

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу

Киселевой Елены Борисовны

"МЕТОД КРОСС-ПОЛЯРИЗАЦИОННОЙ ОПТИЧЕСКОЙ КОГЕРЕНТНОЙ ТОМОГРАФИИ
ДЛЯ ПРИЖИЗНЕННОЙ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ КОЛЛАГЕНОВЫХ ВОЛОКОН",

представленную на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

по специальности 03.01.02 – Биофизика

В последние годы в медицине пристальное внимание уделяется вопросам изучения структурной организации внеклеточного матрикса соединительной ткани и его перестройке при патологических процессах. Методами высокоразрешающей микроскопии доказано, что пространственная и структурная организация коллагеновых волокон, преобладающего компонента внеклеточного матрикса соединительной ткани, неизбежно повреждается в ходе различных патологических процессов – воспаления, неоплазии, а также при воздействии ряда внешних факторов: ионизирующего излучения при лучевой терапии, интенсивного лазерного излучения при проведении операций и лазерной коррекции. Данные о характере и степени повреждений коллагеновой сети могут быть использованы в клинической практике для дифференциальной диагностики заболеваний, выявления ранних неопластических процессов, определения ответа соединительнотканной стромы на проводимое лечение, определения качества трансплантатов на основе коллагена.

С этой точки зрения востребованными являются неинвазивные, высокоразрешающие и доступные методы изучения внутренней структуры тканей, в частности, оптическая когерентная томография (ОКТ), которая обеспечивает формирование двух- и трехмерных изображений структуры тканей в режиме реального времени на глубинах до 1-2 мм с микронным разрешением.

Необходимо отметить, что ОКТ имеет существенные преимущества как метод визуализации, позволяющий формировать изображения слизистых оболочек внутренних органов с помощью эндоскопических зондов. При этом многими исследовательскими группами показана эффективность использования поляризованного света для изучения состояния коллагеновых волокон фиброзных тканей с высоким содержанием коллагена, что реализовано в технологии поляризационно-чувствительной ОКТ, которая позволяет детектировать нарушения нормального состояния (структурной и пространственной организации) коллагеновых волокон сухожилий, связок, межпозвоночных дисков, суставных хрящей, дермы, тканей глаза, костной и зубной тканях.

Кросс-поляризационная ОКТ (КП ОКТ) является модификацией поляризационно-чувствительной ОКТ, формирующей одновременно два изображения путем отдельной регистрации рассеянного излучения в двух каналах, параллельном и перпендикулярном поляризации зондирующего излучения. В отличие от поляризационно-чувствительной ОКТ, где акцент делается на анализе двулучепреломляющих свойств исследуемой ткани, КП ОКТ визуализирует деполяризацию излучения как за счёт двулучепреломления, так и за счёт рассеяния в исследуемой биоткани.

В настоящее время метод КП ОКТ стремительно развивается и получает все более широкое клиническое применение в эндоскопии. В тоже время исследованию состояния коллагеновых волокон слизистых оболочек поляризационными вариантами ОКТ посвящено относительно небольшое число работ. В последних клинических исследованиях была показана целесообразность и необходимость внедрения метода КП ОКТ в медицинскую практику в диагностических целях, поскольку анализ ОКТ-изображений в ортогональной поляризации позволяет дифференцировать патологические состояния слизистых оболочек со схожей визуальной (эндоскопической) картиной. С этой точки зрения весьма актуальна разработка способов анализа КП ОКТ изображений для определения количественных критериев разделения патологических состояний слизистых оболочек по деполяризующим свойствам коллагеновых волокон соединительнотканной стромы органов.

В связи с этим диссертационная работа Киселевой Е.Б. посвящена определению количественных характеристик для разработки критериев прижизненного разделения состояния (пространственной и структурной организации) коллагеновых волокон при различных патофизиологических процессах в слизистых оболочках. Решение данной проблемы важно как для понимания фундаментальных аспектов оптики биотканей, так и с точки зрения практического приложения для разработки новых методов современной медицины. В свете этого тема диссертационной работы Е.Б. Киселевой представляется достаточно **актуальной**. Общая направленность этой работы связана, главным образом, с разработкой методов получения и анализа КП ОКТ изображений, позволяющих оценить состояние соединительнотканной стромы слизистых оболочек человека *in vivo* как в норме, так и при наличии патологических процессов. При этом основные задачи, поставленные в рассматриваемой диссертационной работе, были решены впервые и полученные результаты, несомненно, обладают **научной новизной**.

