

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу **Николаева Виктора Владимировича**
«Анализ структурных изменений коллагена в лимфедематозной коже с использованием двухфотонной микроскопии и машинного обучения»,
представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности **1.5.2. Биофизика**

Актуальность работы

Причины развития лимфедемы, заболевания, связанного с нарушением работы лимфатической системы, приводящего к накоплению жидкости в тканях, отеку и фиброзным нарушениям, достаточно разнообразны. В общей структуре сосудистой патологии лимфедема составляет около 10 %, и поражает, в основном, трудоспособное население. Данное заболевание является прогрессирующим и без своевременного лечения приводит к тяжелым осложнениям и, в итоге, к инвалидности. Таким образом, диагностика лимфедемы на ранних стадиях является важной и актуальной проблемой.

Развитие лимфедемы приводит к изменению структуры коллагена и соотношению коллагена и эластина в коже. Эти показатели могут быть использованы как диагностические маркеры лимфедемы и ее стадий. В клинической практике для оценки состояния коллагена обычно используются инвазивные методы, которые имеют существенные недостатки. Метод двухфотонной микроскопии наиболее чувствителен к структурным изменениям белков в коже. Однако применение данного метода для диагностики лимфедемы требует развития соответствующих экспериментальных и аналитических методик. В связи с этим определена и **цель диссертационной работы**, которая состоит в разработке и апробации неинвазивного метода детектирования лимфедемы, в основе которого лежит регистрация изменений структуры и пространственного распределения коллагена и содержания эластина в коже с использованием двухфотонной микроскопии с последующей классификацией методами машинного обучения. В диссертационной работе были решены следующие задачи: создание модели лимфедемы на мелких лабораторных животных, разработка протокола *in vivo* исследования лимфедематозной ткани методом двухфотонной микроскопии, разработка методов выявления информативных признаков с последующим созданием прогностической модели.

Научная новизна

Научная новизна представленной работы не вызывает сомнения. В диссертационной работе впервые выполнена комплексная оценка состояния

коллагена на синтезированных модельных данных с разной степенью дезорганизации коллагена, на пациентах с лимфедемой, на разработанной лабораторной модели лимфедемы мелких животных.

Впервые использован индекс старения дермы (SAAID) для диагностики лимфедематозной ткани. Показаны статистически значимые отличия данного индекса между здоровой и лимфедематозной тканями.

Разработана предиктивная модель диагностики лимфедемы основанная на регистрации сигнала второй гармоники методом двухфотонной микроскопии, выявлении информативных признаков модифицированным методом гистограммы ориентированных градиентов, классификации информативных признаков обученной машины опорных векторов с радиальным базисным и метода голосования большинством, которая позволила провести диагностику лимфедематозной ткани с высокой точностью – 96 %.

Теоретическая и практическая значимость результатов

Теоретическая значимость работы обусловлена важностью полученных результатов, которые вносят существенный вклад в понимание механизмов формирования структурных изменений коллагена в динамике развития лимфедемы.

Полученные результаты имеют большую практическую значимость, поскольку способствуют развитию неинвазивной диагностики заболеваний кожи, сопровождающихся дезорганизацией коллагена, в том числе и лимфедемы, на ранних стадиях, используя двухфотонную микроскопию и методики анализа изображений. Полученная предиктивная модель *in vivo* диагностики лимфедемы может быть использована в клинической практике. Лабораторная модель развития лимфедемы на мелких животных имеет практическую значимость для доклинических исследований лимфедемы.

Степень достоверности и обоснованности полученных результатов

Достоверность и обоснованность полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации, подтверждены ее высоким научно-методическим уровнем. В работе автором использован широкий набор современных методов исследования. Для сравнительной оценки результатов автор использовал адекватные методы статистического анализа. Количество обследованных больных и использованных экспериментальных животных достаточно для получения статистически значимых результатов.

Все изложенное выше позволяет считать, что представленные Николаевым В. В. результаты достоверны, а научные положения и выводы, в

основу которых были положены полученные результаты, полностью обоснованы.

