

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.2.392.06,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФГБОУ ВО «САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»,
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело _____

Решение диссертационного совета от 21.12.2023 № 92/23
о присуждении Макаркину Михаилу Андреевичу, гражданину РФ, ученой степени
кандидата физико-математических наук

Диссертация «Системы проточной цитометрии для поиска и выделения редких объектов: моделирование и анализ изображений и сигналов» по специальности 1.5.2. – Биофизика принята к защите 25 сентября 2023 года (протокол заседания 86/23) диссертационным советом 24.2.392.06 созданным на базе ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского» 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83. Совет 24.2.392.06 создан приказом Минобрнауки России №362/нк от 19.03.2020.

Соискатель Макаркин Михаил Андреевич, 30.09.1993 года рождения, в 2015 году окончил специалитет ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского» по специальности «010710 Физика открытых нелинейных систем» с присвоением квалификации «Физик, системный аналитик». В период подготовки диссертации соискатель обучался в очной аспирантуре ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского» по группе научных специальностей 1.3 Физические науки, специальность 1.5.2 — Биофизика и закончил её в 2022 году. В период подготовки диссертации работал младшим научным сотрудником лаборатории биомедицинской фотоакустики ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского».

Диссертация выполнена на кафедре инноватики института физики ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского».

Научный руководитель: Браташов Даниил Николаевич, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры инноватики института физики ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского».

Официальные оппоненты:

Дунаев Андрей Валерьевич, доктор технических наук, доцент, ведущий научный сотрудник научно-технологического центра биомедицинской фотоники, профессор кафедры приборостроения, метрологии и сертификации Института приборостроения, автоматизации и информационных технологий федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева» (ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева»), г. Орел, и

Ширшин Евгений Александрович, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник физического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» (ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова»), г. Москва;

дали положительные отзывы на диссертацию. На замечания официальных оппонентов были даны детальные ответы.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики им. А.В. Гапонова-Грехова Российской академии наук», в своем положительном отзыве, подписанном Субочевым Павлом Владимировичем, кандидатом физико-математических

наук, заместителем заведующего отдела радиофизических методов в медицине федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики им. А.В. Гапонова-Грехова Российской академии наук» и утверждённым заместителем директора учреждения по научной работе, доктором физико-математических наук Глявиным Михаилом Юрьевичем, рассмотрев диссертацию Макаркина Михаила Андреевича «Системы проточной цитометрии для поиска и выделения редких объектов: моделирование и анализ изображений и сигналов», отметила актуальность темы исследования, новизну полученных результатов, теоретическую и практическую значимость работы и указала на соответствие представленной диссертации требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается близким соответствием проводимых ими исследований теме диссертации, их высокой квалификацией в области технологий биомедицинской визуализации, непрерывном наблюдении биофизических процессов в живом организме, цифровой обработке изображений и сигналов применительно к задачам биофизики, что позволяет оценить научную и практическую значимость диссертационной работы, а также их широкой известностью и признанными достижениями среди специалистов в области биофотоники и биофизики живых объектов.

Соискатель имеет 6 работ по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, установленных Министерством образования и науки РФ для публикации результатов диссертационных исследований, а также входящих в перечень ВАК или индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus.

Наиболее значимые публикации автора по теме диссертации:

1. Roman A. Verkhovskii, Anastasiia A. Kozlova, Olga A. Sindeeva, Ilya O. Kozhevnikov, Ekaterina S. Prikhozhdenko, Oksana A. Mayorova, Oleg V. Grishin, **Mikhail A. Makarkin**, Alexey V. Ermakov, Arkady S. Abdurashitov, Valery V. Tuchin, and Daniil N. Bratashov Lightsheet-based flow cytometer for whole blood with the ability for the magnetic retrieval of objects from the blood flow // Biomedical Optics Express, 2021, Vol. 12, no. 1, Pp. 380—394. <https://doi.org/10.1364/BOE.413845>

В работе представлен разработанный научной группой, в состав которой входил диссертант, *in vivo* проточный цитометр. Описана конструкция создаваемого прибора, показано его применение для задач биофизики на примере исследований поведения посторонних объектов – носителей для адресной доставки лекарств в животном и извлечении магнитных носителей из кровотока под действием магнитного сепаратора. Диссертантом разработаны основные методы подсчета объектов в регистрируемой камерой прибора видеопотоке. Диссертант участвовал в проведении исследований и обработке данных для анализа количества детектируемых частиц в потоке крови.

