

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

Ефименко Анастасии Юрьевны на диссертационную работу Родимовой Светланы Алексеевны «Флуоресцентная, ГВГ и FLIM микроскопия печени при патологии и регенерации», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук в специализированный диссертационный Совет 24.2.340.06 при Национальном исследовательском Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского, по специальности 1.5.2 — «Биофизика».

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Родимовой С.А. посвящена актуальной проблеме оценки состояния печени и ее регенераторного потенциала после хирургической резекции. Для этого в исследовании использованы интересные современные методы многофотонной микроскопии в режимах флуоресцентной, ГВГ и FLIM микроскопии. Согласно статистике, ежегодно во всем мире регистрируется свыше миллиона новых случаев первичных и вторичных опухолей печени. Наиболее часто используемым и наиболее эффективным методом лечения по-прежнему считается хирургическая одно- или двухэтапная резекция. Несмотря на постоянно развивающиеся методы и подходы к предоперационной оценке объёма и функционального состояния печени, остаётся высокая вероятность развития тяжёлой пострезекционной печёночной недостаточности, особенно при наличии сопутствующей патологии.

Оценка безопасного объёма резекции основывается на результатах биохимического анализа крови, гистологических и иммуногистохимических исследований, а также на данных таких методов как УЗИ, КТ, МРТ и эластографии. Однако ни один из перечисленных подходов не даёт возможности заранее оценить регенераторный потенциал печени. В качестве чувствительного показателя состояния органа рассматривают энергетический метаболизм гепатоцитов.

Современные методы многофотонной микроскопии позволяют оценивать структуру ткани печени в режиме реального времени без дополнительной обработки, что позволяет эффективно выявлять наличие, характер и стадию печеночной патологии. Кроме того, FLIM микроскопия позволяет исследовать метаболические изменения в гепатоцитах, включая оценку двух ключевых путей получения клеткой энергии – гликолиз и окислительное фосфорилирование. Полученные данные позволят хирургу оценить качество печени и спрогнозировать эффективность восстановления органа. Всё это определяет безусловную актуальность работы.

Достоверность и обоснованность результатов работы

В представленной диссертации автор систематизировала и проанализировала результаты собственных исследований, проведённых с тщательным соблюдением корректных методик и подходов. Полученные данные корректно проанализированы с использованием релевантных методов статистического анализа. Основные научные положения и выводы работы логично вытекают из полученных результатов и четко обоснованы, а автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Научная новизна работы

В диссертационной работе впервые предложена методика, основанная на комплексном применении методов многофотонной микроскопии. Кроме того, автором подобраны оптимальные параметры для анализа свежих образцов печёночной ткани, при которых можно корректно проводить оценку изменений метаболизма клеток печени с помощью микроскопии. Разработанная методика позволила оценить регенераторный потенциал печени как в норме, так и на различных стадиях патологии (стеатоза и фиброза). Также впервые с применением разработанного подхода были определены характерные особенности структуры ткани печени на разных стадиях стеатоза и фиброза и на разных этапах регенерации в норме и на фоне сопутствующей патологии. Разработанная методика позволит проводить прогнозировать скорость восстановления печени с помощью интраоперационного анализа перед проведением резекционных вмешательств.

Практическое значение результатов работы

Практическая значимость полученных результатов обусловлена тем, что в ходе исследования были выявлены новые фундаментальные сведения об особенностях состояния печени и метаболического статуса гепатоцитов в норме, при патологии, и при регенерации на фоне патологии. Разработанные подходы к оценке состояния печени и метаболизма гепатоцитов с использованием многофотонной микроскопии в разных режимах, включающих флуоресцентную, ГВГ и FLIM микроскопию, которые потенциально могут применяться в клинической практике для интраоперационной экспресс-оценки состояния печени при планировании резекции. Полученные результаты также могут быть включены в специализированные курсы и лекции по биофизике, биомедицине, биохимии, патофизиологии, гепатологии и применены при разработке новых препаратов, направленных на коррекцию метаболического статуса гепатоцитов и повышения эффективности регенерации.

Личный вклад автора

Автором лично спланирован и проведён комплекс экспериментальных исследований, в том числе моделирование регенерации и патологии печени, а также выполнен анализ всех собранных данных. Разработана методика оценки состояния печени, основанная на многофотонной микроскопии в режимах флуоресцентной, ГВГ и FLIM микроскопии. Проведён подбор оптимальной модели аппроксимации кривой затухания флуоресценции НАД(Ф)Н, а также условий, обеспечивающих корректный анализ данных FLIM микроскопии. Автор принимал непосредственное участие в обсуждении результатов и в подготовке научных статей и докладов на научных конференциях.

