

ОТЗЫВ

официального оппонента Братченко И.А.

на диссертационную работу Зыковой Лидии Александровны

«Разработка методов и средств ультразвуковой кардиографии малых биологических объектов *in vivo*», представленную на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 1.3.2. «Приборы и методы экспериментальной физики»

Рыба *Danio rerio* является классическим модельным объектом в биологии развития благодаря её быстрому развитию, прозрачности эмбрионов и доступности для генетического анализа. Особый интерес представляют исследования сердечно-сосудистой системы данных организмов на ранних стадиях. Традиционные оптические методы визуализации, несмотря на широкое применение, имеют существенные ограничения при длительном мониторинге живых объектов. Альтернативой может служить акустическая микроскопия, которая обеспечивает неинвазивную визуализацию внутренних структур. При этом стандартные ультразвуковые сканеры не обеспечивают достаточного разрешения для объектов, с размерами сердца 100–300 мкм. Для таких задач требуется применение сканирующего акустического микроскопа (20–200 МГц), обеспечивающего необходимое пространственное разрешение. Главным ограничением таких устройств является невозможность одновременной записи ультразвуковых сигналов в разных точках сердца для анализа его динамики. Осуществить синхронизацию ультразвуковых откликов с сердечным ритмом можно по сигналу электрокардиографии, однако его затруднительно измерить у низших позвоночных на ранних стадиях развития. В диссертационной работе Зыковой Л.А., посвященной кардиографическим исследованиям малых организмов, предложено осуществлять одновременную регистрацию ультразвуковых и видео данных, а синхронизацию ультразвуковых откликов производить по сигналу фотоплетизмографии. Учитывая сказанное, тему диссертационной работы следует признать **актуальной**.

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, списка публикаций автора по теме исследования и списка цитируемой литературы. Объем диссертации составляет 146 страниц печатного текста и содержит 53 рисунка, 2 таблицы и список литературы из 123 наименования.

Во введении описана актуальность темы исследования, сформулированы цели и задачи работы, ее научная новизна, практическая значимость и представлены сведения об апробации результатов. Также представлена положения, выносимые на защиту, описан личный вклад автора и указано общее число публикаций по теме диссертации.

В первой главе приведен литературный обзор методов визуализации, применяемых для исследования сердечной деятельности модельных организмов, в частности низших позвоночных (*Danio rerio*). Рассмотрены как оптические, так и ультразвуковые методы. Особое внимание уделено анализу возможностей и ограничений этих методов при изучении квазипериодических процессов, характерных для сердечной деятельности. Проведенный анализ выявил ограничение ультразвуковой микроскопии, связанное с последовательной регистрацией асинхронных данных в различных точках, что приводит к необходимости восстановления временных соотношений между сигналами. На основании этого обоснована потребность в разработке метода синхронизации ультразвуковых данных с сердечным ритмом, регистрируемым оптическим блоком, а также создании экспериментального стенда, обеспечивающего совместную регистрацию данных для комплексных исследований *in vivo*.

Вторая глава посвящена описанию экспериментального стенда, разработанного для исследования сердечной деятельности эмбрионов и личинок *Danio rerio*. Стенд представляет собой модульную систему, предназначенную для синхронной регистрации данных. Первый модуль, построенный на базе инвертированного оптического микроскопа, позволяет получать сигналы сердечного ритма на основе видео данных, необходимые для синхронизации с ультразвуковыми данными. Второй модуль включает высокочастотный ультразвуковой микроскоп, регистрирующий сигналы в разных форматах с высоким пространственно-временным разрешением. Конструкция стенда обеспечивает двусторонний доступ к иммобилизованному объекту исследования, что позволяет проводить одновременную запись оптических и ультразвуковых данных.

