

### **Отзыв официального оппонента**

д.ф.-м.н., доцента Яковенко Леонида Владимировича на диссертацию Храмцовой Елены Александровны «Возможности применения методов акустической микроскопии для исследования эмбрионального развития животных», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

#### **Актуальность темы**

Диссертация Е.А. Храмцовой посвящена исключительно актуальной теме, а именно: применению сканирующей акустической микроскопии для прижизненного исследования биологических объектов, в частности, в области биологии развития. Разработки акустических микроскопов и их применения в физике, материаловедении и других областях исследования ведутся уже более 70 лет, однако применение их в биологии было ограничено низким разрешением и особенностями биологических объектов. Работа Е.А. Храмцовой – одна из немногих, посвященных разработке методики применения сканирующей акустической микроскопии в биологии, и содержащей систематическое и полное исследование эмбрионального развития японского перепела.

#### **Научная новизна работы**

Применение сканирующей акустической микроскопии в биологии – новый метод неинвазивного исследования биологических объектов, в том числе прижизненного. Использование ее в экспериментальной биологии сдерживается из-за отсутствия специализированных методов исследования именно биологических объектов. Работа Е.А. Храмцовой частично заполняет этот пробел и поэтому новизна ее очевидна.

#### **Практическая значимость**

Диссертационная работа Е.А. Храмцовой имеет большое практическое значение не только благодаря разработке новых подходов и методик в акустической микроскопии, но и по сути полученных совершенно новых результатов. В частности, ею составлены таблицы акустических изображений эмбрионов японского перепела на разных стадиях эмбрионального развития. Поскольку перепел – перспективный объект исследований в биологии развития, эти данные, несомненно, найдут широкое применение в дальнейших исследованиях в этой области науки. Разработанные методики фиксации положения объектов исследования и их объемной визуализации делают акустическую микроскопию перспективным методом экспериментальной биологии.

#### **Общая характеристика и содержание работы**

Диссертация состоит из введения, 4-х глав, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложения и содержит 136 страниц

текста, включая 74 рисунка, 10 таблиц и список цитируемой литературы из 170 наименований.

Во введении обосновывается актуальность и выбор направления исследования, и дается краткая аннотация результатов, изложенных в последующих главах.

В первой главе диссертации приведен обзор современной научной литературы по методам исследования биологических объектов, рассмотрены их положительные и отрицательные стороны. Особое внимание уделяется методам, основанным на использовании ультразвука и биологическим эффектам ультразвука при использовании его в диагностических целях. Описывается влияние вспомогательных методик на получение ультразвуковых изображений: сред сканирования, подложек, методов закрепления образца.

Во второй главе подробно описаны методы экспериментальных исследований, подробно изложены сведения об устройстве и принципе действия акустического микроскопа, методика работы с ним. Обоснован выбор экспериментального объекта – японского перепела – и описаны особенности его эмбрионального развития. Эмбрион перепела развивается быстрее куриного, и наблюдения за его развитием гораздо проще, чем в случае, например, мыши.

В третьей главе изложены полученные результаты исследований. В начале главы приведены методические разработки и рекомендации по оптимизации процесса сканирования биологических образцов: эмбрионов, отдельных тканей и органов. Автор предлагает собственные методики закрепления объекта во время сканирования, с учетом влияния на получаемые ультразвуковые изображения. Приведены также результаты, полученные при предварительной фиксации гистологического материала, показано количественное отличие скоростей звука в нативной и фиксированной ткани. Представлены результаты исследований с помощью акустического микроскопа как нормальных эмбрионов последовательно на разных стадиях развития, так и эмбрионов с различными патологиями. Результаты исследования эмбрионов целиком на ранних стадиях развития сопоставлены с представленными в работе тотальными гистологическими препаратами. Метод акустической микроскопии позволяет получать изображения с высоким уровнем детализации даже для микроскопических объектов. Отдельно нужно отметить, что использованная методика исследования объектов не требует дополнительного окрашивания и контрастирования в отличие от гистологических препаратов. Убедительно показаны возможности акустической микроскопии в наблюдении за процессами дифференцировки и роста в целых системах органов и обнаружении отклонений в развитии эмбрионов неинвазивными методами.

