

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»

Диссертация Мамаевой С.Н. посвящена актуальной теме современной радиобиологии - разработке новых подходов для выявления молекулярных и клеточных механизмов формирования злокачественных новообразований, их диагностики и терапии. Действительно, по результатам анализа заболеваемости населения территорий РФ злокачественными новообразованиями и смертности от них в 2023 г. было выявлено 674 587 случаев, а рост данного показателя составил 8,0%. Как правило, основными причинами роста числа злокачественных новообразований являются увеличение продолжительности жизни, изменения образа жизни и воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды. Однако, в полной мере не оценен вклад вирусной этиологии формирования злокачественных новообразований, хотя и существуют прямые доказательства связи некоторых видов рака, например, рака шейки матки (РШМ) с вирусом (вирус папилломы человека, например, 16 и 18 типов – ВПЧ).

Несмотря на существующие современные высокотехнологичные методики диагностики и терапии смертность от злокачественных новообразований по многим видам раковых заболеваний не снижается и, как отмечает Мамаева С.Н., совершенствование методов распознавания болезни, особенно на молекулярном уровне требует дальнейшего развития. В настоящее время, для диагностики онкологии обязательным является верификация злокачественных новообразований методами гистологического исследования структуры тканей опухоли, полученных методом биопсии, с помощью оптической микроскопии, а также и иммуногистохимии для подтверждения диагноза, поставленного с использованием технологий медицинской визуализации (УЗИ, магнитно-резонансная, рентгеновская компьютерная томография и др.). Таким образом, диагностика формирования злокачественных новообразований является многоэтапной, сложной и занимает достаточно много времени. Кроме того, существующие методы исследования в биомедицине также представляют собой сложные комплексные процедуры как на предварительных этапах подготовки клеток и молекулярных образцов, так и на этапах проведения экспериментов и анализа результатов исследования.

Необходимо отметить, что процесс терапии пациента сопровождается постоянной диагностикой стадии заболевания. Поэтому очевидно, что важно иметь эффективную и рентабельную программу диагностики злокачественных новообразований до и после проведения терапии. Классическим и эффективным методом терапии раковой опухоли является лучевая терапия (ЛТ). Поэтому разработка новых методов исследования и диагностики клеточных структур после лучевого воздействия представляется важным и актуальным.

Считаю, что актуальность данной диссертационной работы заключается в том, что Мамаева С.Н., сформировала новый молекулярный и клеточный подход в исследовании, диагностики и терапии ряда типов онкологических заболеваний. Диссертационная работа Мамаевой С.Н. представлена на 325 страницах и включает 148 рисунка и 6 таблиц. Работа состоит из введения, 5 глав, выводов и заключения. Список литературы включает 371 наименование.

Во введении автором представлено обоснование актуальности темы работы, информация о результатах существующих исследований наличия в крови и в других биологических жидкостях вирусов и везикул (экзосом), и проблемах, связанных с тем, что в настоящее время не существует надежных данных, подтверждающих роль наноструктурных изменений рельефа поверхности эритроцитов крови в развитии патологии, в том числе раковых заболеваний.

Считаю, что автором логично сформулированы цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, научная новизна, теоретическая и практическая значимость. Мамаевой С.Н. описан комплекс современных методов исследования, использованных в работе, с помощью которых были получены основные результаты данного исследования (СЭМ, атомно-силовой микроскопии (АСМ), спектроскопии комбинационного рассеивания (КР-спектроскопия) и ИК-спектроскопия, иммунофлуоресцентный анализ и т.д.). Дано краткое описание структуры диссертации и содержания основных разделов.

Глава 1 представляет собой обзор литературы, который анализирует применение электронной микроскопии в исследованиях проблем биомедицины, физические основы СЭМ, существующие методы подготовки объекта для исследования методом СЭМ. Особый интерес, на мой взгляд, представляет профессиональный анализ Мамаевой С.Н. данных литературы, связанный с моделированием электронно-оптических систем, которые могут быть применены для понимания физических процессов формирования электронного зонда с определёнными характеристиками, разработки новых модификаций микроскопов с целью улучшения их разрешающей способности, улучшения качества изображения.