Третья глава посвящена решению задачи совместной регистрации ультразвуковых и оптических данных. Ограничение экспериментального стенда, связанное с механическим сканированием ультразвукового датчика, исключает возможность одновременного получения измерений по всей области сердца, что требует последующей цифровой обработки и согласования записанных ультразвуковых сигналов. Для преодоления этого ограничения был реализован метод синхронизации данных, полученных в различных точках, по оптическому сигналу, фаза которого определяется сердечным ритмом. На основе этого подхода разработан алгоритм, восстанавливающий корректные временные соответствия между асинхронными ультразвуковыми данными, фиксируемыми в различных областях сердца, и конкретными фазами сердечного ритма. На основе построенной теоретической модели показано, что основным источником погрешности синхронизации выступает аддитивный шум в оптическом измерительном блоке. Проведенная оценка показала, что величина данной погрешности для типичных параметров

эксперимента составила приблизительно ± 10 мс. Учитывая, что период сердечных сокращений, как правило, больше 200 мс, полученная точность синхронизации представляется достаточной для анализа динамических процессов в сердце.

В четвертой главе представлены результаты апробации разработанного метода синхронизации и экспериментального стенда на примере рыбы *Danio rerio* на ранних стадиях развития. Метод показал свою эффективность для анализа как быстрых динамических процессов в сердце, таких как движение клеток крови, так и медленных, включающих изменение морфологии сердечных камер. Исследование кровотока выполнялось путем высокочастотной фильтрации ультразвуковых данных, которая позволила выделить эхо-сигналы от движущихся клеток крови. Обработка этих сигналов с помощью метода двумерной автокорреляции позволила рассчитать пространственно-временное распределение кровотока и количественно оценить его скорость, которая достигала 25 мм/с, что характерно для исследуемых в работе объектов. Для анализа морфологии сердца использовалась низкочастотная фильтрация ультразвуковых данных, которая обеспечила оценку размеров сердечных камер. Полученные значения (от 60 до 120 мкм) согласуются с известными характерными размерами сердца *Danio rerio* на ранних стадиях развития. Разработанные методы визуализации малых организмов также могут быть использованы для изучения влияния внешних факторов на сердечную деятельность. Было продемонстрировано изменение ультразвуковых сигналов и характер распространения кровотока в результате длительного применения анестетика и при наличии врожденной сердечной патологии.

Научная новизна диссертационной работы заключается в следующем:

Предложен мультимодальный метод исследования сердечной деятельности *in vivo* малых биологических объектов на ранних стадиях развития, основанный на одновременной регистрации ультразвуковых и оптических сигналов. Для реализации данного метода разработан и создан экспериментальный стенд, в котором инвертированный оптический микроскоп сочленен со сканирующим акустическим микроскопом, что позволяет проводить с противоположных сторон одновременно регистрировать оптические и акустические изображения организма. Разработаны методика совмещения акустической и оптической осей, способы подготовки, иммобилизации и позиционирования объекта.

Предложен метод временной синхронизации ультразвуковых данных, записанных асинхронно в различных областях исследуемого органа, с фазами сердечного цикла и восстановления ультразвукового пространственно-временного сигнала, корректно отображающего структуру работающего сердца. Проведен анализ погрешности

синхронизации, показано, что ее теоретические оценки соответствуют экспериментально полученным данным.

Разработаны оригинальные алгоритмы обработки ультразвуковых сигналов, синхронизированных с сердечным ритмом по сигналу фотоплетизмографии. Показано, что путем высокочастотной и низкочастотной фильтрации полученных сигналов возможно разделение откликов от элементов крови и стенок сердечных камер, соответственно. Данные алгоритмы позволяют получать пространственно-временное распределение скорости кровотока в сердце с характерным размером примерно 100–300 мкм, а также отслеживать динамику изменения размеров, формы камер и стенок сердца.

Достоверность полученных научных результатов обеспечивается применением в работе известных методов микроскопии, использования точного измерительного оборудования, а также достаточным объемом экспериментальных данных. Полученные количественные оценки согласуются с результатами, ранее опубликованными в рецензируемых научных источниках, что дополнительно подтверждает корректность проведённых измерений и выводов работы.

Практическая значимость работы заключается в следующем:

Разработанный метод и экспериментальный стенд позволяют в режиме *in vivo* одновременно регистрировать оптические и ультразвуковые сигналы от сердца малых организмов и на их основе количественно оценивать динамику кровотока и движение сердечных стенок. Предложенные алгоритмы обработки ультразвуковых данных могут быть применены для оценки состояния и динамики развития сердца при воздействии различных внешних факторов (химических, физических и биологических). Практическая значимость работы подтверждается актом использования результатов диссертации, в котором отмечается, что разработанный аппаратно-программный комплекс открывает новые перспективы для исследований метаболических процессов и кинетики развития, а также для доклинических исследований препаратов и оценки влияния условий среды на развитие сердечно-сосудистой системы.