Анализ содержания работы

Диссертация Николаева В. В. состоит из введения, четырех глав, заключения, приложения и списка литературы. Полный объем диссертации составляет 128 страниц. Диссертация имеет 53 рисунка и 16 таблиц. Список использованных источников содержит 325 наименований, более 10 % из которых опубликованы за последние 5 лет.

Во **Введении** приведена общая характеристика работы, дано обоснование актуальности темы исследования, подкрепленное соответствующими ссылками на литературные источники; представлены цели и задачи работы; описан объект исследования и приведены ссылки на протоколы этических комитетов НИИ Микрохирургии и НИ ТГУ, разрешающих проведение данного исследования; сформулированы защищаемые положения, приведены структура и краткое содержание диссертации.

В первой главе представлено описание структуры, функций и оптических характеристик кожи в целом, а также коллагена и эластина кожи, в частности. Рассмотрены основные отличия кожи человека и мелких лабораторных животных с точки зрения их оптических свойств. Обсуждается изменение структурных свойств и концентраций в структурах кожи коллагена и эластина при развитии лимфедемы.

Обсуждаются современные подходы и инструментальные методы визуализации коллагена и эластина *in vivo*. Приводится краткое описание методов двухфотонной микроскопии и когерентной антистоксовой рамановской спектроскопии, которые имеют пространственное разрешение на уровне единиц мкм и наиболее часто применяются для исследования структуры и пространственного распределения коллагена и эластина в коже. Рассмотрены аналитические методы количественного описания 2D и 3D изображений, определено понятие вектора признаков. Рассмотрены основные алгоритмы классификации, которые применяются для построения предиктивных моделей в медицинской диагностике. Глава хорошо иллюстрирована понятными рисунками и таблицами, имеет краткое заключение с обоснованием применения метода двухфотонной микроскопии (генерация второй гармоники (ГВГ), автофлуоресценция (АФ)) и метода опорных векторов для анализа данных.

Во второй главе представлена разработка протокола измерения сигналов АФ и ГВГ кожи *in vivo* с использованием двухфотонной микроскопии и подходов к анализу данных. Определены методы предварительной обработки полученных изображений, а также представлена методика разбиения изображения на блоки для последующего анализа полученных данных. Реализована компьютерная модель

коллагеновых волокон и синтезированы данные, моделирующие коллаген с разной степенью дезорганизации. На модельных данных показана применимость метода гистограмм ориентированных градиентов для анализа структуры коллагена и подобраны параметры метода, применительно к рассматриваемой задаче. Показано, что для полностью дезорганизованной структуры коллагена плотность вероятности имеет вид равномерного распределения, для полностью ориентированной структуры – вид дельта-функции. Дано определение индекса SAAID. Результатами данной главы доказано второе защищаемое положение.

Третья глава посвящена разработке предиктивной модели для диагностики лимфедематозной ткани с использованием двухфотонной микроскопии и машинного обучения. Вначале приводится характеристика пациентов, затем описан подробный протокол исследования кожи человека *in vivo* методом двухфотонной микроскопии, хорошо иллюстрированный. Показано, что на глубине 100 мкм сигнал ГВГ соответствует коллагену, а сигнал АФ – эластину. На основе этих данных рассчитан индекс SAAID. Показано, что значение SAAID для здоровой ткани составляет 0.36 ± 0.14 и значительно увеличивается для лимфедематозной ткани (0.45 ± 0.13 , $p < 0.05$). Далее приводится описание анализа структуры коллагена в лимфедематозной коже с использованием градиентных методов, применение метода опорных векторов для построения прогностической модели с вектором признаков на базе адаптированного метода HOG. На основании выявленных закономерностей разработаны подходы к диагностике лимфедемы, основанные на отношении сигналов автофлуоресценции и генерации второй гармоники, и методов анализа градиентных векторов признаков. Разработана предиктивная модель диагностики лимфедематозной ткани на основе метода опорных векторов и векторов признаков на базе адаптированного метода гистограммы ориентированных градиентов. Результаты данной главы доказывают первое и третье защищаемые положения.

