



Минобрнауки России  
Федеральное государственное  
бюджетное научное учреждение  
«Федеральный исследовательский центр  
Институт прикладной физики  
им. А.В. Гапонова-Грехова  
Российской академии наук»  
(ИПФ РАН)

Ульянова ул., 46, Бокс-120, Нижний Новгород, 603950

Тел. (831) 436-62-02

Факс (831) 416-06-16

E-mail: dir@ipfran.ru

http://www.ipfran.ru

ОКПО 04683326, ОГРН 1025203020193,

ИНН/КПП 5260003387/526001001

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора  
Федерального государственного научного центра  
«Федеральный исследовательский центр  
Институт прикладной физики им. А.В. Гапонова-Грехова  
Российской академии наук»

Гришин Михаил Юрьевич



2023 г.

22.11.2023 № 360/3326

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

## ОТЗЫВ

**ведущей организации на диссертацию Макаркина Михаила Андреевича «Системы проточной цитометрии для поиска и выделения редких объектов: моделирование и анализ изображений и сигналов», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. – Биофизика**

Диссертационная работа Макаркина Михаила Андреевича посвящена разработке методов анализа изображений для создания проточного *in vivo* цитометра на основе микроскопии светового листа и моделированию процессов движения полиэлектролитных микрокапсул при магнитной сепарации их из потока жидкости.

### Актуальность работы

Одной из непростых проблем для классических методов проточной цитометрии является выделение очень редких объектов в образцах крови. К ним могут относиться циркулирующие опухолевые клетки, носители для адресной доставки лекарств, различные патогены (инфекционные агенты, зараженные паразитами клетки), сгустки клеток, являющиеся зародышами тромбообразования. В данной работе диссертант сфокусировался на двух первых вариантах. Для решения этой проблемы уже достаточно

продолжительное время в мире разрабатываются цитометры, работающие *in vivo*, в которых детекция клеток и иных объектов непосредственно происходит в кровеносном сосуде в потоке исходной крови. Достаточно широко известны, используются в экспериментах на животных и проходят начальную стадию клинической апробации фотоакустические проточные цитометры, хорошо известны конструкции, основанные на флуоресцентной детекции при множественном светорассеянии. В данной работе рассматривается подход к созданию *in vivo* цитометра на основе выведения кровотока животного во внешнюю ячейку, детектирования объектов методом микроскопии светового листа в потоке неразбавленной крови и оснащенного дополнительной функцией магнитной сепарации объектов из потока. Создание данного цитометра потребовало решения ряда задач по обработке данных изображений и моделирования поведения магнитных объектов в потоке жидкости. Необходимо было скорректировать сильные искажения изображений объектов в виде комы, присутствующие вследствие полного внутреннего отражения части лучей, формирующих изображения флуоресцентных объектов стенками кюветы и вызванного этим ограничения апертуры светового пучка. Также необходимо было разработать методику подсчёта числа объектов в потоке и решить задачу оценки количества объектов в случае образования крупных агрегатов, в которых отдельные частицы становятся неразрешимыми. Помимо этого, было необходимо оценить количество объектов, которые собираются в области расположения концентратора на постоянном магните, обеспечивающего извлечение объектов из кровотока. Это нужно как для оценки эффективности работы магнитного сепаратора, так и для задач магнитного накопления носителей для адресной доставки лекарств с точки зрения оценки максимально возможных достижимых концентраций объектов и действующего вещества.

**Целью работы** является разработка метода обработки изображений проточной *in vivo* цитометрии с визуализацией для обнаружения в потоке цельной крови редких объектов, таких как циркулирующие опухолевые клетки или носители для адресной доставки лекарств и анализ процессов поведения магнитных объектов (нанокompозитных микрокапсул с частицами магнетита) в проточном канале цитометра при воздействии стационарного градиента магнитного поля (магнитной сепарации объектов из потока крови)

### **Содержание работы**

Во **введении** обосновывается актуальность исследований, проводимых в рамках данной работы, формируется цель, осуществляется постановка задач диссертационного исследования, излагается научная новизна и практическая значимость представляемой работы



**Первая глава** представляет собой обзор научной литературы по изучаемой проблеме. В ней описывается постановка задачи деконволюции изображения, проблемы с деконволюцией изображения в методах структурированного освещения, использование методов глубокого обучения в задачах деконволюции, особенности и применимость данного класса методов.