2. Verkhovskii, R.; Ermakov, A.; Grishin, O.; **Makarkin, M.A.**; Kozhevnikov, I.; Makhortov, M.; Kozlova, A.; Salem, S.; Tuchin, V.; Bratashov, D. The Influence of Magnetic Composite Capsule Structure and Size on Their Trapping Efficiency in the Flow. *Molecules*, 2022, 27, P. 6073. <https://doi.org/10.3390/molecules27186073>

В работе оценивалась эффективность захвата носителей для адресной доставки лекарств — полиэлектролитных микрокапсул при их магнитной сепарации из потока в зависимости от их размера, загруженного в них количества магнетита и скорости потока жидкости. Исследовалось также магнитное улавливание клеток Raw 264.7, совместно инкубированных с магнитными полиэлектролитными микрокапсулами при их различной концентрации. На основе полученных данных выявлены основные особенности, способствующие магнитному захвату носителей для адресной доставки лекарств и живых клеток из потока. Результат данной работы позволяет проводить достаточно достоверную оценку количества накопленных носителей для адресной

доставки лекарств при их магнитном удержании на стенке сосуда (и оценить количество доставляемого таким способом вещества), показать возможность сепарации живых клеток из кровотока при интернализации ими магнитных объектов микронных размеров.

3. **Mikhail Makarkin**, Daniil Bratashov State-of-the-art approaches for image deconvolution problems, including modern deep learning architectures // *Micromachines*, 2021, 12, no. P. 1558. <https://doi.org/10.3390/mi12121558>

В работе представлен обзор современных методик деконволюции изображений, в том числе с применением преобразований изображений с помощью нейросетевых моделей глубокого обучения.

На **автореферат** диссертации поступило 4 положительных **отзыва**. Отзывы на работу предоставили:

1. Яценко Алексей Михайлович, д.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биофотоники Сколковского института науки и технологий; замечания: «1) Автореферат не лишен стилистических неточностей и некорректных формулировок, на некоторых рисунках оси значений плохо различимы; 2) Также, из автореферата не ясно, какие полиэлектролиты использовались для формирования оболочек микрокапсул и как варьировалось количество частиц магнетита в оболочках».

2. Кистенев Юрий Владимирович, д.ф.-м.н., заместитель проректора по научной и инновационной деятельности, заведующий лабораторией молекулярного имиджинга и машинного обучения ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»; замечания: «1) Методы, приведенные в работе, касаются отдельных аспектов *in vivo* проточной цитометрии и магнитной сепарации, в автореферате скорее отражается личный вклад диссертанта в исследовании большой группы и местами не хватает целостного взгляда на процессы, происходящие в исследуемых системах. 2) Также, работа содержит заметное число опечаток и неточностей с точки зрения русского языка».

3. Черномырдин Никита Викторович, к.ф.-м.н., старший научный сотрудник лаборатории широкополосной диэлектрической спектроскопии отдела субмиллиметровой спектроскопии ФГБНУ «Институт общей физики им. А. М. Прохорова Российской академии наук»; замечания: «На некоторых рисунках трудно читаются надписи и обозначения осей – следовало сделать более крупный шрифт. Также, в печатном виде трудно воспринимается цветовое кодирование изображений цитометрии от черного к белому. Стоит попробовать применить инверсию яркости, либо другую цветовую схему. Кроме того, текст автореферата содержит ряд опечаток».

4. Редьков Алексей Викторович, к.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории структурных и фазовых превращений в конденсированных средах ФГБНУ «Институт проблем машиноведения Российской академии наук»; замечания: «1) Диссертант в автореферате излишне фокусируется на тех частях большой коллективной работы, которые были его личным вкладом. Это, с одной стороны, заслуживает одобрения, с другой, делает понимание общей концепции работы исходя только из текста автореферата затруднительным. Работа описывает несколько отдельных частных аспектов работы *in vivo* цитометра и решение этих частных задач, при этом общая задача всего исследования несколько ускользает из поля зрения. 2) Работа не лишена стилистических помарок, она содержит некоторое количество опечаток, несогласованных предложений, некоторые предложения выглядят незаконченными.»

