

УТВЕРЖДАЮ
Декан химического факультета
Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова
академик РАН, профессор Лунин В.В.

« » мая 2014 г.

О Т З Ы В

официального оппонента о диссертационной работе

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 медицине 21 века физические методы начинают занимать доминирующее место, и направление «медицинская физика» в настоящее время активно развивается. При этом есть два направления, в которых физика и медицина переплетаются:

- создание и внедрение диагностических методов, основанных на новейших физических разработках;
- создание и внедрение современных клинических технологий, основанных на воздействии физических факторов. Такая интеграция дисциплин в силу специфики медицинской практики требует абсолютно надежного научного базиса в использовании как физического оборудования и непосредственно измеряемых физических свойств для диагностики, так и физических воздействий для проведения клинических процедур. Очевидно, что это практически невозможно без участия специалистов смежных дисциплин – биологов и химиков. Работа Киселевой Е.Б. поставлена и выполнена для научного обоснования неинвазивной оптической диагностики патологических процессов и (хотя и меньшей степени) использования лазерной технологии в клинической практике. Представленное исследование является ярким примером конгломерации физики, биологии и медицины. И его значение трудно переоценить.

Цель работы как определение состояния коллагена в тканях при патологиях по измерению оптических характеристик сформулирована очень четко. Принимая во внимание что

- коллаген составляет около трети от всех белков в организме, и все, что связано с коллагенопатиями занимает значительное место среди всех заболеваний человека;
- измеряемые оптические характеристики связаны с количественной оценкой КП ОКТ изображений, получаемых прижизненно и неинвазивно

актуальность работы Киселевой Е.В. не вызывает сомнений.

Представление диссертационной работы имеет классический вид и состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященный описанию объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 219 наименований, и списка сокращений.

Анализ *обзора литературы*, выполненного автором, показывает достаточно глубокую и осмысленную проработку существующих к настоящему времени данных о разных структурах, которые образует коллаген, их изменение при патологиях. Отдельно стоит подчеркнуть, оригинальную систему скетчевой иллюстрации коллагеновых структур, которую автор использует, начиная с литературного обзора. Эти представления путеводной нитью проходят по диссертации и, с одной стороны, существенно облегчают понимание материала, а с другой стороны, показывают насколько глубоко диссертант прочувствовал особенности укладки коллагена в разные структуры. Кроме того, проведен тщательный анализ оптических свойства ткани (двулучепреломление и деполяризация), которые и дают возможность трансформировать измеряемые оптические свойства в характеристики ткани. Очень важно, что в литературном обзоре даны четкие определения, в которых особое внимание уделено коллагеновым структурам, а именно

- состояние коллагена (стр.14);
- мукоидного и фиброидного набухания, тяжелой дисплазии, злокачественной опухоли, рубцевания (стр. 23-25);
- двулучепреломления, которое аккуратно проиллюстрировано физической моделью и математическими формулами;
- деполяризации (что самое важное).

После такой подготовки становится понятным, почему КП ОКТ и другие используемые подходы (морфологическое описание препаратов, окрашенных пикросириусом и нелинейная оптическая микроскопия с регистрацией генерации второй гармоники) дают ценнейшую информацию о выбранных объектах исследования (соединительнотканых материалах).

Материалы и методы описаны достаточно подробно, но без излишней и навязчивой детализации.

Что касается представлений *результатов и обсуждений*, то прежде всего следует отметить логически выстроенную систему для обоснования заключительных утверждений. Эта система построена на сравнении КП ОКТ изображений объектов с данными «золотого стандарта» - классической световой микроскопии с окраской коллагена пикросириусом и данными новейшего метода – нелинейной оптической микроскопии с регистрацией генерации второй гармоники. Качественная **статистическая обработка** результатов обеспечивает достоверность полученных данных.

Начинается все с рассмотрения классического примера ткани сухожилий, где параллельная укладка молекул в фибриллы и фибрилл в волокна образует квазикристаллическую анизотропную структуру. До работы Киселевой большинство российских и зарубежных исследователей применяли поляризационно-чувствительную ОКТ исключительно для такого рода объектов. При этом ПЧ ОКТ позиционировалась как более информативный метод анализа коллагенсодержащих материалов. Тем не менее, все исследования ограничивались тканями в высоком двулучепреломлении (Δn составляет не менее 0.001). В работе Киселевой произошел качественный скачок вперед - впервые рассматриваются ткани с более хаотичной структурой и малым значением Δn . Для этого рассматривались слизистые оболочки щеки и мочевого пузыря, на КП ОКТ изображениях которых визуализируются тонкие слоистые структуры, которые не могут быть связаны с двулучепреломлением. Автор, используя логическую систему обоснований, делает заключение, что эти тонкие структуры связаны с деполяризацией зондирующего излучения на рыхлой сетке тонких переплетающихся волокон. И такой подход позволил обнаружить зоны лазеро-индуцированной деградации слизистой оболочки десны. Эта часть является примером объединения перспективного диагностического метода и перспективной клинической технологии, основанных на новейших физических разработках. Лазерная микрокоагуляция тканей десны рассматривается сейчас как вариант стимуляции регенерации периодонтальных тканей.