Особенностью ультразвуковых методов и в частности акустической микроскопии является отображение упругих характеристик отдельных тканей, либо различий акустических импедансов (произведение плотности и скорости звука) на границе их перехода. Например, различие в акустических

импедансах между мягкими тканями и костными позволяет наблюдать за процессами оссификации конечностей в динамике. В случае же разрушения упорядоченной структуры тканей и органов, вследствие некроза, наблюдается потеря упругости и эластичности структур исследуемого объекта, снижение скорости звука в образце и увеличение затухания, что также наглядно показано на акустических изображениях при сравнении с нормой.

Четвертая глава посвящена обсуждению полученных результатов. Автор рассматривает вклад различных процессов, таких как изменения объема и многослойности у развивающихся эмбрионов, в механизмы формирования ультразвуковых изображений. Обсуждается влияние состава тканей и наличие в них специфических молекул (коллагена и кератина, миелина, кристаллина и др.) на получаемые изображения. Приведены перспективы дальнейших исследований в области акустической микроскопии эмбриональных объектов.

В приложении представлены ультразвуковые изображения всех стадий развития эмбриона японского перепела.

#### **Замечания по работе**

Принципиальных замечаний по диссертации Е.А. Храмцовой нет. Есть замечания по оформлению работы. Во-первых, довольно много опечаток, которые не отмечаются автоматически в текстовых редакторах. Наиболее часто встречается раздельное написание слова «также».

В обзоре литературы встречаются указания на интересные данные, но без соответствующей ссылки на источник. Так, например, на стр. 28 сказано, что «...на высоких частотах (1.5 ГГц) затухание ультразвука в воде достаточно велико. Было установлено, что затухание звука как правило уменьшается с ростом концентрации электролита», но ссылка не приведена. Иногда допускаются выражения лабораторного разговорного языка. Так, например, на стр. 39 использовано выражение «угол раскрытия линзы».

При описании методов исследования не всегда указаны длительности обработки образцов, например, стадии «ополаскивание дистиллированной водой». В табл. 3.1, 3.2 не приведены ошибки измерений. В ряде таблиц и на некоторых рисунках приведен разброс данных, но не указано, какой именно.

Указанные замечания ни в коей мере не влияют на высокую оценку научного уровня диссертации Е.А. Храмцовой.

#### **Заключение**

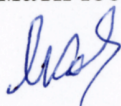
Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 11 статьях в рецензируемых российских и иностранных журналах, входящих в международные базы цитирования и перечень ВАК. Результаты также представлялись на многочисленных научных всероссийских и международных конференциях. Автореферат полностью и корректно отражает содержание диссертационной работы.

Диссертация Е.А. Храмцовой выполнена на высоком научном уровне, является законченным научно-квалификационным трудом и соответствует специальности 03.01.02 – биофизика. Диссертация полностью отвечает требованиям ВАК и пунктов 9-14 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 01.10.2018 г. №1168, и Е.А. Храмцова заслуживает присуждения ей степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Официальный оппонент:

доктор физико-математических наук,  
доцент

18 марта 2020 г.



Яковенко Леонид Владимирович

Место работы: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», физический факультет, кафедра биофизики.

Должность: профессор.

Адрес: 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, МГУ имени М.В.Ломоносова, дом 1, строение 2, физический факультет.

Телефон: +7(495)939-30-07.

Адрес электронной почты: yakovenko.lv@physics.msu.ru

Подпись профессора Яковенко Леонида Владимировича удостоверяю.

Декан физического факультета  
МГУ имени М.В.Ломоносова  
профессор



И.Н. Сысоев