

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора физико-математических наук Захарова Валерия Павловича на диссертационную работу Хилова Александра Владимировича «Двухволновая флуоресцентная визуализация для задач фотодинамической терапии», представленной на соискание учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.4 – радиофизика

Актуальность

Флуоресцентные методы оптической диагностики нашли широкое применение в экспериментальных биомедицинских исследованиях и активно внедряются в клиническую практику. Биосовместимость флуоресцентных маркеров и высокая контрастность получаемых изображений вместе с экономической эффективностью и низкими требованиями к инфраструктуре делают флуоресцентную визуализацию крайне привлекательной для применения.

Среди экзогенных флуоресцентных маркеров особое место занимают фотосенсибилизаторы – вводимые в организм препараты для проведения процедуры фотодинамической терапии (ФДТ), заключающейся в фотоактивации введенного в организм препарата. Наличие у фотосенсибилизаторов флуоресцентных свойств открывает возможность для воплощения принципов тераностики, т.е. осуществления терапевтического воздействия с одновременным диагностическим контролем. Одной из важных физических задач эффективной реализации ФДТ является априорная оценка глубины накопления фотосенсибилизатора для автоматического выбора дозы воздействия. Для решения данной проблемы необходимо развитие методов и моделей описания взаимодействия мультиспектрального излучения с биосредами, учитывающими как существенную экстинкцию воздействующего излучения, так и неоднородность оптических свойств и пространственного распределения флуорофоров в биоткани. В настоящее время не существует простых и технически легко реализуемых способов подобной оценки. Это определяет актуальность исследования, представленного в диссертационной работе А.В. Хилова, посвященной разработке и экспериментальной апробации метода оценки распределения флуорофора по глубине в биоткани на основе двухволновой флуоресцентной визуализации.

Научная новизна

В диссертационной работе предложен метод оценки глубины локализации слоя флуорофора внутри биоткани не требующий дополнительной калибровки при проведении ФДТ, основанный на аналитическом выражении в предложенной автором полуэмпирической модели переноса излучения в диффузионном приближении для

соотношения интенсивностей флуоресценции на двух длинах волн, соответствующих полосам флуоресцентного возбуждения исследуемой среды.

Предложены и апробированы многослойные флуоресцирующие агаровые фантомы, имитирующих оптические свойства кожи в диапазоне длин волн 400-1000 нм до и после поверхностного нанесения и внутривенного введения ФС хлоринового ряда, для задач планирования и мониторинга ФДТ.

Предложен метод оценки локализации флуорофора на основе данных двухволновой флуоресцентной визуализации средней глубины проникновения ФС хлоринового ряда в здоровую и патологическую кожу лабораторных животных и человека в *in vivo* экспериментах. Установлены различия в динамике отношения флуоресцентных сигналов, соответствующих длинам волн возбуждения 660 нм и 405 нм при ФДТ тканей лабораторных животных, а также актинического кератоза и базальноклеточного рака кожи человека в клинических условиях.

Значимость результатов, полученных в диссертации, для науки и практики

Научная значимость работы обусловлена разработкой новых методов оценки локализации флуорофора в исследуемой среде на основе данных двухволновой флуоресцентной визуализации, подтвержденных результатами математического моделирования, натурными экспериментами на фантомах, а также *in vivo* экспериментальными исследованиями процесса ФДТ на лабораторных животных и коже человека.

Практическая значимость работы обусловлена применимостью разработанных в диссертации методов анализа, оценки и идентификации глубины локализации распределение хлоринового флуоресцирующего слоя в биоткани, что позволяет качественно и количественно оценивать эффективность процедуры ФДТ и обеспечить персонализацию данной процедуры лечения.

Общее содержание работы

Структурно диссертационная работа состоит из введения, четырёх глав, заключения и списка литературы.

Во **введении** обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы поставленные цели и задачи, отмечены научная новизна, практическая значимость диссертации, личный вклад автора, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, а также приведено краткое содержание работы и описана её апробация.

В **первой главе** представлен аналитический обзор современного состояния флуоресцентных методов визуализации, отмечено их место в биомедицинских приложениях, в частности, в контроле процедуры фотодинамической терапии. Отмечается

потенциал флуоресцентных методов в задаче оценки локализации флуорофора по глубине в средах с существенной дисперсией оптических свойств, каковыми являются биоткани.