Печатные работы, опубликованные по материалам диссертационной работы

По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ в виде полнотекстовых статей в журналах, индексируемых Web of Science и Scopus и входящих в перечень ВАК, а также 33 публикации в сборниках материалов научных конференций.

Анализ основного содержания работы

Структура диссертации выстроена по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, детальное описание использованных в работе материалов и методов, результаты и их анализ, заключение, выводы, а также перечень процитированных источников. Во введении обоснована значимость рассматриваемой темы, чётко сформулированы цель и задачи исследования, приведён перечень основных выводов, демонстрирующих её научную новизну и практическую значимость, приведен перечень положений, выносимых автором на защиту.

Литературный обзор посвящён ключевым вопросам регенерации печени, методам оценки её состояния, роли НАД(Ф)Н в энергетическом обмене клеток, а также принципам, лежащим в основе многофотонной, ГВГ и FLIM микроскопии. Он достаточно полно описывает предпосылки диссертационного исследования, выстроен логично и содержит всю необходимую информацию для составления представления о предмете и методологии работы. Список литературы включает в себя 183 источника, преимущественно зарубежных.

Во второй главе детально рассмотрены объекты исследования, используемые реактивы и приборное оснащение. Кроме того, представлены методики, обеспечившие проведение экспериментальной части работы, в том числе подробные описания дизайна исследований на экспериментальных животных моделях.

В третьей главе приведены результаты проведенных исследований и их обсуждение. Описана разработанная методика, позволяющая оценивать стадию патологических изменений печени и её потенциал к восстановлению на основе современных методов многофотонной микроскопии в режимах флуоресцентной, ГВГ и FLIM микроскопии. Для этого были оптимизированы условия исследования образцов печени *ex vivo* и подобрана адекватная модель аппроксимации кривой затухания флуоресценции НАД(Ф)Н, что позволило корректно анализировать данные FLIM микроскопии. Применение данной методики позволило установить ряд характерных микроскопических признаков нормальной печени до резекции и в процессе регенерации. Показано, что для нормальной печени на всех этапах регенерации характерно равномерное распределение сигнала флуоресценции НАД(Ф)Н, также низкие значения интенсивности сигнала от второй гармоники коллагена и высокие значения вкладов времен жизни флуоресценции связанной формы НАДН (параметр a_2) и НАДФН (параметр a_3). При этом важным изменением является наличие выраженного увеличения значений a_2 и a_3 на 3 день регенерации, что является ключевым критерием эффективной регенерации. Дальнейшим этапом работы стало выявление микроскопических признаков печени при стеатозе и фиброзе, и при регенерации на фоне этих патологий. Общими микроскопическими признаками для стеатоза и фиброза стало появление зон со сниженным сигналом флуоресценции НАД(Ф)Н, которые были ассоциированы с зонами липидной инфильтрации и скоплением коллагена. ГВГ микроскопия позволила выявить и количественно оценить накопление коллагена в ткани, которое было наиболее выражено при фиброзе. В режиме FLIM микроскопии при стеатозе отмечено отсутствие значимого роста a_2 и a_3 на третий день регенерации при всех стадиях патологии. При фиброзе на стадии F1 по Metavir, также не зафиксировали существенного повышения значений a_2 и a_3 на третий день регенерации, однако при стадиях F2–F3 по Metavir наблюдался рост a_3 на третий день регенерации. Таким образом, изменения, выявленные в режимах флуоресцентной и ГВГ микроскопии обусловлены стадией патологии, тогда как в режиме FLIM возможно оценить восстановительный потенциал печени на промежуточном этапе регенерации. Все полученные результаты обстоятельно обсуждены и сопоставлены с данными других авторов.

В заключительной части работы автор в сжатой форме излагает ключевые этапы исследования и суммирует полученные результаты, сопоставляя их с имеющимися литературными сведениями.

Выводы достоверно отражают полученные данные и в полной мере соответствуют заявленным целям и задачам исследования.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации и автореферата

Диссертация Родимовой С.А. выполнена в соответствии с классическими требованиями. В обсуждении автор детально анализирует полученные результаты, сопоставляя их с данными мировой литературы, что позволяет сформировать целостное представление о проделанной работе и определить место полученных выводов в контексте современных исследований по данной проблематике. Диссертация логично выстроена и прекрасно иллюстрирована.

Основные положения работы доложены и обсуждены на научно-практических конференциях и съездах в России (Нижний Новгород, Москва, Сочи, Самара, Санкт-Петербург) и за рубежом (Турция, Греция), где 4 доклада были отмечены наградой за лучшее выступление. По результатам работы опубликовано 11 научных статей в журналах, индексируемых в международных базах цитирования Web of Science и Scopus, и 33 тезиса в сборниках конференций.