Глава 2 посвящена методологии и методам исследования, используемых в данной работе. Мамаева С.Н представляет подробное описание методик выделения, инкубации объектов исследования, современные приборы и методы исследования. В качестве объектов исследования в работе использовались образцы крови большого количества пациентов, в том числе с диагнозом РШМ. В тексте диссертации автор четко описывает специфику подготовки образцов, которая зависела от конкретного метода исследования: сухие мазки крови для СЭМ, АСМ и ИК спектроскопии и КР спектроскопия. Отмечу, что в связи с задачами работы, анализ полученных результатов при исследовании крови обезьян и человека был проведен как на нано -, так и на микроуровнях (на молекулярном) уровнях. Например, в своей работе Мамаевой С.Н. были использованы образцы крови животных – обезьян при исследовании влияния ионизирующего излучения (ИИ) на организм млекопитающих, которые были облучены тотально (суммарная доза 50 сЗв) на установке УПГД 2М с источником излучения ^{137}Cs , а влияние ИИ на эритроциты исследовали после проведения дистанционного (линейные ускорители электронов Elekta Synergy, 6 МэВ) и контактного (MultiSource HDR с источником ^{60}Co) ЛТ (суммарная доза 45-50 Гр) воздействия.

Глава 3 диссертационной работы Мамаевой С.Н описывает проведенные экспериментальные исследования, связанные с определением и выбором оптимального режима работы СЭМ для исследования биологических образцов в норме и при патологии. Автором, доказано, что при исследованных видов патологии на поверхности эритроцитов крови и в других биологических жидкостях обнаружены наноразмерные структуры (НРС), сопоставимые с размерами экзосом и вирусных частиц. Отмечу, что Мамаевой С.Н впервые с помощью СЭМ были получены изображения НРС на поверхности эритроцитов, а успех эксперимента был, конечно, связан с разработкой и использованием оригинального дизайна проведения эксперимента и внедрения дополнительных параметров детектирования вторичных электронов нижним детектором при определённых значениях низкокиловольтных ускоряющих напряжений (1-2 кВ), рабочего расстояния (3,7-3,9 мм) при условии использования стеклянных подложек (20x20 мм) с мазками крови толщиной примерно 2 микрона без нанесения на образцы проводящего покрытия. Очевидно, что полученный важный результат идентификации НРС обусловлен повышением эффективности и качества изображения путем использования для объекта подложек из материалов различного состава: кристаллов кремния, восстановленного оксида графена (ВОГ), ВОГ с наночастицами серебра (СНЧ) и стеклянные подложки, напылённые титаном. В ходе работы было доказано, что максимальное увеличение и качество изображения достигается при использовании ВОГ с СНЧ с наименьшим значением удельного

сопротивления ($4 \cdot 10^{-5}$ Ом · см). В связи с этим, автором были получены изображения НРС без уменьшения разрешающей способности при увеличении в 100.000 раз.

Считаю логичным и правильным, что в третьей главе Мамаевой С.Н. были представлены результаты исследования морфологии эритроцитов, наличия на их поверхности НРС при различных патологиях с применением СЭМ с установленным режимом работы и проведено сравнение с результатами, полученные другим методом – АСМ. Результаты АСМ исследований образцов крови, подтверждают наличие НРС на поверхности эритроцитов, свидетельствуя об отсутствии артефактов, связанных с действием эжекторов СЭМ на объект: линейные размеры НРС, полученные с помощью СЭМ и АСМ, сопоставимы 30-300 нм. В этой главе также представлены результаты исследования состояния молекул эритроцитов (гемоглобин и каротиноиды плазмы), а также и НРС с помощью КР и ИК спектроскопии. Полученные результаты подтверждают наличие молекулярных изменений в эритроцитах, связанные с изменением морфологии эритроцитов и появлением на их поверхности НРС. Автором получена большая база СЭМ изображений эритроцитов и НРС в крови, а также НРС в других биологических жидкостях при различных патологиях.