Полученные в работе результаты могут быть использованы для широкого круга клинических задач, в том числе для оперативной диагностики заболеваний, для наблюдения за состоянием коллагеновых волокон тканей при развитии патологии; мониторинге естественных и индуцированных лечением регенеративных процессов, в оценке степени фиброза, а также для изучения структуры коллагеновых матриц при создании скаффолдов, гелей, имплантатов, изучении их биосовместимости и

биodeградируемости; при конструировании биоактивных инженерных каркасов, обладающих поляризационными свойствами, что и определяет **практическую значимость** диссертационной работы Киселевой Е.Б. Практическая значимость работы подтверждается наличием трех патентов и использованием результатов диссертации в грантах РФФИ, Государственных контрактов и т.д.

Достоверность представленных научных результатов обусловлена тем, что они получены на основе апробированных методик расчета и измерений. Достоверность подтверждается соответствием результатам, полученных другими исследователями.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 148 страницах, включает 9 таблиц и 43 рисунка. Список литературы содержит 219 источников, из них 175 зарубежных.

Во введении обоснована актуальность, отмечена научная новизна и практическая значимость работы, формулируются цели и задачи исследования и кратко излагается содержание диссертации.

В **первой главе** рассмотрена структурная и пространственная организация коллагеновых волокон (КВ) в разных видах соединительных тканей в норме и изменение состояния КВ слизистых оболочек под влиянием ряда патологических процессов: острого воспаления и неоплазии, при фиброзе. Подробно обсуждаются основные явления, наблюдаемые при распространении поляризованного света в соединительной ткани: двулучепреломление и деполяризация света КВ. Описаны основные оптические методы изучения КВ в тканях: поляризационная микроскопия, многофотонная микроскопия на основе генерации второй гармоники (ГВГ), поляризационные модификации оптической когерентной томографии, в том числе кросс-поляризационная ОКТ. Проведен анализ основных способов морфометрической оценки КВ методами микроскопии и ключевых подходов к обработке ОКТ-изображений коллагенсодержащих тканей.

Во **второй главе** определены объекты и методы исследования. **Объектами исследований** служили ткани с заведомо высоким содержанием коллагена: сухожилия сгибателей пальцев стопы человека, послеоперационные рубцы мочевого пузыря (МП); а также слизистая оболочка десны кроликов до и после коагуляционного лазерного воздействия, слизистые оболочки щеки и мочевого пузыря человека. В работе были использованы следующие **методы**: 1) метод КП ОКТ для прижизненной оценки поляризационных свойств биотканей (использован прибор «ОКТ1300-У» (ИПФ РАН, г. Нижний Новгород) с рабочей длиной волны 1300 нм, мощностью 3 мВт, разрешением по глубине 15-20 мкм, поперечным разрешением 25 мкм; сканирование по глубине до 1,5 мм); 2) метод светлопольной микроскопии для установления патологического процесса; 3) метод поляризационной микроскопии (окраска пикросириусом красным (ПСК) для детальной оценки состояния КВ); 4) метод многофотонной микроскопии в режиме ГВГ:

изучены фрагменты удаленных тканей и криосрезы. Всего получено и проанализировано 180 КП ОКТ изображений, 354 микроскопических изображений.

Лазерная коагуляция ткани десны, при которой происходила температурная денатурация коллагена, проводилась с использованием лазерной системы компании «Dental Photonics Inc.» на основе диодного лазера с длиной волны 980 нм, мощностью до 20 Вт.

Количественная обработка цифровых изображений заключалась в оценке средней яркости 88 гистологических препаратов слизистой оболочки щеки, окрашенных ПСК и сфотографированных в поляризованном свете при одинаковых условиях.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием встроенного пакета статистического анализа Real Statistics для MS Excel 2003 и GraphPad Prism 6. В работе проводилось определение средних значений (M) измеряемых величин и стандартных отклонений среднего ($\pm s$). Достоверность различий между группами рассчитывалась с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Для выявления корреляции между яркостью КВ на ПСК препаратах и интегрального фактора деполяризации (ИФД) использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Во всех случаях статистически значимыми считались различия при уровне значимости $p < 0,05$.

В **третьей главе** представлены результаты экспериментальных исследований: 1) структуры КП ОКТ изображений сухожилия, рубцовой ткани и слизистых оболочек человека в норме; 2) структуры КП ОКТ изображений слизистой оболочки десны после лазерной коагуляции коллагеновых волокон; и 3) структуры КП ОКТ изображений слизистых оболочек щеки и мочевого пузыря при патофизиологических процессах.

