

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертационную работу Шабалина Владимира Владимировича
«Биофизические механизмы формирования твердофазных структур
биологических жидкостей человека», представленную на соискание
учёной степени доктора биологических наук по специальности
03.01.02 – биофизика

Актуальность темы диссертационной работы. Квалификационное исследование Шабалина Владимира Владимировича посвящено важной проблеме - структурной трансформации биологических жидкостей человека при переходе в твердую фазу в процессе испарения.

В биологических жидкостях постоянно происходят высокоскоростные качественные и количественные изменения молекулярного состава и характера их взаимодействия в условиях физиологической нормы, экстремальных и патологических состояниях. Анализ этих изменений может выявить принципиально новые подходы к интегральной оценке гомеостаза, как в норме, так и в условиях патофизиологических процессов в организме.

Учитывая, что биологические жидкости являются сложной мультикомпонентной неравновесной динамической системой ее исследование в нативном состоянии весьма проблематично. Исходя из этого, предложение диссертанта анализировать системную организацию биожидкостей после перевода ее в твердую фазу, т.е. в состояние резкого повышения прочности химических связей, как межмолекулярных, так и внутримолекулярных является вполне обоснованным. Фазовый переход биологической жидкости из высоко динамического жидкого состояния в твердое, приводит к формированию устойчивого статического порядка, который доступен для наблюдения и поддается формализации. Представляет большой интерес то, что образуемые геометрические структуры отражают как индивидуальные особенности организма, так и особенности известных патологических нарушений.

Актуальность исследований, проведенных в диссертационной работе В.В. Шабалина, определяется прежде всего новыми экспериментально-

теоретическими подходами к исследованию процессов, происходящих в биологических жидкостях при их фазовом переходе, и к анализу структурных образований, формирующихся в результате самоорганизации компонентов, растворённых в биологических жидкостях, а так же практической значимостью исследований, направленных на выявление новых характеристик, позволяющих давать интегральную оценку состояние организма в норме и при развитии различных патофизиологических процессов.

Учитывая все выше сказанное, можно заключить, что, тема диссертации актуальна, как с позиций фундаментальной науки, так и практической ценности в области разработки новых методов диагностики.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций. Представленные в диссертационной работе исследования проведены на большом, статистически значимом количестве верифицированных образцов естественных и модельных жидкостей. Сравнительный анализ происходящих в них процессов структурной организации при фазовом переходе дал возможность уточнить многие детали механизмов переходных этапов трансформации биологических жидкостей в структуры твёрдой фазы. Сопоставление формирования структур твёрдой фазы биологических жидкостей условно здоровых людей и пациентов с различными видами патологии показало значительные достоверные различия в структурных переходах этих жидкостей.

Дизайн и методы исследования адекватны поставленной цели и задачам. Автором были использованы, как известные, так и предложены новые качественные и количественные параметры оценки структур твёрдой фазы исследуемых жидкостей.

Достоверность и новизна полученных результатов Разработанный соискателем математический аппарат описания процессов формирования твёрдой фазы из биологических жидкостей, даёт углублённые сведения об

особенностях пространственного перераспределения растворённых компонентов биологических жидкостей при клиновидной дегидратации и механизмах формирования системообразующих структур твердой фазы. Это позволило описать новые текстурные маркеры твердой фазы биологических жидкостей, характерные для определённых заболеваний, и дать количественную оценку их параметров.

Результаты сравнительной оценки процессов структуризации биологических жидкостей и модельных растворов при фазовых переходах позволили выявить общую закономерность смены фазовых состояний жидкостей при клиновидной дегидратации.

Статистическая обработка проведена с помощью современного пакета прикладных программ, подтвердивших высокую степень достоверности полученных результатов. Основные результаты диссертационной работы неоднократно докладывались и обсуждались на профильных конференциях, съездах и конгрессах, они хорошо известны научному сообществу. Одна из его публикаций вышедшая в 2007 году "Морфологическая картина ротовой жидкости у пациентов с патологией полости рта" цитируется более 60 раз, а общее число цитирований работ соискателя превышает 200. Все это говорит о признании работ В.В. Шабалина российским научным сообществом. Вместе с тем следует указать соискателю на практически полное отсутствие его публикаций в международных журналах, что не позволяет оценить его работы на уровне международного научного экспертного сообщества.