В Главе 4 Мамаева С. Н. описывает оригинальный и важный материал, посвященный исследованию морфологии эритроцитов и НРС на их поверхности во время проведения ЛТ. Доказано, что при действии радиации, в режимах, используемых при лучевой терапии опухоли, меняется морфология эритроцитов, а также количество и размеры НРС. При ЛТ в крови пациентов было обнаружено увеличение количества НРС, размеры которых были сопоставимы с размерами экзосом. В данной работе отмечается наличие различий НРС, т.е. разделение их на экзосомы и вирусные частицы (вирусы), что более отчетливо проявляется именно во время проведения ЛТ.

В данной главе также производится изучение и сравнение элементного состава НРС в патологии, до и после ЛТ несколькими способами: элементный анализ методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии в СЭМ; химических соединений методом КР спектроскопии; обнаружение ДНК ВПЧ 16 и 18 типов методами ПЦР-РВ и иммунофлуоресцентного анализа. Для определения специфических и характерных изменений эритроцитов крови под воздействием радиации были исследованы образцы крови обезьян при их тотальном облучении (суммарная доза 50 сЗв) с использованием КР спектроскопии. Сопоставление результатов подтверждает данные, полученные при исследовании крови пациентов с диагнозом РШМ, проходивших ЛТ, например, изменение конформации гема гемоглобина человека при действии ИИ.

Глава 5 посвящена результату моделирования электронно-оптических систем СЭМ, с помощью которого можно определять основные эмиссионные характеристики полевых, термополевых катодов, формирующих электронный пучок — зонд СЭМ, от параметров которого зависят такие важные показатели СЭМ, как разрешающая способность. Мамаевой С.Н. предложены и апробированы основные характеристики электронных пучков термополевого катода Шоттки с учетом формы и размера эмитирующей поверхности, внешнего электрического и магнитного полей, и вольтамперные характеристики для полевых катодов. Отмечу, что численная реализация сформированных автором моделей, состоящих из 18 обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка методом Рунге-Кутты 4 порядка убедительно свидетельствует о зависимости форм и размеров пучка от начальных значений электрического поля (приповерхностного значения) и начальных скоростей электронов, магнитной индукции внешнего магнитного поля и пространственного заряда пучка.

В этой главе также представлены сформированные автором модели электрических характеристик эритроцитов при взаимодействии с НРС, и также параметры, контролирующие мобильность эритроцитов во внешнем электрическом поле. По мнению автора, адсорбция НРС на поверхности эритроцитов может зависеть от электростатических взаимодействий мембраны эритроцита и НРС, а также от соответствия формы и размеров рельефа поверхности мембраны эритроцита и НРС. Вероятно, контроль за динамикой изменения морфологии эритроцитов под воздействием внешнего электрического поля в норме, при патологии и под воздействием радиации может быть использован как для проведения экспериментальных исследований с помощью микроэлектрофореза эритроцитов, так и для создания нейросети для анализа данных СЭМ с помощью искусственного интеллекта.

Итак, научная новизна диссертационной работы Мамаевой С.Н. несомненна и определяется большим количеством новых и достоверных результатов о наличии НРС на поверхности эритроцитов в патологии и под воздействием ИИ. Автором предложены и апробированы новые подходы в проведении экспериментальных исследований морфологии эритроцитов мазков крови и наличия НРС в крови методом СЭМ, а также использованы в качестве подложек ВОГ с НРС; разработаны методики исследования состава НРС в крови в патологии (РШМ, рак молочной железы (РМЖ)) и при воздействии радиации в ходе лучевой терапии с помощью методов энергодисперсионного анализа в СЭМ, ПЦР в реальном времени и иммунофлуоресцентного анализа; доказана целесообразность применения КР- и ИК- спектроскопии в исследованиях молекул и их конформации в эритроцитах крови при патологии и воздействии радиации на организм человека с учетом

наличия НРС, а также разработаны математические модели, процесса повышения эффективности и размещающей способности СЭМ и состояния эритроцитов в электрическом поле.

Автор предложил и доказал возможность применения метода электронной микроскопии крови для получения дополнительной информации о динамике развития патологии и действии ионизирующего излучения при ЛТ. Изучение патологии и влияния радиации на организм человека при ЛТ с помощью электронной микроскопии стало возможным в связи с разработкой Мамаевой С.Н. новых эффективных способов фиксации и исследования мазков крови после забора крови из вены или из пальца, что является менее инвазивным методом по сравнению с биопсией.