В отзывах отмечается актуальность темы исследования, новизна полученных результатов и их значимость для науки и практики. На все высказанные замечания были даны исчерпывающие ответы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

1. Теоретически доказана и верифицирована на практике возможность магнитной сепарации объектов (носителей для адресной доставки лекарств) из потока неразбавленной крови в проточной ячейке и кровотока лабораторного животного, проходящего через внешнюю проточную ячейку, при определенных сочетаниях параметров магнитных объектов и скорости потока жидкости.
2. Определены параметры, обеспечивающие наилучшее удержание магнитных объектов — носителей для адресной доставки лекарств и живых клеток, интернализовавших данные носители в потоке цельной крови, при различных скоростях потока жидкости, количестве магнитных наночастиц, размере объектов. Определены границы диапазонов параметров, при которых достигается эффективное удержание носителей для адресной доставки лекарств на стенке сосуда или проточной ячейки в потоке крови.
3. Установлено, что для обработки сильно искаженных изображений системы визуализации на основе микроскопии светового листа с учетом пространственно — неоднородной функции рассеяния точки возможно использовать системы глубокого обучения, обычно используемые для так называемого «переноса стиля» в случае, если изображения объектов демонстрируют однородный характер флуоресценции без сложной внутренней структуры.
4. Выявлено, что разработанная методика подсчета количества частиц по средней площади объекта в плоскости светового листа дает удовлетворительную для *in vivo* проточной цитометрии точность подсчёта объектов в 80% относительно контрольных измерений на коммерчески доступных приборах.

Теоретическая значимость исследования обоснована важностью полученных данных и разработанных моделей для разработки методов обработки данных в *in vivo* проточной цитометрии, прогнозирования достижимых дозировок действующих веществ при использовании магнитных носителей, различных условиях адресной доставки через кровеносную систему и различных параметрах носителей для адресной доставки.

Практическая значимость данной работы заключается в создании методик обработки данных для новых систем *in vivo* проточной цитометрии, позволяющих проводить исследования поведения носителей для адресной доставки лекарств в потоке неразбавленной крови и кровотоке лабораторного животного, а также извлекать носители и циркулирующие в крови патогены из кровотока. Важную роль для практического внедрения носителей для адресной доставки лекарств играет возможность оценки количества удерживаемых микрокапсул и достигаемой дозировки действующего вещества. Разработанные методики играют важную роль для дальнейшей возможности использовать техники адресной доставки лекарств на основе полиэлектролитных носителей через кровотоки и возможности проведения доклинических испытаний таких носителей.

Достоверность представляемых результатов подтверждается:

1. Использованием научного оборудования, сертифицированного в соответствии с международными стандартами обеспечения единства измерений.
2. Хорошей корреляцией результатов, известных из анализа литературных данных, и предыдущих результатов исследований рабочей группы, в которую входит диссертант, результатов моделирования и результатов, получаемых в ходе практических экспериментов
3. Независимой экспертной оценкой рецензентов с последующим опубликованием в высокорейтинговых международных научных изданиях (Biomedical Optics Express

- импакт-фактор 3.4, Pharmaceutics - импакт-фактор 5.4, Micromachines - импакт-фактор 3.4, Molecules — импакт-фактор 4.6, International Journal of Molecular Sciences — импакт-фактор 5.6). 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 диссертантом на международных научных конференциях.

Личный вклад соискателя.

В рамках выполнения диссертационного исследования автор принимал непосредственное участие во всех этапах проводимых исследований, от участия в постановке задач и их реализации до обсуждения результатов и подготовки публикаций и докладов по результатам исследований.

Автором была сформулирована и проверена концепция метода переноса произвольного стиля с мультисканальной самоадаптацией, построена численная модель движения магнитных микрокапсул в проточной ячейке под действием градиента магнитного поля, разработаны методы подсчёта объектов для разрабатываемой методики *in vivo* цитометрии, и проведен подсчёт количества и анализ динамики флуоресцентных объектов в кровотоке лабораторного животного.