Всего же основные результаты работы изложены в 45 печатных трудах: в 1 монографии, в 27 статьях в журналах, включённых в перечень ВАК, в 6 статьях в «неваковских» рецензируемых журналах, в 20 статьях, опубликованных в сборниках научных трудов и в материалах конференций. Получено 5 патентов РФ на изобретения. Все выше сказанное дает основание считать, что вынесенный на защиту материал достоверен, обладает

необходимой степенью новизны и хорошо известен российскому научному сообществу.

Значимость для науки и практики. Значимость для науки результатов диссертационной работы состоит в том, что автор в экспериментально-теоретическом обосновании механизмов системной и локальной организации биологических жидкостей в процессе перехода в твёрдую фазу, даёт ряд принципиально важных редемаркаций в описании деталей этих механизмов. Разработанный математический аппарат описания процессов формирования фазии биологических жидкостей и созданная на его основе система автоматизированного анализа текстур растровых изображений фазий биологических жидкостей, обеспечивает количественную оценку параметров, анализируемых текстуры и раскрывает их новые возможности для клинической диагностики.

Полученные результаты могут быть использованы как в научно-исследовательской работе (в области теории самоорганизации биологических жидкостей, микрогидродинамики, нанотехнологии), так и в медицинской практике. Кроме того, разработанный метод текстурной сегментации растровых изображений может быть применён для решения соответствующих задач не только в биологии и медицине, но и в иных предметных областях (геология, картография, материаловедение и др.). Результаты работы могут также использоваться в учебно-педагогическом процессе в вузах медико-биологического профиля.

Оценка содержания диссертации. Диссертация изложена на 375 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, 4 глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка цитированной литературы, включающего 163 источников отечественных и 206 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 16 таблицами, 107 рисунками.

Во введении показана актуальность проблемы, определены цель и задачи работы, научная новизна исследований, теоретическая и практическая значимость полученных результатов. Подчёркнуто, что исследования физико-химических механизмов перехода биожидкостей в твёрдую фазу при клиновидной дегидратации, остаются малоизученными, что затрудняет трактовку формирующихся диагностических маркёров в отношении их связи с патологическими процессами. Это и определяет цели и задачи, установленные в диссертации.

В первой главе (обзор литературы) дан тщательный анализ публикациям, посвященным физико-химическим и биофизическим основам процессов самоорганизации биологических жидкостей. Показано, что биологические жидкости могут находиться в равновесном и неравновесном состояниях, что определяет особенности их перехода в твёрдую фазу - интегрированную структуру, имеющую устойчиво упорядоченный вид. Рассмотрены различные теории структурной организации жидкостей, находящихся в различных физических состояниях. Большое внимание уделено работам по изучению свойств биологических жидкостей человека (сыворотка крови, ротовая жидкость, носовой секрет и др.). Рассмотрены работы по автоматизированному анализу изображений.

Во второй главе автор детально описывает материал, взятый для исследования, материально-техническое обеспечение, дизайн и методологию собственных исследований. Вызывает уважение то, что диссертант отошел от традиционного морфологического описания структур формируемых при дегидратировании биологических жидкостей и использовал комплексный подход в изучении процессов самоорганизации упорядоченных структур при формировании тонких обезвоженных пленок. Для анализа формирующихся структур им были использованы биологические, физические и математические группы методов, которые органически взаимно дополняли друг друга. Такой комплексный подход дал возможность выделить основные

количественные характеристики процессов, происходящих при дегидратации биологических жидкостей и представить строгое физическое описание формирующихся при этом структур в норме и патофизиологических состоянием организма.

Отдельно следует отметить, что автор владеет современными методами статистического анализа и адекватно их использует для выявления закономерностей в исследуемых им процессах.

В третьей главе описана разработанная диссертантом модель гидродинамики течений жидкостей внутри капли и анализа изменений основных ее параметров (объем, масса, контактный угол, скорость движения фазового фронта) в процессе дегидратации. Анализ модели показал, что на динамику течений в процессе испарения капли мало влияют гравитационные силы, температурные градиенты, можно пренебречь такими процессами как эффектом Марангони (возникновением поверхностных потоков за счет температурной зависимости поверхностного натяжения) и не учитывать спонтанные мало амплитудные высокочастотные колебания объема капли. Основными параметрами и процессами, которые определяют эволюцию капли, служат капиллярные силы и силы взаимодействия с подложкой, а так же процесс диффузии пара с поверхности капли. Принципиально важно, что Шабалину В.В. удалось разделить многочисленные параметры, входящие в исходную модель, по их степени влияния на процесс дегидратации капли. Это позволило значительно упростить гидродинамическую модель течений жидкости в высыхающей капле и провести системный анализ эволюции течений, возникающих внутри капель многокомпонентных жидкостей, высыхающих на плоской подложке, и показать влияние этих течений на перенос веществ.

