

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.2.392.06, СОЗДАННОГО НА БАЗЕ
ФГБОУ ВО «САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»,
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело _____

Решение диссертационного совета от 22.12.2022 №72/22

О присуждении Николаеву Виктору Владимировичу, гражданину РФ, ученой степени кандидата физико-математических наук.

Диссертация «Анализ структурных изменений коллагена в лимфедематозной коже с использованием двухфотонной микроскопии и машинного обучения» по специальности 1.5.2. – Биофизика принята к защите 12 октября 2022 года (протокол заседания 68/22) диссертационным советом 24.2.392.06, созданным на базе ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский университет имени Н.Г. Чернышевского» 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83. Совет 24.2.392.06 создан приказом Минобрнауки России №362/нк от 19.03.2020.

Соискатель, Николаев Виктор Владимирович, 23.02.1990 года рождения, является младшим научным сотрудником в ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет».

Диссертация выполнена на кафедре оптики и спектроскопии физического факультета, в лаборатории лазерного молекулярного имиджинга и машинного обучения и в лаборатории биофотоники научного управления федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет».

Научный руководитель: Кистенев Юрий Владимирович, доктор физико-математических наук, профессор, заместитель проректора по научной и инновационной деятельности ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет».

Официальные оппоненты:

Приезжев Александр Васильевич, кандидат физико-математических наук, доцент, доцент кафедры ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва и

Черкасова Ольга Павловна, доктор биологических наук, заведующий лабораторией, ФГБУН «Институт лазерной физики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск;

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С. П. Королева», г. Самара, в своем положительном отзыве, утверждённом Прокофьевым Андреем Брониславовичем, доктором технических наук, профессором, первым проректором – проректором по научно-исследовательской работе, указано, что диссертация Николаева Виктора Владимировича «Анализ структурных изменений коллагена в лимфедематозной коже с использованием двухфотонной микроскопии и машинного обучения» удовлетворяет требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Николаев Виктор Владимирович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. – Биофизика.

Соискатель имеет 11 работ по теме диссертации, из них 5 в списке рецензируемых научных изданий, установленных Министерством образования и науки РФ для публикаций результатов диссертационных исследований. Наиболее значимые публикации автора, сгруппированные по темам:

1. Kistenev Y.V., **Nikolaev V.V.**, Kurochkina O.S., Borisov A.V., Vrazhnov D.A., Sandykova E.A. Application of multiphoton imaging and machine learning to lymphedema tissue analysis // *Biomedical Optics Express*. – 2019. – Vol. 10, № 7. – P. 3353–3368. – DOI: 10.1364/BOE.10.003353.

В исследовании анализировалась папиллярная дерма больных лимфедемой II стадии и здоровых добровольцев. Представлены результаты двухфотонной *in vivo* визуализации лимфедематозной ткани. Показано, что на полученных изображениях лимфедематозной ткани наблюдается дезорганизация коллагеновых волокон. Величина отношения коллаген/эластин в лимфедематозной ткани больше по сравнению со здоровой. Модифицирован метод гистограмм ориентированных градиентов и реализована прогностическая модель диагностики лимфедемы с использованием данного метода. Такой подход обеспечил 96% точность на данных из тестовой выборки.

2. Князькова А.И., Самарина А.А., **Николаев В.В.**, Кистенев Ю.В., Борисов А.В. Возможности двухфотонной микроскопии для анализа флуоресцентных свойств эластиновых волокон крыс *in vivo* // *Изв. вузов. Физика*. 2021. № 11–DOI: 10.1007/s11182-022-02565-w.

3. Кистенев Ю.В., **Николаев В.В.**, Борисов А.В., Заева О.Б., Князькова А.И., Кривова Н.А. Микроскопия с многофотонным возбуждением для идентификации и оперативного контроля компонентов внеклеточного матрикса тканей организма // *Оптика и спектроскопия*. 2020. Т. 128. № 6. С. 790-794–DOI: 10.1134/S0030400X20060107.

В работе исследованы структура эластина, коллагена, целостность клеточной мембраны и содержание эластина при разных параметрах выделения внеклеточного матрикса из 3 различных по структурно-функциональной организации тканей организма крыс (мозг, дерма, мышца) с использованием автофлуоресцентной микроскопии с двухфотонным возбуждением. Показано, что при кратковременной обработке тканей на магнитной мешалке в физиологическом растворе достигается сохранение клеточных мембран и структуры коллагена, что можно визуально наблюдать с помощью двухфотонной микроскопии. Происходит изменение уровня белка, что показано как по значениям сигнала генерации второй гармоники, так и как биохимическими методами.