**Во второй главе** приведены используемые в работе материалы и методы. В главе описываются основные материалы, используемые для синтеза изучаемых объектов, оптические схемы системы на основе светового листа, особенности реализации программного обеспечения для работы с данными.

**Третья глава** описывает решение задачи деконволюции изображений, получаемых с помощью системы микроскопии светового листа, на основе техники переноса стиля на основе нейронных сетей. В главе описываются текущие подходы к деконволюции изображений, сложности, связанные с неоднородностью функции рассеяния точки в микроскопии светового листа, проблемы деконволюции, основанной на представлении изображений микроскопии светового листа свёрточными сетями. Подраздел “Современные методы переноса стиля” описывает соображения о необходимых качествах итогового метода, использованные методы и результат их применения. Описание сути метода представлено в подразделе “Рассмотрение метода произвольного переноса стиля с мультиадаптацией.”, где описывается разработанный диссертантом метод переноса стиля и результаты его применения для деконволюции изображений, получаемых с проточного цитометра.

**В четвертой главе** – “Анализ динамики флуоресцирующих объектов в кровотоке” рассматривается решение задачи подсчета движущихся и неподвижных объектов в потоке жидкости. В этой главе представлено решение подзадачи подсчёта количества объектов в том случае, если их изображения сливаются и становятся неразрешимы, приводятся оценки точности и применимости данного метода.

**В пятой главе** – “Движение магнитных объектов в капилляре в поле постоянного магнита” рассмотрена вычислительная модель движения магнитных объектов в капилляре при магнитной сепарации и анализ динамики движения и накопления частиц на стенках. С помощью модели построены и проанализированы траектории движения объектов в потоке под действием магнитного поля, а так же влияние на них основных параметров эксперимента в сравнении с экспериментом.

**В заключении** приведены основные результаты работы

По своему содержанию представленная диссертация является завершённой научно-квалификационной работой, в которой полученные результаты



изложены последовательно и логично. Выводы по результатам исследования характеризуются научной новизной и практической значимостью.

Автореферат диссертации Макаркина Михаила Андреевича полностью соответствует содержанию диссертационной работы и оформлен в соответствии с предъявляемыми требованиями.

#### **Степень достоверности и обоснованности полученных результатов.**

подтверждается применением научного оборудования, сертифицированного в соответствии с международными стандартами обеспечения единства измерений, и единообразием средств измерений. Результаты работы прошли оценку независимых рецензентов с последующим опубликованием в высокорейтинговых международных научных журналах (Biomedical Optics Express - импакт-фактор 3.732, Pharmaceutics - импакт-фактор 6.321, Micromachines - импакт-фактор 2.891, Molecules — 4.927). Результаты выполнения работы были использованы при реализации грантовых проектов ряда научных фондов и прошли внешнюю экспертизу в рамках отчётов по данным проектам. Результаты исследования также были представлены на международных конференциях.

#### **Новизна проведенных исследований и полученных результатов**

В рамках диссертационной работы впервые применяется вычислительный подход для удаления сильных искажений в системе микроскопии светового листа посредством преобразования от-изображения-к-изображению. Для решения этой задачи предложен метод, требующий малого количества данных для обучения - метод переноса произвольного стиля с мультиканальной самоадаптацией. Разработан метод подсчета объектов для новой системы *in vivo* цитометрии, основанной на микроскопии светового листа, в случае, если их изображения сливаются и становятся неразличимы. Метод основан на детектировании контуров и измерении изменения площади крупных агрегатов частиц по средней площади единичных объектов. Впервые была практически изучена динамика накопления магнитных микрокапсул на стенки капилляра при магнитной сепарации в зависимости от скорости потока, размера капсул и количества магнитных наночастиц в капсуле.

