.5.1. – Радиобиология.

Официальный оппонент:

доктор технических наук, доцент,  
заведующий лабораторией медико-физических исследований,  
Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»

РОГАТКИН Дмитрий Алексеевич

13.01.2025