Основополагающей частью работы является анализ патофизиологических изменений слизистой оболочки. Для этого надо было отойти от субъективной гистологической оценки «видно- не видно» и перейти к объективной физически определяемой величине. Но, ввиду существенной ориентации исследования на медицинские приложения с одной стороны, и необходимостью включения системы логических доказательств с другой стороны, была проведена огромная работа по количественному сравнительному анализу яркости гистологических препаратов с

окраской пикросириусом и сигнала КП ОКТ. Оказалось, что оба метода дают отличие контроля от патологии (выраженный фиброз, деграция, отличия слабого фиброза от выраженного). Параллельно диссертант находит объяснение потери деполяризационных свойств ткани и снижение интенсивности обратно рассеянного излучения в состоянии ортогональной поляризации на основе изменения соотношения центров рассеяния в исходную и ортогональную поляризацию. Это связано с набуханием и фрагментацией коллагеновых волокон. Тем не менее, количественные оценки КП ОКТ изображений еще не достаточно однозначны и автор не останавливается на достигнутой цели.

Квинтэссенцией работы является выявление количественных критериев стандартизации оценки КП ОКТ сигнала. При этом автор принимает во внимание наличие спекл-структуры (случайных рассеивающих центров) и избыточного шума. В диссертации предлагается оригинальный выход – анализ отношения величин, связанных с рассеянным сигналом в исходной и ортогональной поляризациях. Это относительные яркость, среднеквадратичное отклонение и интегральный фактор деполяризации (ИФД). Оказалось, что все факторы чувствительны к реорганизации коллагенового матрикса и позволяют отличать нормальную ткань от патологически измененной. Дополнительно ИФД позволяет отличать слабый фиброз от выраженного для слизистой оболочки щеки и мочевого пузыря. Для мочевого пузыря особо важным оказывается возможность различать доброкачественное и злокачественное состояние. Возможность такой диагностики неинвазивным методом обуславливает огромную **практическую значимость работы**.

Выполнение поставленной задачи выявления количественных критериев определения состояния коллагена в тканях определяет **научную новизну работы**. Действительно, впервые определены количественные величины (относительные яркость, среднеквадратичное отклонение и интегральный фактор деполяризации), позволяющие анализировать КП ОКТ изображения тканей с невысоким двулучепреломлением (отличные от анизотропных). В результате получен надежный инструмент для диагностики фиброзов, воспалений и злокачественных образований.

Единственный по сути недостаток представленной работы заключается в том, что все результаты получены на ограниченном числе конкретных (хоть и важнейших) примеров. В работе отсутствуют модели (физические, химические, биологические), анализ которых позволил бы сделать более общие выводы о роли толщины волокон, их укладки, степени дезорганизации на деполяризацию и критериях оценки состояния. Такие данные могли бы расширить перспективы применения метода КП ОКТ для диагностики

других коллагенопатий или сузить их круг, облегчив тем самым прикладные исследования.

В тексте есть отдельные неточности:

- на стр. 20 утверждается, что время полураспада коллагена составляет от нескольких дней до года. На самом деле это не совсем так. Например, средний период полураспада коллагена в тканях сухожильного типа около 5 лет, а в суставных хрящах около 100 лет;

- на стр. 78 автор повторяет типичную ошибку морфологов, утверждая, что коллагены разного типа отличаются толщиной волокна. На самом деле коллагены разного типа отличаются в первую очередь аминокислотным составом, как собственно и были определены разные типы коллагена.

Крайне несущественные недостатки оформления не затрудняют понимание текста.

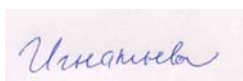
Сделанные замечания, тем не менее, не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы Киселевой Е.Б. С учетом актуальности, новизны выполненного исследования, и наличия решения важнейшей задачи физической диагностики, все вышесказанное позволяет заключить, что представленная работа полностью 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 физической химии

Химического факультета

Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

доктор химических наук



Н.Ю. Игнатьева