Полученные КП ОКТ изображения сухожилия имели псевдо-полосатую структуру, что свидетельствует о наличии регулярного двулучепреломления. Показано, что благодаря организации КВ в сухожилии в толстые пучки, их плотному параллельному расположению, а также квазикристаллической укладке молекул коллагена в фибриллы, фибрилл в волокна, а волокон в пучки, сухожилие является идеальным объектом для наблюдения двулучепреломления методом КП ОКТ. КП ОКТ исследование рубцовой ткани мочевого пузыря показало наличие в ткани высокой концентрации организованного коллагена, который способен эффективно деполяризовать и обратно рассеивать зондирующее излучение с сохранением когерентности по отношению к исходному излучению, либо давать высокий сигнал за счет двулучепреломления на крупных агрегатах высокоупорядоченных КВ. На основе полученных морфологических и литературных данных предложены схемы, представляющие состояние КВ в сухожилии и рубцовой ткани.

Проведенное методами КП ОКТ изучение состояния КВ слизистых оболочек в норме позволяет представить их схематично в виде тонких цилиндров, ориентированных

в пространстве относительно друг друга случайным образом и имеющих низкую плотность расположения.

Показано, что локальное лазерное воздействие на слизистую оболочку десны приводит к локальной температурной денатурации коллагена и нарушению третичной структуры белка.

На примере слизистой оболочки щеки изучены три измененных состояния КВ: их деградация при остром воспалении и разная степень избыточного накопления КВ (фиброз) как исход различных видов воспаления. Представлены результаты количественной оценки средней яркости КВ, отражающей плотность их расположения, а также средней толщины волокон. Результаты показали статистически значимые различия, как яркости окраски, так и толщины волокон между группами острого воспаления и нормы, а также между группами с разной степенью выраженности фиброза.

В слизистой оболочке мочевого пузыря путем гисто-томографических сопоставлений изучены три аналогичных состояния КВ: их деградация в группе острого воспаления и разная степень избыточного накопления КВ (фиброз) как исход воспаления и заживления раны. Также были оценены три дополнительных состояния разной степени деградации КВ при неопластических процессах: тяжелой дисплазии эпителия, плоской уретелиальной карциноме с началом инвазивного роста и рецидиве уретелиальной карциномы на послеоперационном рубце. Обнаружена зависимость яркости ОКТ-сигнала в ортогональной поляризации при этих патологиях от состояния КВ на гистологических препаратах. При прогрессирующем развитии неоплазии: острое воспаление – тяжелая дисплазия эпителия – инвазия уретелиальной карциномы наблюдается снижение яркости ОКТ-сигнала в ортогональной поляризации и нарастающая дезорганизация КВ в строме.

На основании проведенных экспериментальных исследований были выработаны количественные критерии прижизненного разделения состояния коллагеновых волокон при различных патофизиологических процессах в слизистых оболочках методом КП ОКТ.

Предложены три количественные характеристики:

- 1) Относительная яркость (ЯР) – отношение яркости ОКТ-сигнала в ортогональной поляризации, усредненной по всем информативным пикселям, к такой же величине, рассчитанной для ОКТ-сигнала в исходной поляризации.
- 2) Относительное среднеквадратичное отклонение (СКО) яркости ОКТ-сигнала – отношение СКО для информативных пикселей в ортогональной поляризации, к СКО для тех же пикселей в исходной поляризации.
- 3) Интегральный фактор деполяризации (ИФД) – интегральное отношение усредненных по поперечной координате яркостей ОКТ-сигнала в ортогональной поляризации (усредненный А-скан), к такой же величине, рассчитанной для ОКТ-сигнала в исходной поляризации.

Применение данных характеристик (ЯР, СКО и ИФД) для анализа КП ОКТ изображений слизистой оболочки щеки обнаружили статистически значимое различие деградации КВ при остром воспалении от их нормального состояния и избыточное накопление КВ при выраженном фиброзе, однако только ИФД различал степень избыточного накопления КВ при слабом и выраженном фиброзе, что согласуется с результатами морфометрического анализа, показавшими различие в толщине и плотности КВ при данных состояниях. Это обеспечило высокий коэффициент корреляции между ИФД и средней яркостью гистологических препаратов: $r = 0,72$ ($p = 0,0001$, $n = 34$). Полученная корреляция указывает на высокую степень связи между ОКТ-сигналом на изображениях в ортогональной поляризации и структурной организацией КВ на тканевом уровне. Диагностическая точность ИФД для дифференциальной диагностики выраженности фиброза составила 86%, что является клинически значимым результатом.

Как и в слизистой оболочке щеки, ИФД, вычисленный по КП ОКТ изображениям слизистой оболочки мочевого пузыря, показал статистически значимое отличие деградации КВ при остром воспалении от их состояния в норме, а также достоверно отличал избыточное накопление КВ при выраженном фиброзе от состояния КВ в норме.