Результаты, полученные с помощью упрощенной модели, показали, что транспортная динамика тонкой капли, испаряющейся непрерывно, с учетом

диффузии и с учетом конвекции при испарении, дает простую и достаточно ясную картину для описания общих явлений движения контактной линии и определения профиля осадка.

Четвертая глава посвящена исследованию механизмов формирования упорядоченных структур при клиновидной дегидратации в испаряющейся капле. Продемонстрировано, что под действием градиентов концентрации и температуры в образце формируется семейство горизонтальных и вертикальных конвективных течений, которые образуют периодические конвективные ячейки Бенара. По мере выпаривания растворителя преимущественно на границах структурных гидродинамических элементов достигается состояние перенасыщения, которое сопровождается выпадением осадка, отвердеванием геля и кристаллизацией солей. Такой переход от жидкой фазы через гелеподобное состояние к твердой дегидратированной фазе позволяет сохранить информацию о пространственной структуре потоков внутри жидкой капли.

На основе существующих представлений и новых экспериментальных данных, полученных диссертантом, им разработана математическая модель формирования последовательности зональных кольцевых структур в высыхающих белковых и белково-солевых каплях модельных жидкостей. Анализ модели позволил количественно связать измеряемые структурные масштабы с динамиками компонент удельной поверхностной энергии, силами поверхностного и межфазного натяжения жидкой части капли, с седиментацией веществ в капле, которая фиксирует возникающие динамические структуры. Диссертант обоснованно предполагает, что применение подобной модели, в перспективе, может существенно ограничить число возможных сценариев формирования кольцевых структур, что позволит упростить трактовку путей их образования.

Проведенные исследования процессов высыхания капли модельных растворов показали, что в них формируются структуры, аналогичные

возникающим в растворах биологических жидкостей. Полученные автором результаты определяют выбор оптимальных параметров капли биологической жидкости (объёмных, температурных, концентрационных и др.) при постановке метода клиновидной дегидратации, способствуют пониманию процессов структурирования биологических жидкостей и формирования специфических маркерных образований, ценных для клинической диагностики различных патологических состояний.

В пятой главе диссертации рассматривается вопрос компьютерной идентификации отличительных признаков и маркеров в текстуре фаций биологических жидкостей в норме и при патологии. Диссертант заостряет внимание на том, что в настоящее время изучение структур фаций биологических жидкостей мало информативно, если нет ярко выраженных отличий нормы от патологии, а также при полиморбизме. Для устранения этого недостатка он, прежде всего, сосредоточил свои усилия на поиск подходов к улучшению чувствительности и избирательности метода клиновидной дегидратации.

С этой целью был определен набор инвариантных свойств высушенной капли, который слабо зависит от условий дегидратации и в основном определяется составом биологических жидкостей. Это дало возможность существенно упростить описание структур фаций биологических жидкостей, подойти к их математической формализации и разработке вычислительных методов структурного анализа особенностей отличительных признаков и маркеров в текстуре фаций биологических жидкостей в норме и при патологии.

Для формализации изображений фации использован подход, который основан на матрицах вероятностного распределения яркости на изображении и был выделен набор базовых статистических текстурных признаков. На основе анализа текстур элементов фации был построен классификатор, который позволяет определять тип маркеров в фациях биологических

жидкостей. При этом информативные признаки, установленные для каждого класса маркерных текстур фаций биологических жидкостей, и разработанная классификация этих текстур, показали возможность более точного определения маркеров патологии с помощью компьютерной обработки изображения по сравнению с визуальным морфологическим анализом. Диссертант убедительно показывает, что разработанный им метод структурного анализа биологических жидкостей отличается высокой чувствительностью и позволяет дифференцировать различные формы патологических структур в фациях сухой капли, а также оценивать системное состояние организма.

Выводы диссертационной работы статистически обоснованы, соответствуют общим теоретическим представлениям о фазовых переходах жидкостей в твёрдую фазу и вытекают из тщательного анализа результатов экспериментально-теоретических исследований, проведенных автором.

Вместе с тем, считаю необходимым сделать ряд замечания и высказать некоторые пожелания.