В ходе защиты диссертации были заданы следующие вопросы и высказаны критические замечания:

1. В начале вашей презентации у вас использовалось понятие «кома». В данном конкретном случае скорее искажение будет иметь характер не комы, а сферической абберации. Можете сформулировать отличия искажения комы от сферической абберации?
2. Вы изобразили микрообъектив так, что по сравнению с ним очень толстая стенка кюветы, это какая-то диспропорция. Микрообъектив воспринимает свет, прошедший сквозь стекло. У вас плоскопараллельная кювета или цилиндрическая? Свет, проходя через плоскопараллельную стеклянную пластину при её косом наклоне испытывает абберации сферического характера. При этом микрообъектив не обладает той разрешающей способностью, которая в него заложена как в дифракционно-ограниченную систему. Если это наклонная плоскопараллельная пластинка, то она сильно искажает нормальную работу микрообъектива и сильно искажает изображение. Вы используете в своей работе стандартный микрообъектив от какого-то микроскопа, правильно?
3. Вы использовали так называемую деконволюцию. Какая была в вашем случае конволюция (или свёртка) некоторого ядра свёртки или матрицы искажений с непосредственно неискаженным изображением? Эти искажения обусловлены абберацией, вызванной в том числе использованием плоскопараллельной пластины. Как вы их учитывали, когда делали деконволюцию изображений?
4. Какие критерии оптимальности захвата ваших микрочастиц вы можете назвать? Почему они отсутствуют в защищаемом положении?
5. Давайте посмотрим второе защищаемое положение. Вы заявляете, что ваша система подсчёта даёт погрешность не более 20% от общего числа объектов. Как определялось общее число объектов? Есть общее число объектов (микрокапсул, микрочастиц), часть из них агрегирует и ваша система подсчёта позволяет определить их количество с точностью плюс-минус 20% по отношению к чему?
6. По третьему защищаемому положению. У вас используются дискретные скорости потока 5, 25, 50 мм/с и диаметры микрокапсул 1, 2.7, 5.5 мкм. А если будут промежуточные значения — 6 мкм, 24 мм/с? С диаметром понятно, а почему такие скорости — почему 5 и 25, а не от 5 до 25 мм/с? Это сформулировано как

наилучшая динамика — если мы даём скорость 5 или 25 мм/с, то всё прекрасно, а если 10 мм/с, то всё будет плохо?

7. Правильно ли я понял, что вы могли бы в разрабатываемом микроскопе светового листа всё сделать инструментально, если бы заказали у того же Olympus специализированные компоненты системы, которые устраняли бы эти aberrации, и не давали бы указанных апертурных явлений? И вы заменили инструментальную коррекцию с помощью ваших вычислений?
8. Какие перспективы ваше исследование несёт для управляемой адресной доставки лекарств? Чем получаемые вами результаты могут помочь этой проблеме? Сколько магнетита надо загружать в микрокапсулы — по объёму или по массе? Как соотносится объём магнетита с общим объёмом капсулы?
9. Когда все подготовительные операции закончены, вся эта математика уже работает и вы проводили эксперименты на животных, встречались ли вы с явлением того, что ваши магнитные капсулы взаимодействуют в кровотоке с клетками крови? Будут ли при этом образовываться тромбы, происходить другие процессы, связанные с биофизикой клеток крови? Это связано с тем, что вы работаете с неразбавленной кровью, с реальным кровотоком, у вас гематокрит порядка 40% у мышей, 40% эритроцитарной массы и 60% плазмы, плотность очень высокая, и туда вносятся капсулы — посторонние объекты в каком-то процентном соотношении, вы за ними следите как-то, как-то их детектируете. Как они себя ведут — идут одна за одной или где-то образуют комплексы с клетками, как всё это физически реализуется?

Соискатель Макаркин Михаил Андреевич ответил на заданные ему вопросы, и привел собственную аргументацию:

1. В нашей оптической схеме получается скорее сферическая aberrация, но с учётом того, что часть света от флуоресцентного объекта испытывает полное внутреннее отражение от стенок кюветы, часть лучей, формирующих искажение сферической aberrацией, не доходит до камеры и мы всё же скорее получаем искажения по типу комы. Если бы не было стенки кюветы, то мы получили бы сферическую aberrацию изображения.
2. Мы пытались показать, что стенка кюветы намного толще канала в проточной ячейке. То, что объектив кажется маленьким — это особенность схематичного изображения. Используется плоскопараллельная кювета. Насколько я знаю, используется стандартный микрообъектив от микроскопа.
3. Достоинство разработанного метода состоит в том, что знать заранее ядро свёртки нам не нужно. По обучающему набору данных нейросеть будет автоматически определять пространственные параметры искажений и на основе этих искажений настраивать их коррекцию. Вопрос скорее вычислительный — как правильно подобрать набор данных — пары из чистого неискаженного и искаженного изображений одних и тех же объектов и конечный функционал ошибки, на основе которого будет проводиться сравнение итогового восстановленного изображения с неискаженным и искаженным на входе нейросети. Если правильно подобрать функцию ошибки и набор данных, то система будет решать эту задачу автоматически.
4. Мы исследуем количество удерживаемых частиц от скорости потока, количества загрузок магнетита и размера капсул. Более физически правильным было бы указывать точное количество удержанных объектов при каждом указанном сочетании параметров. Однако, данная часть исследования концентрировалась именно на поиске значений параметров, поэтому непосредственно в положении оно не указывается.

