

ОТЗЫВ

председателя диссертационного совета Тулупьева Александра Львовича на диссертацию Шпильмана Алексея Александровича на тему: «Анализ и компьютерное моделирование микротрубочковых структур», представленную на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 1.2.2. Математическое моделирование, численные методы и комплексы программ.

Работа Шпильмана Алексея Александровича посвящена анализу и компьютерному моделированию микротрубочковых структур. Микротрубочки – это внутриклеточные линейные полимеры белка тубулина. Они являются одним из ключевых компонентов цитоскелета. Функции микротрубочек включают поддержание формы клетки, обеспечение клеточной подвижности, передачу веществ от центра клетки к периферии и обратно, разделение хромосом во время клеточного деления через образование структуры, называемой митотическим веретеном. Для выполнения этих функций микротрубочки взаимодействуют с элементами геометрией клетки, актиновыми волокнами, промежуточными филаментами и клеточными моторными белками. Понимание механизмов, обеспечивающих функционирование микротрубочковых систем, необходимо для создания полноценной картины внутриклеточных и межклеточных процессов. Для достижения такого понимания, многие исследователи прибегают к воспроизведению наблюдаемых эффектов в компьютерных моделях, так как это может показывать достаточность определенных выявленных факторов для, например, образования той или иной структуры.

Нарушение функций микротрубочек может приводить к заболеваниям, особенно нервной системы, где эти функции имеют особо важное значение в связи со специфической формой нейронов. Также нарушение функций микротрубочек связывают с болезнью Альцгеймера. В то же время, лекарства, ингибирующую нормальную функцию микротрубочек, такие как паклитаксел, в том числе рассматриваемый в работе, могут быть использованы в качестве химиотерапии раковых заболеваний, поскольку ингибирование нормальной функции микротрубочек может приводить к остановке неконтролируемого клеточного деления и замедлению роста опухоли. Однако реакция на такие лекарственные препараты может быть индивидуальной у каждого пациента и существует потребность в автоматических методах оценки чувствительности клеток пациента к препарату для внесения изменения в режим лечения. Такая оценка может производиться по изображениям микротрубочковых сетей после применения препарата.

В работе рассматриваются как микротрубочки в живой клетке (*in vivo*), так и структуры микротрубочек во внеклеточной среде (*in vitro*). Во внеклеточной среде микротрубочки исследуют для того, чтобы исключить максимальное количество

факторов, которые могут влиять на работу микротрубочек для того, чтобы упростить экспериментальную работу и процесс извлечения вывода из наблюдений.

В последнее время также наблюдается все больший интерес к применению цифровых методов, в том числе методов машинного обучения, к биологическим объектам. Применение новейших нейросетевых архитектур для исследования биологических изображений позволяет не только автоматизировать работу лаборантов и медицинского персонала, но и получить результаты точнее и объективнее, чем человек-эксперт. Особенно ценна такая автоматизация в развивающихся странах, где человек со смартфоном при наличии хороших алгоритмов анализа симптомов и медицинских изображений может оказывать «квалифицированную» медицинскую помощь.

В работе рассматривается проблема системного анализа изображений микротрубочковых структур. Такой анализ может позволить производить корректировку терапии для пациента, выявляя индивидуальную восприимчивость клеток к лекарственным препаратам, нацеленным на микротрубочки, таким как паклитаксел. В работе рассматриваются несколько методов анализа радиальности микротрубочек, свойства, которым характеризуется то, в норме находится система или же нормальное состояние системы нарушено.

Первый метод анализа, рассматриваемый в работе, это измерение падения флуоресценции от центра клетки к периферии. В норме падение происходит с явно выделенным резким перепадом от участка максимальной концентрации флуоресцентно помеченного тубулина к периферии клетки. Под воздействием же агентов, нарушающих радиальность, падение флуоресценции становится менее выраженным.

Вторым методом является оценка геометрии кластера самых ярких пикселей. Для этого устанавливается определенная граница яркости, выше которой пиксели изображения попадают в кластер. В клетках с радиальной системой такой кластер компактен, в то время как в клетках с нарушенной радиальностью он более «размазан» и отсутствует ярко выраженный центр кластера. Для более точной оценки учитывается также форма клетки, для этого клетка вписывается в эллипс и параметры эллипса используют для нормировки геометрии кластера ярких пикселей.

В качестве третьего метода используются глубокие сверточные нейронные сети. Такие системы в последнее время зарекомендовали себя во многих задачах компьютерного зрения, в том числе и на биологических объектах. Однако, в отличие от других методов, для правильной работы нейронных сетей необходимо обучение на большом объеме данных.

Для того, чтобы обучать такие нейросетевые модели, был сформирован набор данных (датасет) изображений клеток линии HeLa под воздействием разных

концентраций препарата paclitaxel – 0, 0.1M и 1M. Выбор концентраций был обусловлен тем, что если присутствие/отсутствие химического агента довольно легко распознается как вышеупомянутыми методами, так и человеком, то различить разные концентрации становится практически невозможно. В каждом классе было собрано 2000 изображений. Размер обучающей выборки был увеличен за счет поворотов и отражений. Тем не менее, размер обучающей выборки все еще был мал для обучения стандартных глубоких сверточных нейронных сетей и в работе были применены два способа обхода этого ограничения: обучение сверточной сети небольшого размера и трансферное обучение с помощью предобученной на большом датасете ImageNet сверточной части. В результате экспериментов трансферное обучение показало наилучшие результаты, превзойдя в том числе и оценку человеком.

Также в работе ставится задача создания модели динамики микротрубочковой сети в клетке. Модель должна была отображать динамику и сложные эффекты, связанные с геометрией клетки и внутриклеточных компонентов. Помимо этого, модель должна иметь возможность задания геометрии клетки произвольной сложности без дополнительных усилий со стороны пользователя и параметры модели должны быть интуитивно понятны пользователю.