Во **второй главе** соискателем предложена аналитическая модель формирования регистрируемого системой флуоресцентной визуализации сигнала от флуорофора, объемно распределённого в биоткани. Для однородного распределения флуорофора в приповерхностном слое биоткани получено аналитическое выражение для интенсивности флуоресценции. На основе разработанной модели предложен ратиометрический подход оценки глубины локализации в биоткани флуорофора и толщины приповерхностного слоя биоткани, содержащего флуорофор, на основании отношения флуоресцентных сигналов на двух длинах волн возбуждения, соответствующих пикам в спектре поглощения флуорофора.

Полученные теоретические результаты для флуоресцентных сигналов и их отношения в случае равномерного распределения фотосенсибилизатора хлоринового ряда в приповерхностном слое кожи хорошо согласуются с результатами численного моделирования Монте-Карло. Автором показано, что предложенный метод позволяет оценить толщину приповерхностного слоя с фотосенсибилизатором хлоринового ряда до 2 мм, исследовано влияние вариаций оптических свойств окружающей биоткани на точность подобной оценки. В рамках численного моделирования также изучен вопрос о возможности оценки глубины локализации флуорофора при его внутреннем позиционировании в биоткани или при его неоднородном распределении внутри слоя. Важно подчеркнуть, что предложенный метод является довольно общим, и хотя он апробирован для конкретной биоткани и фотосенсибилизатора, он легко обобщается на другие флуоресцентные маркеры и биоткани с известными спектральными характеристиками.

В **третьей главе** автором для натуральных испытаний предложены слоистые флуоресцирующие агаровые фантомы биоткани, позволяющие имитировать реальные биоткани до и после введения в них флуоресцентного маркера. Использование красной туши и липофундина в качестве поглощающей и рассеивающей компонент позволило с удовлетворительной точностью воспроизвести оптические свойства кожи человека, измеренные *in vivo*. Проведён модельный эксперимент по двухволновой флуоресцентной визуализации с использованием разработанных фантомов, результаты которого согласуются с представленными во второй главе теоретическими моделями и результатами численного моделирования. По данным двухволновой флуоресцентной визуализации автором проведены оценки толщины приповерхностного флуоресцирующего слоя в составе фантома для толщин до 2 мм.

Четвёртая глава диссертации представляет собой обобщение результатов серии *in vivo* экспериментов по двухволновому флуоресцентному мониторингу фотодинамической терапии здоровых и патологических тканей лабораторных животных и человека.

Двухволновая флуоресцентная визуализация впервые позволила оценить характер фотовыгорания фотосенсибилизатора при различных режимах фотодинамической терапии, т.е. при использовании терапевтического излучения на разных длинах волн и с различными световыми дозами, доставляемыми к поверхности биоткани. По зарегистрированным отношениям флуоресцентных сигналов с использованием предложенного во второй главе метода проведены оценки глубины проникновения фотосенсибилизатора в биоткань при его поверхностном нанесении. Результаты соответствуют типичным значениям толщины эпидермиса соответствующих локализаций и согласуются с имеющимися литературными данными. Исследована динамика флуоресцентных свойств среды до, в процессе и после процедуры ФДТ, что позволило обеспечить визуализацию всего процесса биодegradации опухолей.

В заключении сформулированы основные результаты диссертации.

Степень обоснованности и достоверности положений, выводов и заключений.

Автор корректно использует известные научные методы, приводит четкие обоснования полученных результатов, выводов и рекомендаций. Автором изучены и проанализированы научные работы по математическому моделированию и описанию процессов ФДТ для различных технологических протоколов и режимов работы. Список использованной литературы содержит 181 наименование, включая самые современные источники.

Достоверность результатов работы обеспечивается за счёт использования сертифицированных приборов, строгости методов математического анализа, а также хорошим соответствием расчетных значений и результатов *in vivo* экспериментов по оценке локализации флуоресцентного слоя в различных режимах работы ФДТ.

Основные результаты диссертации опубликованы в 26 научных работах, в том числе, в 10 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для публикации основных материалов диссертации. Автор неоднократно выступал на ведущих международных и всероссийских конференциях.

В целом диссертация производит очень хорошее впечатление. Проведен очень большой объем математического моделирования и экспериментальных исследований. Хочется отметить тщательность проведения расчета процедуры ФДТ в разных режимах работы, всесторонний анализ условий применения и погрешностей метода оценки локализации опухоли при двухволновой флуоресцентной визуализации. Автор хорошо владеет как методами экспериментальной техники, так и самыми современными математическим аппаратом.