На примере слизистой оболочки мочевого пузыря было показано, что состояние деградации КВ может быть использовано для диагностики плоской уротелиальной карциномы. Результаты показывают статистически значимое отличие ИФД при карциноме и остром воспалении, а также при карциноме и тяжелой дисплазии эпителия, что может повысить диагностическую точность выявления данных состояний при КП ОКТ исследовании плоских подозрительных зон мочевого пузыря.

Получено статистически значимое отличие между группами рецидива карциномы на рубце и нормальной послеоперационной рубцовой ткани ($p < 0,0001$), что говорит о возможности эффективного неинвазивного обнаружения данной патологии с помощью КП ОКТ.

Показано, что диагностическая точность ИФД в целом превосходит другие показатели (ЯР и СКО), что является важным результатом и позволяет рекомендовать использование ИФД для решения ряда клинических задач, связанных с необходимостью слежения за развитием реакции ткани на проводимое лечение.

В заключении приводится перечень основных выводов, полученных в результате проведенных исследований, и кратко суммируются основные результаты при выполнении данной работы.

Среди наиболее значимых результатов можно отметить следующие:

Разработаны три способа количественной оценки КП ОКТ изображений, отражающие состояние коллагеновых волокон слизистых оболочек: относительная яркость ОКТ-сигнала (ЯР), относительное среднеквадратичное отклонение яркости ОКТ-сигнала (СКО) и интегральный фактор деполяризации (ИФД).

Показано, что диагностическая точность ИФД выше (по сравнению с ЯР и СКО) при дифференциальной диагностике степени фиброзных изменений слизистой оболочки щеки (выраженный фиброз против слабого) (86% против 65% и 65%); обнаружения выраженного фиброза слизистой оболочки мочевого пузыря (против нормы) (79% против 73% и 54%).

Показана возможность разграничения с помощью ИФД плоской инвазивной уротелиальной карциномы мочевого пузыря от острого воспаления (72% против 50% и 72%). Все три изученных показателя с высокой диагностической точностью обнаруживают рецидив карциномы на послеоперационном рубце (97% для ИФД против 94%/94% для ЯР/СКО).

Результаты работы прошли достаточную **апробацию**. Они отражены в 33 публикациях, включая 18 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, из которых 12 статей – в изданиях из списка ВАК РФ; 5 глав в коллективных монографиях; 10 тезисов конференций. Получено 3 патента на изобретения, подана 1 заявка на изобретение (2013). Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации.

В тоже время работа не свободна от некоторых **замечаний**:

- 1) Нумерация ссылок на литературные источники должна начинаться с первого номера, в то время как в данной работе уже на стр. 4 стоят ссылки [19, 183] и т.д. по всему тексту.
- 2) Не совсем понятен смысл термина «когерентная деполяризация света» (см. например стр. 6 и далее по тексту).
- 3) Не совсем понятен смысл слов «быстрой и медленной осей роговицы» в предложении на стр. 31 «Измеренные вариации показателя преломления для быстрой и медленной осей роговицы кролика, показывают ...».
- 4) Не совсем понятен смысл слов «Степень рассеяния в ортогональную поляризацию...» (стр. 54, 55, 71, 106).
- 5) Объем занимаемый первой главой «Обзор литературы» - 50 стр. непропорционально велик к общему объему диссертационной работы - 148 с.
- 6) Вызывает сомнения статистическая достоверность результатов по исследованию локального лазерного воздействия на слизистую оболочку десны, поскольку эксперименты были выполнены всего на 2-х кроликах (стр. 64).
- 7) Не совсем понятен смысл слов «... рыхло, хаотично, но равномерно расположенных КВ...» (стр. 93). Так хаотично или равномерно расположены КВ?
- 8) Ссылки на статьи в русско-язычных журналах должны быть приведены на русском языке. См. ссылки № 50 и № 132 (журнал Квантовая Электроника).

- 9) Надписи на рисунках должны быть сделаны на русском языке (рис. 12, 18, 20, 21).
- 10) В работе присутствует некоторое количество стилистических и грамматических ошибок и опечаток.

Тем не менее, сделанные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы Киселевой Е.Б., которая является научно-квалификационной работой, содержащей решение важной биофизической задачи, и полностью соответствует требованиям п. 9 "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Киселева Елена Борисовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Доцент кафедры оптики и биофотоники

ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского»

кандидат физико-математических наук

А.Н. Башкатов

Подпись А.Н. Башкатова ЗАВЕРЯЮ

Ученый секретарь ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского»

кандидат химических наук, доцент

И.В. Федусенко