Отдельная часть данной главы посвящена разработке метода классификации лимфедемы на основании данных флуоресцентной микроскопии с временным разрешением (FLIM). Метод был использован для визуализации волокон эластина в папиллярной дерме. Для детального анализа кривых FLIM был использован метод главных компонент и показано, что данные отражают меньшую вариативность параметров лимфедематозной ткани по сравнению со здоровой.

В четвертой главе приведено описание этапов разработки экспериментальной модели развития лимфедемы на задних конечностях крыс Wistar, включая предварительный обзор литературы с существующими на данный момент моделями, их особенностями и недостатками. Приведен протокол создания экспериментальной модели лимфедемы с описанием использованных животных, их характеристики, описание проводимых процедур. Приведена подробная и понятная схема эксперимента. В качестве контроля развития изменений в тканях

использовали гистологические исследования. Каждый этап эксперимента хорошо иллюстрирован. Методами гистологии и двухфотонной микроскопии показано, что лабораторная модель лимфедемы на задней конечности крысы реализуется путем резекции лимфатических узлов с последующим облучением рентгеновским излучением оперированной конечности крысы через 1 и 10 месяцев после операции для провокации развития отечности. Результаты данной главы доказывают четвертое защищаемое положение.

В **заключении** описаны основные результаты работы.

Диссертационная работа представляет собой полное и законченное исследование. Автором проделан большой объем работы, и его квалификация в области теоретических и экспериментальных исследований не вызывает сомнений.

Принципиальных замечаний по содержанию работы нет. Однако есть некоторые замечания редакционного характера, так, например разное написание формулы для определения индекса SAAID, наличие некоторых опечаток и несогласованных предложений. Указанные замечания не повлияли на общее хорошее впечатление о данной работе.

Также, в порядке дискуссии, хотелось бы уточнить:

1) В работе автор описывает важность исследования лимфедемы на ранних стадиях, однако в работе исследуются пациенты со второй стадией заболевания. С чем это связано и может ли данный метод быть использован для диагностики лимфедемы на ранних стадиях у людей?

2) Значительная часть текст диссертации посвящена применению технологии FLIM и анализу FLIM изображений. Однако по полученным результатам отсутствуют защищаемые положения. С чем это связано?

3) Метод двухфотонной микроскопии имеет высокое пространственное разрешение, почему анализ толщины эпидермиса проводился только при помощи гистологических методов в главе 4? Проводился ли подобный анализ для добровольцев и пациентов, участвующих в исследовании?

4) Индекс SAAID в ряде работ применяется в виде зависимости значения от глубины. Такое представление дает лучшее понимание изменений как в дерме, так и в эпидермисе. Был ли проведен такой анализ в рамках данного исследования?


Диссертация выполнена на высоком научно-методическом уровне. Результаты работы апробированы на международных и всероссийских конференциях, а их достоверность обусловлена применением известных верифицированных методов и подходов, а также хорошей согласованностью с результатами, полученными другими научными группами. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 5 работ в изданиях, рекомендованных

ВАК, и зарубежных изданиях, индексируемых Scopus и Web of Science. Автореферат полностью отражает содержание работы.

С учетом всего вышеизложенного считаю, что диссертационная работа **«Анализ структурных изменений коллагена в лимфедематозной коже с использованием двухфотонной микроскопии и машинного обучения»** является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком уровне и полностью соответствующей требованиям новизны, научно-практической значимости и достоверности, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук в соответствии с пунктами 9–11, 13, 14 действующего «Положения о присуждении ученых степеней». Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.2. Биофизика, а ее автор, **Николаев Виктор Владимирович**, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности **1.5.2. Биофизика**.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией лазерной биофизики
Федерального государственного бюджетного учреждения
науки Институт лазерной физики Сибирского отделения
Российской академии наук
(630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 15Б;
(383) 333-29-67, shaiislamov@laser.nsc.ru, http://www.laser.nsc.ru),
доктор биологических наук
(14.03.03 – Патологическая физиология)



Черкасова Ольга Павловна,
o.p.cherkasova@gmail.com

10 ноября 2022 г.

Подпись О. П. Черкасовой заверяю



Вульф Т.А. Журавова