#### **Теоретическая и практическая значимость результатов работы**

Полученную в процессе исследования информацию возможно использовать при внедрении в медицинскую практику и доклинические исследования техник адресной доставки лекарств и диагностики на основе обнаружения редких объектов в кровотоке. Модели для изучения эффективности удержания носителей на стенке проточной ячейки позволяет прогнозировать

достижимые дозировки действующих веществ при использовании магнитных носителей при различных условиях доставки через кровеносную систему и различных параметрах носителей. Модели обработки данных *in vivo* проточной цитометрии позволяют проводить доклинические исследования поведения флуоресцентных объектов (и, в частности, носителей для адресной доставки лекарств на основе полиэлектролитных микрокапсул) непосредственно в кровотоке лабораторного животного, наблюдая их агрегационную устойчивость, накопление и другие интересующие исследователей взаимодействия.

### **Замечания по содержанию диссертации:**

1. Из основных результатов работы, приведенных в заключении диссертации, пункты 7 и 9 сформулированы недостаточно конкретно и требуют уточнения. Формулировки «плохо подходят» и «надёжный», применительно к захвату микрочастиц, недостаточно научны. Хотелось бы перейти от них к неким физическим критериям или количественным параметрам.
2. Третье защищаемое положение строится относительно технологических параметров получения микрокапсул (количества загрузок магнетита). Желательно перейти от формулировок, связанных с количеством загрузок наночастиц к физическим параметрам микрокапсулы – количеству наночастиц в капсуле, интегральному магнитному моменту или другим подобным характеристикам.
3. Из текста работы не до конца понятна как корректировалась геометрия светового листа (ортогональность плоскости освещения и оптической оси детектирующей части схемы с учётом преломления света в проточной ячейке при переходе света из воздуха в среды с большим показателем преломления).
4. В тексте не указаны разбросы размеров полиэлектролитных микрокапсул и количества в них флуоресцентного маркера. Также не до конца понятно из текста насколько различаются изображения объектов, расположенных на разных расстояниях от центральной плоскости светового листа. В то же время второе защищаемое положение строится исходя из того, что изображения отдельных объектов одинаковы.
5. На графиках количества частиц и интенсивности флуоресцентного сигнала наблюдается недостаточная корреляция этих графиков на отдельных участках. Также на графике флуоресценции отсутствует сигнал в области графика до начала магнитной сепарации, при этом там должно присутствовать ненулевое количество частиц.



6. Оформление списка публикаций содержит ряд стилизованных помарок. На некоторых рисунках отсутствуют масштабные отрезки, у ряда характеристик пропущены единицы измерения, работа содержит значительное количество стилизованных помарок и языковых неточностей.

### Заключение

Актуальность темы исследования, научная новизна полученных результатов, её теоретическая и практическая значимость позволяют сделать заключение о том, что диссертационная работа Макаркина Михаила Андреевича «Системы проточной цитометрии для поиска и выделения редких объектов: моделирование и анализ изображений и сигналов» отвечает всем требованиям «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года, а её автор присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. – Биофизика.

Отзыв обсуждался и единогласно утверждён на семинаре отделения нелинейной динамики и оптики ИПФ РАН (протокол № 15 от 26.10.2023 г.)

Заместитель заведующего отделом радиофизических методов в медицине Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики им. А.В. Гапонова-Грехова Российской академии наук»



Субочев Павел Владимирович

Сведения о составителе отзыва:

Субочев Павел Владимирович, кандидат физико-математических наук, заместитель заведующего отделом радиофизических методов в медицине Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики им. А.В. Гапонова-Грехова Российской академии наук»

Электронная почта: [pavel@ipfran.ru](mailto:pavel@ipfran.ru)

Телефон: 89043997916

Сведения о ведущей организации:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики им. А.В. Гапонова-Грехова Российской академии наук»

Адрес: г. Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46, 603950

Официальный сайт: [ipfran.ru](http://ipfran.ru)

Электронная почта: [dir@ipfran.ru](mailto:dir@ipfran.ru)

Телефон: +7 (831) 416-06-16