- 1 Используемые автором модели в виде упрощенных аналогов биологических жидкостей могли бы быть представлены более широким спектром различных вариантов, что позволило бы дать более детальный анализ возможных механизмов трансформации жидкостей в твёрдую фазу.
- 2 Необходимо отметить практически полное отсутствие у соискателя публикаций его экспериментальных и теоретических работ в международных журналах, что сильно сужает круг заинтересованной научной аудитории и соответственно рекомендовать ему приложить усилия для исправления этого недостатка в будущем.
- 3 Вынужден отметить некоторую небрежность в оформлении рукописи. Не перечисляя все огрехи, в качестве одного из грубых примера привожу следующие. На страницах 255 и 256 в таблицах 5,5 и 5,6 не

указано какие именно показатели имеют достоверные различия с $p < 0.05$.

- 4 Следует отметить, что соискатель фактически решает задачу многомерного статистического анализа поведения сложной динамической системы в норме и патологии. Для ее описания он использует ряд функциональных параметров. При этом в диссертации анализируемые параметры рассматриваются как независимые и их статистический анализ не учитывает их возможную взаимосвязь. Полагаю, что было бы более корректно использовать подходы многомерной статистики, что позволило бы более уверенно дифференцировать норму и различные виды патологии.

Кроме того, вызывает удивление, что соискатель не использует такой популярный подход, как (Receiver Operating Characteristic curve) - ROC анализ, который позволяет оценить диагностическую эффективность метода с учетом последствий ложных решений. ROC кривые отражают взаимную зависимость ложноположительных и истинно положительных результатов и позволяют наглядно сопоставить диагностическую эффективность различных методов исследования при обнаружении одного и того же патологического процесса. Полагаю, что в своих дальнейших исследованиях диссертант учтет эти замечания.

- 5 Материал диссертации во многом может быть интересен в области практической медицины, поэтому было бы полезно издать методические рекомендации по применению метода компьютерного анализа структур твёрдой фазы биологических жидкостей в лабораторной клинической диагностике, а переработанный материал диссертации издать в виде отдельной монографии.

Однако высказанные пожелания и замечания не снижают ценность проведенных исследований и не влияют на главные теоретические и

практические результаты диссертации. Структура диссертации выстроена логично, содержание изложено в хорошем научном стиле, последовательно и чётко, что способствует пониманию хода исследований, теоретических позиций автора, сформулированных положений, их интерпретаций и выводов.

Заключение

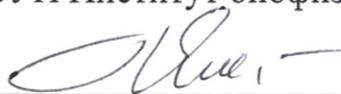
Подводя общий итог, подтверждаю, что диссертация Шабалина Владимира Владимировича на тему «Биофизические механизмы формирования твердофазных структур биологических жидкостей человека» является завершённой научно-квалификационной работой, вносящей существенный вклад в область исследования биофизических механизмов фазовых переходов биологических жидкостей, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны положения, совокупность которых можно квалифицировать как решение крупной научной проблемы – установлены алгоритмы биофизических механизмов формирования маркерных структур твёрдой фазы биологических жидкостей, имеющих важное значение для диагностики различных патологических состояний организма человека. Новые результаты, полученные диссертантом, имеют большое значение для науки и практики в области биологии и медицины. Работа базируется на статистически достоверном объёме исходных данных, их качественном анализе и соответствующих выводах. Исследования проведены на современном научном уровне, с применением компьютерного анализа и математических методов. Материал диссертации логично структурирован, изложен ясным языком, чётко оформлен. Выводы и практические рекомендации обоснованы. Работа выполнена в полном

соответствии с паспортом научной специальности **03.01.02 – биофизика**.
Автореферат отражает основное содержание диссертации.

По обоснованности и достоверности выводов, научной новизне основных положений и практической значимости диссертационная работа Шабалина Владимира Владимировича полностью соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 .09.2013г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016 г.), а ее автор Шабалин Владимир Владимирович заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.02 - биофизика.

Официальный оппонент

Доктор биологических наук,
профессор, главный научный сотрудник
ФГБУН Институт биофизики клетки РАН

 Чемерис Николай Константинович

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
институт биофизики клетки Российской академии наук
142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, д. 3.

« 09 » апреля 2018 г.

Подпись заверяю
Ученый секретарь ФГБУН
Институт биофизики клетки РАН
к.б.н. Шавкунов Константин Сергеевич
8(4967)73-93-09