5. Точность алгоритма подсчета частиц проводилась следующим способом: брался заранее приготовленный образец с известным числом объектов, он измерялся с использованием коммерческого проточного цитометра фирмы AMNIS (который в силу наличия системы гидродинамической фокусировки очень точно считает число объектов), и разрабатываемого проточного цитометра. Расхождение посчитанного числа всех объектов в образце и считается погрешностью. В результате, даже если наблюдается агрегация объектов, даже с такой приблизительной точностью подсчёта, мы ошибаемся не более, чем на 20% от известного исходного числа объектов.
6. Имеются в виду диапазоны параметров, но так как непосредственно в эксперименте был проверен предлагаемый дискретный набор, то было решено именно так вынести их в защищаемое положение. Размер больше 5.5 мкм не рассматривался, поскольку предыдущие исследования наших коллег показали, что такой размер будет приводить к закупорке мелких капилляров при накоплении объектов в лёгких, в печени, возможно в почках. По скоростям здесь скорее вопрос к формулировке. Здесь скорее корректно будет указать диапазон от 5 до 25 мм/с, но непосредственно измерения проводили только для скоростей 5 и 25 мм/с.
7. Да, правильно. Мой коллега конечно не покупал отдельных компонент, однако если в оптическую схему встроить дополнительную призму, то наблюдаемые аберрации существенно ослабляются, хотя и не исчезают до конца. Для полного исправления искажений необходимы специализированные иммерсионные объективы, погружение проточной ячейки в иммерсионную жидкость, что значительно повысит цену установки.
8. В основном с помощью приведенных здесь результатов можно посчитать форму и размер агрегата при известной равновесной скорости потока (когда отсутствует и смывание объектов, и их дальнейшее накопление) с учетом того, что размеры капсул и приблизительное количество активного вещества в них нам известны, в перспективе это позволит нам рассчитать общую массу доставленного в область действия магнита активного вещества. По измерениям наших коллег, представленным на слайде, приведено количество магнетита в одной капсуле — для одной, двух и шести загрузок магнетита — соответственно 4.4, 8.8 и 15.8 миллимоль. По соотношению объема загруженного магнетита и общего объема микрокапсулы к сожалению не могу сказать.
9. В потоке цельной крови мы наблюдали, что агрегаты могут образовываться при магнитном удержании капсул у стенки сосуда. В то же время в потоке крови какие-то процессы, провоцирующие агрегацию, формирование агрегатов, сложно было найти. По крайней мере мы не видели образование каких-то дополнительных тромбов и иных негативных для кровотока эффектов. В этом и была цель работы — в потоке крови и полиэлектролитных микрокапсулах показать, что они не будут наблюдаться.

В диссертации отсутствует заимствованный материал без ссылки на автора или источник заимствования, результаты научных работ, выполненных диссертантом в соавторстве, без ссылок на работы соавторов.

На заседании 21 декабря 2023 года диссертационный совет принял решение: за достижения в разработке методов восстановления изображений в проточной цитометрии на основе метода светового листа, подсчёта редких объектов и анализа поведения в потоке жидкости в области градиента магнитного поля нанокompозитных микрокапсул с частицами магнетита присудить Макаркину Михаилу Андреевичу ученую степень кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. – Биофизика

При проведении тайного электронного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек, включая 4 дистанционных участников, из них 8 докторов наук по специальности 1.5.2. – Биофизика, участвовавших в заседании, из 21 человек, входящих в состав совета проголосовали:

За - 15, против - 1, воздержались – 0.

Отзыв составил

Член диссертационного совета

д.ф.-м.н., доцент

Караев Анатолий Сергеевич

Председатель диссертационного совета

д.ф.-м.н., проф., чл.-корр. РАН

Тунин Валерий Викторович

Ученый секретарь диссертационного совета

д.ф.-м.н., доцент

Генина Элина Алексеевна

21.12.2023 г.