Диссертация написана доступным и понятным языком, хорошо иллюстрирована и в полной мере структурирована. Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертации. Работа написана грамотно и достаточно аккуратно оформлена. По каждой главе и работе в целом сделаны четкие выводы.

По содержанию диссертационной работы, тем не менее, можно сделать ряд замечаний:

1. В обзорном анализе и при описании приближенной полуэмпирической модели взаимодействия излучения со средой с флуорофорами, автору следовало провести сравнение предложенной им модели с ранее известными приближенными моделями, используемыми в работах В.В.Тучина, С.Р.Утца, А.Н.Башкатова (решение уравнения переноса), J.Spigulis (диффузионное приближение), И.А. Братченко (разложение по малому параметру), А.Н. Артемьева (аппроксимация решения Монте-Карло).
2. При оценке погрешности определения толщины слоя в зависимости от оптических свойств биоткани следовало бы учитывать наличие пигментов, преимущественно располагающихся в области папиллярной дермы, т.е. на глубине ~100-200 мкм, которые наряду с поглощением обладают высоким уровнем автофлуоресценции, причем преимущественно под действием синего излучения, что может искажать значение радиометрического коэффициента. Причем эта погрешность будет иметь неоднородный характер, ввиду неоднородности распределения пигментов.
3. На рис.2.13 представлена зависимость отношения флуоресцентных сигналов от глубины залегания z_0 , из которого следует, что для малых глубин разброс значений будет существенно зависеть от толщины слоя (разброс более 50% в зависимости от толщины флуоресцентного слоя). В этом случае какое влияние будет оказывать на эту величину разброс в оптических характеристиках биоткани? Даст ли это возможность достоверно определять z_0 ?
4. Известно, что характеристики биоткани существенно зависят от степени ее гидратации. В связи с этим возникает вопрос: насколько изготовленный фантом гигроскопичен? Не влияла ли влажность окружающей среды в процессе экспериментов на его характеристики? Из материалов диссертации не понятно каким образом это стандартизировалось.
5. Причиной снижения интенсивности флуоресценции в проекции области опухоли по сравнению с окружающей тканью через сутки после ФДТ может быть не только снижение кровотока в области опухоли, но и существенное изменение коэффициентов поглощения и рассеяния в этой области из-за биodeградации. Для однозначной оценки этого фактора следовало бы проводить мониторинг интенсивности флуоресценции более длительное время (1-2 недели), в течении которого процессы биodeградации нивелируются за счет естественных биологических процессов.
6. В работе присутствует ряд недочётов оформления, в частности
 - Подпись к рисунку 2.3 располагается на двух страницах;
 - Подписи к рисункам 2.4 и 2.5 абсолютно тождественны и относятся к случаю вариации коэффициента поглощения, в связи с чем приходится только по тексту

диссертации догадываться, что на рис.2.4 представлены данные для вариации коэффициента рассеяния;

- Цвета графиков рисунка 2.7 отличаются от используемых в тексте диссертации;
- используется неудачный термин «рецепт изготовления» вместо «технология/методика».

Отмеченные недостатки не являются существенными и не снижают качество диссертационной работы.

Содержание диссертации полностью соответствует специальности 1.3.4 – радиофизика и отвечает требованиям п.9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук.

На основании этого считаю, что автор диссертационной работы, Хилев Александр Владимирович, заслуживает присуждения учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.4 – радиофизика.

Я, Захаров Валерий Павлович, даю согласие на включение моих персональных данных в аттестационные документы соискателя ученой степени кандидата физико-математических наук, Хилова Александра Владимировича, и их дальнейшую обработку.

д.ф.-м.н., профессор,
заведующий кафедрой лазерных и
биотехнических систем Федерального
государственного автономного
образовательного учреждения высшего
образования «Самарский национальный
исследовательский университет имени
академика С.П. Королёва»
443086, г. Самара, ул. Московское шоссе, 34
zakharov@ssau.ru
тел. +7 (846) 267-45-50

Захаров Валерий Павлович
2 февраля 2023 г

Диссертация Захарова В.П. на соискание
учёной степени доктора физико-
математических наук защищена по
специальности 01.04.01 – Приборы и методы
экспериментальной физики.

Подпись д.ф.-м.н., профессора
Захарова В.П. заверяю:

Учёный секретарь Самарского национального
исследовательского университета имени
академика С.П. Королёва



Васильева Ирина Павловна