Содержащиеся в диссертации сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах достоверны.

На автореферат диссертации поступило 5 положительных отзывов от:

1. Зайцева Владимира Юрьевича, доктора физико-математических наук, член-корреспондента РАН, заведующего Лабораторией волновых методов исследования структурно-неоднородных сред Института прикладной физики РАН, г. Нижний Новгород; замечание: «В связи с обсуждением в реферате различий по величине индекса SAAID в таблице 1 в автореферате, а также в положении 1 возникает следующий уточняющий вопрос. Для пациентов с лимфедемой и здоровых добровольцев, не возникает сомнений в статистической значимости найденного различия средних значений индекса SAAID для этих двух групп, однако стандартные отклонения все же значительны, так что отдельные измерения может быть затруднительно отнести в ту или иную группу. Правильно ли будет сказать, что с точки зрения диагностирования заболевания индекс SAAID должен

- использоваться именно в комплексе с другими обсуждаемыми характеристиками для обеспечения практически приемлемой диагностической точности?»;
2. Бакиной Ольги Владимировны, доктора технических наук, старшего научного сотрудника лаборатории нанобиоинженерии ФГБУН «Институт физики прочности и материаловедения» СО РАН, г. Томск; замечание: «В качестве замечания отмечу, что в Таблице 1 настоящего автореферата приведены данные в абсолютных и относительных значениях сигналов автофлуоресценции и генерации второй гармоники, но в тексте нет сравнения данных характеристик и не обосновано почему в защищаемом положении вынесено именно относительный индекс SAAID»;
 3. Ширшина Евгения Александровича, кандидата физико-математических наук, старшего научного сотрудника кафедры квантовой электроники отделения радиофизики физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, г. Москва; замечания: «1) Из автореферата не до конца ясно, почему выбор длины волны возбуждения был остановлен на 760нм; 2) была ли предпринята попытка сравнения параметров затухания автофлуоресценции клеток эпидермиса в областях, для которых анализировалась дерма у контрольной группы и пациентов с лимфедемой?»;
 4. Горина Дмитрия Александровича, доктора технических наук, профессора центра фотоники и квантовых материалов АНОО ОВ Сколковского института науки и технологий, г. Москва; замечания: «1) Значение индекса SAAID зависит от глубины сканирования, в данной работе глубина сканирования выбиралась относительно рогового слоя, т.е. при утолщении эпидермиса на заданной фиксированной глубине может наблюдаться слой с другой пространственной структурой. В работе про это не сказано, однако это так же может быть причиной значимых изменений в показателе SAAID; 2) Результаты реализации предложенной модели лимфедемы на мелких животных не показывают увеличения объема конечности, что как было отмечено выше является основным показателем развития лимфедемы. В автореферате следовало бы уделить этому больше внимания; 3) В тексте присутствуют стилистические и грамматические ошибки»;
 5. Кратасюк Валентины Александровны, доктора биологических наук, заведующей кафедры биофизики института фундаментальной биологии и биолюминесцентных биотехнологий Деевой Анны Андреевны, кандидата физико-математических наук, старшего преподавателя кафедры биофизики института фундаментальной биологии и биотехнологий, г. Красноярск; замечание: «Из автореферата неясно какое программное обеспечение использовалось для обработки изображений градиентными методами, и их классификация методом опорных векторов».

В отзывах отмечается актуальность темы исследования, новизна полученных результатов и их значимость для науки и практики. На все высказанные замечания соискателем даны исчерпывающие ответы.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается значительным опытом выполнения ими научно-исследовательских работ по тематике диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

установлено, что индекс старения папиллярной дермы, вычисленный по зарегистрированным сигналам автофлуоресценции и генерации второй гармоники, для

лимфедематозной ткани имеет значение 0.45 [0.36; 0.52], для здоровой ткани 0.36 [0.25; 0.47].

определено, что модификация метода гистограмм ориентированных градиентов позволяет количественно оценить дезорганизацию коллагена на основе регистрации сигнала генерации второй гармоники кожи с использованием двухфотонной микроскопии. Модификация заключается в разбиении изображения на блоки и построении вектора признаков изображения в виде плотности вероятности пространственных ориентаций градиентов яркости внутри каждого блока. При этом для полностью дезорганизованной структуры указанная плотность вероятности имеет вид равномерного распределения, для полностью ориентированной структуры – вид дельта-функции.