Считаю, что Мамаевой С.Н. сформировано новое направление диагностики и оценки терапии злокачественных новообразований при использовании ЛТ, что, существенно дополнит современные представления о влиянии радиации на организм человека в норме и при патологии.

Практическая значимость диссертационной работы заключается в том, что формирование и реализация представленных в диссертации моделей формирования электронного пучка в электронно-оптической системе позволит в дальнейшем разработать программные обеспечения для формирования зонда СЭМ с оптимальными параметрами и повысить качество изображения в зависимости от типа биообразца. Дальнейшее детальное математическое моделирование формирования электронного пучка с необходимыми параметрами на основе разработанной основной части электронно-оптической системы будет способствовать развитию новых поколений СЭМ с различными конфигурациями и с требуемыми характеристиками.

Под руководством и с участием Мамаевой С.Н. в лаборатории «Графеновые нанотехнологии» СВФУ были разработаны и использованы наноструктурированные графеновые и другие виды подложек с малыми удельными сопротивлениями в исследованиях биообразцов методом СЭМ, которые, на мой взгляд, необходимо внедрять в серийное производство для применения СЭМ в исследованиях биообразцов на нанометровом уровне молекулярных клеточных систем.

Под руководством и с участием Мамаевой С.Н. в лаборатории биотехнологии Технопарка «Якутия» были разработаны и использованы методики выделения ДНК в НРС на эритроцитах методом ПЦР-РВ и иммунофлуоресцентного анализа, которые могут использоваться для формирования новых методик диагностики онкологических заболеваний (РМЖ и РШМ на ранней стадии), а также оценки эффективности ЛТ и влияния радиации на организм человека, развития нового направления в исследовании роли

эритроцитов в развитии онкологического процесса за счёт распространения болезни с помощью экзосом или вирусов. Мамаевой С.Н. получена и представлена база данных СЭМ изображений эритроцитов при патологии и воздействием ИИ, которые в дальнейшем могут быть применены для машинного обучения для автоматизации определения видов дисморфии эритроцитов в патологии и при ЛТ.

Достоверность полученных Мамаевой С.Н. результатов и выводов обусловлена большим количеством обоснованных экспериментальных исследований, большого количества биологических образцов пациентов, связь с клиникой, а также использование современных методов исследования, использованием современных расчетных методов. Представленные в диссертации данные о НРС согласуются с опубликованными в литературе.

В рамках дискуссии хочу сделать следующие замечания и комментарии к результатам, описанным в диссертационной работе:

1. В главе 4, представлены результаты исследования НРС в образцах мазков крови на стеклянных подложках во время проведения ЛТ, но не представлены результаты СЭМ изображений НРС, обнаруженные в плазме, с использованием других подложек;
2. В тексте диссертации нужно было дать более подробный анализ влияния радиации на морфологию эритроцитов и количества НРС в крови в зависимости от стадии заболевания.
3. В главе 5 было бы целесообразно рассмотреть и сравнить результаты расчетов моделей электронных пучков, отличающиеся не только по значениям электрических и магнитных полей, конфигурациям катодов СЭМ, но и отличающиеся по структуре электронно-оптических систем СЭМ, что позволило бы продемонстрировать возможности моделей для их усовершенствования в дальнейшем при разработке дополнительных программных обеспечений контроля формирования электронных пучков.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования, полученных результатов и их анализа. Текст автореферата полностью отражает содержание диссертации. Результаты работы были представлены в более чем двадцати международных и всероссийских конференциях. Основные результаты диссертации отражены в 21 статье в журналах, индексируемых в Web of Science, Scopus и входящих в ядро РИНЦ.

Диссертация Мамаевой С.Н. 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, профессор,

гл. специалист научно-исследовательского отделения « Голография и оптическая томография, нанотехнология и наноматериалы»,

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений»

ЛЕВИН Геннадий Генрихович

подпись

14.01.2025 Дата подписания