Модель была реализована как независимый программный продукт. Задание сложной геометрии производится с помощью 2D изображения, в котором уровень белого соответствует высоте клетки в соответствующих координатах. Этот способ максимально удобен для специалистов в клеточной биологии – целевой аудитории пользователей программы не только потому, что обращения с изображениями привычны для клеточных биологов, но и потому, что возможные почти прямые преобразования из изображений клеток с прокрашенной цитоплазмой в модельную систему.

Микротрубочки были смоделированы как линейные структуры, состоящие из цилиндров заданной длины и диаметром, соответствующим реальному диаметру микротрубочки в живой клетке. Помимо диаметра, цилиндры задаются вектором своей оси, и длиной, являющимися динамическими параметрами. Рост и сокращение микротрубочек происходит по законам, отображающим ход химических полимеризации и деполимеризации тубулина. Присоединение и отсоединение тубулина происходит согласно вероятностям, которые зависят от общей концентрации деполимеризованного тубулина в клетке. Также присутствует процесс перехода тубулина из более стабильного состояния в более нестабильное через определенное время, что соответствует тому, что свободный тубулин в цитоплазме находится в конформации, связанной с молекулой ГТФ, а после присоединения к микротрубочке ГТФ гидролизует и в теле микротрубочки тубулин чаще находится в конформации, связанной с молекулой ГДФ.

Полученная модель, несмотря на относительную простоту, позволила воспроизвести многие наблюдаемые в клетке эффекты, такие как зависимость динамики сборки от формы клетки, график восстановления микротрубочки после разрушения, локализацию микротрубочек в безцентросомном пространстве и др. Это может говорить о том, что сложные эффекты, наблюдаемые в клетке возникают в том числе и из за взаимодействия многокомпонентных систем, при этом взаимодействия отдельных компонент может описываться относительно простыми правилами.

Последним аспектом, исследованным в работе, было моделирование самосборки микротрубочковых структур во внеклеточном пространстве (*in vitro*). Такие эксперименты могут выделить механизмы образования внутриклеточных структур, таких как радиальная сеть или митотическое веретено. Изучая микротрубочки во внеклеточном пространстве, исследователи могут контролировать то, какие факторы могут оказывать воздействие на систему. Так, добавляя в среду только тубулин, клеточные моторы и вещества, необходимые для функционирования клеточных моторов, можно наблюдать самоорганизацию микротрубочек в упорядоченные структуры, такие как звезды, воронки и пучки.

В работе стояла цель разработать модель, полностью способную воспроизвести все известные типы структур, полученные в таких средах (*in vitro*). Автор высказал гипотезу, что предыдущими моделями из научной литературы все возможные структуры не были воспроизведены из-за того, что они работали в двумерном пространстве и разработал квази-трехмерную в качестве компромисса между сложностью моделируемого пространства и быстродействием модели.

Для расчета движений микротрубочек были учтены силы, вызванные упругостью микротрубочек, действиями белков моторов и вязким сопротивлением цитоплазмы. Трубочки и моторы находятся и взаимодействуют в двумерных слоях с возможностью переместиться между слоями с определенной вероятностью. При присоединении моторов к нескольким микротрубочкам одновременно возникает движение концов трубочек к друг другу и изменение положение микротрубочек в пространстве. С помощью такой модели автору удалось воспроизвести все необходимые структуры без добавления дополнительных и необусловленных взаимодействий, что указывает на валидность применения квази-трехмерного подхода для моделирования динамики в относительно «плоских» средах.

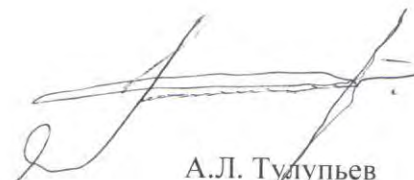
Текст работы хорошо структурирован, обзор литературы достаточно полон, вводит в предмет и область исследования и описывает современные научные работы и релевантные результаты. В работе хорошо описаны необходимые моменты для воспроизведения результатов. Результаты приведены в необходимом объеме, проинтерпретированы и сделаны выводы.

По работе имеются следующие замечания и вопросы:

1. Недостает развернутой аргументации того, что нейросеть не будет "переобучаться" при тех относительно малых объемах выборки, которой располагает исследователь;
2. Не оценен эффект дискретизации объекта, когда объемный объект представляется в виде слоев, причем микротрубочки, даже находящиеся в соседних слоях, не взаимодействуют;
3. Рассматривались ли альтернативные модели микротрубочек? Как определялся (обосновывался) относительный размер цилиндров — звеньев, из которых состоит модель микротрубочки?
4. Как именно учитывались темпоральные зависимости в синтезе конфигураций микротрубочек?
5. В работе рассмотрены отдельно аспекты стационарных микротрубочек в клетке и движущихся микротрубочек во внеклеточном пространстве, но не комментируется возможные модели движущихся микротрубочек в клетке.

Диссертация Шпильмана Алексея Александровича на тему: «Анализ и компьютерное моделирование микротрубочковых структур» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 01.09.2016 № 6821/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Шпильман Алексей Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 1.2.2. Математическое моделирование, численные методы и комплексы программ. Пункты 9 и 11 указанного Порядка диссертантом не нарушены.

Председатель диссертационного совета
доктор физико-математических наук, профессор,
профессор кафедры информатики СПбГУ



А.Л. Тулупьев
22.10.2021

ПОДПИСЬ РУКИ
У ДОСТОВЕРЯЮ

Тулупьева А.Л.

НАЧАЛЬНИК УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ
Мурсова С.Я.

22 ОКТ 2021

Мурсова С.Я.