доказано, что разработанная предиктивная модель диагностики лимфедемы на данных, полученных методом двухфотонной микроскопии, обеспечивает точность диагностики лимфедемы 96% на использованной экспериментальной выборке. Предиктивная модель основана на выявлении информативных признаков модифицированным методом гистограмм ориентированных градиентов, классификации информативных признаков обученной машины опорных векторов с радиальным базисным ядром и методе голосования большинством.

установлено, что лабораторная модель лимфедемы на задней конечности крысы реализуется путем резекции подколенного и ближайшего пахового лимфатического узлов с последующим двукратным облучением рентгеновским излучением через 1 и 10 месяцев после резекции. При этом доза облучения 20 грей (протокол: облучение 4 раза по 5 минут, интервал между облучениями - 2 минуты).

Теоретическая значимость исследования заключается в разработке модифицированного метода гистограмм ориентированных градиентов, который позволяет оценивать степень дезорганизации коллагена по графическим данным, полученным методом двухфотонной микроскопии.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что предложенная модель лимфедемы на мелких лабораторных животных может быть использована для изучения особенностей протекания данного заболевания в доклинических исследованиях. Предиктивная модель *in vivo* диагностики лимфедематозной ткани с использованием двухфотонной микроскопии и машинного обучения может быть использована в клинической практике.

Достоверность результатов работы обусловливается использованием апробированных методик измерения, адекватностью используемой теоретической модели, соответствием теоретических выводов экспериментальным данным, воспроизводимостью результатов экспериментов.

Личный вклад соискателя состоит в проведении измерений на двухфотонном микроскопе MPTflex, выборе подходов к анализу сигналов автофлуоресценции и генерации второй гармоники, разработке программ для обработки сигналов, реализации методов выделения информативных признаков на графических данных и их дальнейшей классификации. Определение основного направления диссертационной работы, формулировка темы, постановка задач, обсуждение результатов, обсуждение текста диссертационной работы, ее основных положений и выводов, осуществлялась совместно с научным руководителем диссертационной работы.

В ходе защиты диссертации были заданы следующие вопросы и критические замечания:

1. Вопрос о параметре «интервал тангенса угла наклона», предложенного во второй главе диссертации для оценки степени дезорганизации коллагеновых волокон.

2. Вопрос о плотности вероятности для оценки волокон с разной степенью дезорганизации. Для какой величины вычисляется плотность вероятности? Плотность вероятности описывает поведение, какое поведение она описывает в вашем случае?
3. Вопрос о природе изменения отношения сигналов автофлуоресценции и генерации второй гармоники с изменением состояния ткани.
4. Вопрос о выборе областисканирования, которую необходимо исследовать у людей в группе риска.
5. Вопрос о специфичности метода гистограмм ориентированных градиентов.
6. Вопрос о корректности использования индекса старения дермы предложенного для оценки возрастных изменений. Почему не было выбрано новое название для использованного индекса?
7. Вопрос о механизме влияния рентгеновского облучения на формирование лимфедемы.
8. Вопрос о количестве крыс, участвовавших в эксперименте.

Соискатель ответил на замечания, содержащиеся в отзывах ведущей организации и официальных оппонентов, и задаваемые ему в ходе заседания вопросы, и дал необходимые пояснения:

1. Данный параметр использовался только для создания модельных данных имитирующие изображения с коллагеновыми волокнами с разной степенью дезорганизации. Он использовался как критерий для оценки ткани.
2. В защищаемом положении речь идет о плотности вероятности ориентаций волокон коллагена на изображении.
3. На седьмом слайде можно видеть, что с развитием лимфедемы происходит деградация эластина и нарушение структуры коллагена. Таким образом, снижение сигнала автофлуоресценции связано с деградацией эластина, а нарушения в коллагеновой структуре связаны с изменением сигнала генерации второй гармоники.
4. Вторичная лимфедема возникает в результате удаления лимфатического узла, следовательно, необходимо исследовать ближайшую конечность к удаленному лимфатическому узлу.
5. Мы рассматривали случаи, когда диагноз был определен клинически.
6. Данный индекс был впервые предложен для оценки возрастных изменений, позже данный индекс он применялся для оценки онкологической ткани.
7. Провоцирующим факторов не обязательно может быть облучение. Не всегда после удаления лимфатического узла и однократного облучения формируется лимфедема. Роль провокатора могут играть и другие факторы.
8. В исследовании было использовано 15 крыс.

В результате рассмотрения диссертации Николаева Виктора Владимировича «Анализ структурных изменений коллагена в лимфедематозной коже с использованием двухфотонной микроскопии и машинного обучения» на заседании 22 декабря 2022 диссертационный совет принял решение: за достижения 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 и машинного, обучения присудить Николаеву Виктору Владимировичу ученую степень кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. – Биофизика.