Автореферат в полной мере отражает содержание ключевых разделов диссертации и собственные результаты автора. В нём последовательно раскрыты актуальность темы, цели и задачи исследования, научная новизна и научно-практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту, а также объекты и методы исследования, основные итоги работы и их обсуждение, заключение, выводы и список опубликованных по теме диссертации работ.

Существенных замечаний к диссертационной работе Родимовой С.А. нет. Однако, при ознакомлении с диссертацией и авторефератом возникли некоторые вопросы и комментарии.

1. Результаты диссертационного исследования позволяют предлагать принципиально новые методологические подходы к оценке регенераторного потенциала печени, и это одно из важнейших преимуществ работы. Хотя автор упоминает о возможных сферах применения полученных результатах, недостаточно внимания уделено обсуждению конкретных алгоритмов применения новых методов анализа состояния печени для решения тех или иных клинических задач, например, при интраоперационной оценке перед хирургическими вмешательствами. Как именно результаты оценки предлагаемых параметров могут быть интерпретированы для определения дальнейшей тактики принятия клинических решений или для оценки эффективности экспериментальной терапии патологий печени?

2. Основная часть экспериментов выполнена на грызунах. Насколько релевантны полученные данные будут для тканей человека?

3. Предлагаемая автором методика для оценки состояния печени основана на применении *ex vivo* тканевых образцов. Достаточно ли данные образцы отражают состояние всей печени при патологии?

4. Описаны ли другие эндогенные флуорофоры в ткани печени, помимо НАД(Ф)Н, которые обладают схожими спектральными характеристиками и могут вносить вклад в регистрируемые сигналы?

5. Известно, что при хронических заболеваниях печени сроки ее регенерации при повреждениях могут значительно замедляться. С учетом этого было бы логично на моделях стеатоза и фиброза печени оценивать результаты индукции регенерации на сроках более поздних, чем на модели пострезекционной регенерации нормальной печени. С чем был связан выбор временных точек в дизайне экспериментов на животных?

6. В работе основное внимание при оценке состояния печени обоснованно уделено гепатоцитам. Могут ли предлагаемые подходы быть эффективными и для оценки метаболического статуса клеток стромы, что может оказаться особенно полезным при фиброзе? Так, при дифференцировке фибробластов в миофибробласты описано характерное переключение метаболизма этих клеток, которое может отражать интенсивность и локализацию патологического фиброзирование ткани.

7. В диссертационной работе и автореферате встречается небольшое количество орфографических и стилистических ошибок, в отдельных местах нарушена последовательность ссылок на рисунки.

Высказанные комментарии и замечания имеют рекомендательный характер и не умаляют высокой значимости и достоинств представляемой к защите диссертационной работы.

Таким образом, диссертационная работа Родимовой Светланы Алексеевны «Флуоресцентная, ГВГ и FLIM микроскопия печени при патологии и регенерации», выполненная под научным руководством Загайновой Елены Вадимовны, доктора медицинских наук, член-корреспондента РАН, является оригинальным законченным научно-квалификационным исследованием, выполненным на высоком теоретическом и методическом уровне. Диссертационная работа Родимовой Светланы Алексеевны производит положительное впечатление благодаря своей актуальности, глубине анализа современного состояния проблемы и путей ее решения, объему выполненных экспериментальных исследований и значимости полученных результатов для науки на мировом уровне. По новизне полученных результатов, их фундаментальной и

практической значимости диссертационная работа Родимовой С.А. соответствует требованиям «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года №335, от 2 августа 2016 года №748 и от 25 января 2024 года №62), а её автор Родимова Светлана Алексеевна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 — биофизика.

Заведующий лабораторией репарации
и регенерации тканей Центра
регенеративной медицины,
Медицинский научно-
образовательный институт, ФГБОУ
ВО «Московский государственный
университет имени М.В.
Ломоносова»,
д.м.н., Ефименко Анастасия Юрьевна

 Ефименко А.Ю.

Подпись Ефименко А.Ю. заверяю:
Ученый секретарь, доктор медицинских наук



 /Орлова Я.А.

Дата
Адрес

12.03.2025
119234, Москва, Ломоносовский пр-т., д. 27,
корп. 10., Центр регенеративной медицины
Медицинского научно-образовательного
института Московского государственного
университета имени М.В. Ломоносова
+7 (495) 531-27-27
<http://irm.msu.ru/>

Телефон
Сайт организации