Все защищаемые положения и выводы работы **обоснованы** и изложены в тексте диссертационной работы.

Результаты диссертационной работы изложены в 24 научных работах в рецензируемых научных изданиях, входящих в список изданий, рекомендуемых для опубликования основных научных результатов диссертации на соискание учёной степени кандидата наук. Получены 1 патент на полезную модель и 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

В качестве замечаний и комментариев к диссертационной работе можно отметить следующее:

1. В работе указано, что исследования сердечно-сосудистой системы проводились на рыбах на ранних стадиях развития. Для оценки новизны разработанного метода хотелось бы понимать, проводились ли ранее аналогичные исследования сердечно-сосудистой системы у рыб, в частности с применением высокочастотной акустической микроскопии (20-200 МГц)?
2. В работе описано, что для экспериментальной оценки погрешности определения скорости кровотока разработанный стенд был протестирован на регулируемом потоке суспензии дрожжей, выступающей в качестве фантома крови. Возникает вопрос, почему для валидации метода измерения скорости кровотока у живых организмов был выбран именно этот тестовый объект?
3. Обнаружение аритмии у эмбрионов представляет собой значимый экспериментальный результат, демонстрирующий эффективность разработанной методики. Однако он не нашел отражения в положениях, выносимых на защиту. Возможно, было бы целесообразно включить его в список основных результатов.
4. Ни в тексте диссертации (Глава 2), ни в таблице 1 с характеристиками разработанного экспериментального стенда не указаны параметры приемного ультразвукового тракта, такие как полоса частот, коэффициенты усиления и шума.
5. На Рис. 4.16 было бы желательно показать на диаграммах области, соответствующие описываемым в тексте фазам сердцебиения.

Общее заключение

Указанные замечания и вопросы касаются изложения материала и не снижают положительную оценку диссертационной работы. Принимая во внимание объем проведенных исследований и полученные результаты, диссертация оценивается как весомый научно-технический труд.

Тема диссертации и характер выполненных работ и исследований полностью соответствует специальности 1.3.2. «Приборы и методы экспериментальной физики». Проведенное исследование соответствует пунктам 4 и 7 Паспорта специальности 1.3.2. «Приборы и методы экспериментальной физики», область знаний «Технические науки», а именно, «Разработка и создание экспериментальных установок для проведения экспериментальных исследований в различных областях физики» и «Разработка и создание лечебно-диагностических методик и аппаратурных комплексов для биомедицинских исследований». Результаты проделанной работы изложены в публикациях в

рецензируемых журналах и в докладах на конференциях, автореферат полностью отражает основные положения и выводы диссертации.

Диссертационная работа Зыковой Лидии Александровны на тему «Разработка методов и средств ультразвуковой кардиографии малых биологических объектов *in vivo*» является законченным научным исследованием, соответствует критериям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата технических наук согласно пунктам 9-14 положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. в действующей редакции. Автор диссертации Зыкова Лидия Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 1.3.2. «Приборы и методы экспериментальной физики».

Я, Братченко Иван Алексеевич, даю согласие на включение моих персональных данных в документы, связанные с защитой диссертации Зыковой Лидии Александровны и их дальнейшую обработку.

Официальный оппонент,

доктор физико-математических наук,
специальность 1.5.2 – Биофизика, ведущий
научный сотрудник НОЦ «Фундаментальная и
прикладная фотоника. Нанопотоника»,
ФГАОУ ВО «БФУ им. И. Канта»



Братченко Иван Алексеевич

Контактные данные:

Братченко Иван Алексеевич, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник НОЦ «Фундаментальная и прикладная фотоника. Нанопотоника».

Место работы: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Балтийский федеральный университет им. И. Канта».

Адрес места работы: 236041, Россия, Калининград, ул. Александра Невского, д. 14

Адрес электронной почты: post@kantiana.ru

Телефон: +7 (4012) 59-55-95

