

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Коноховой Анастасии Игоревны «Характеризация полидисперсных биологических систем, содержащих разнородные популяции клеток и частиц, с помощью сканирующей проточной цитометрии», представленной на соискание на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.02. – биофизика.

Диссертационная работа Коноховой А.И. посвящена применению сканирующей проточной цитометрии (СПЦ) для анализа сложных дисперсных систем биологического происхождения, содержащих полидисперсные субпопуляции разнородных клеток и частиц. В диссертации развиваются методы определения морфологических характеристик одиночных частиц на основании решения обратной задачи светорассеяния, а также разрабатываются алгоритмы дифференциации разнородных субпопуляций частиц, отличающихся формой и/или происхождением, в составе сложных дисперсных систем с целью их идентификации или последующего анализа.

**Научно-практическая значимость** разрабатываемых методов и подходов демонстрируется тремя прикладными задачами: а) исследованием жировых частиц в молоке, б) характеристикой шаровидных и палочковидных бактерий в смешанных культурах клеток и в) исследованием субмикронных частиц в плазме крови. При этом для решения поставленных задач в работе рассматривается ряд важных проблем сканирующей проточной цитометрии. В частности, рассмотрен необходимый объем информации о характеристиках рассеянного света, выбраны микрофизические модели для светорассеивающих частиц, выбраны оптимальные методы расчета и алгоритмы решения обратных задач. Также в диссертации решается ряд вопросов, связанных с обработкой и анализом получаемых данных. Поэтому **важность и актуальность** диссертации Коноховой А.И. не вызывает сомнений.

В диссертации представлен полный и исчерпывающий обзор по имеющимся в мире работам в этих направлениях исследований, что составляет содержание первой главы диссертации. В начале второй главы диссертации достаточно подробно описана технология СПЦ. Затем в главе предлагается метод оценки угловых диапазонов, в которых должны регистрироваться интегральные сигналы рассеяния вперед (FSC) и вбок (SSC). На основании полученных оценок в главе определяются предельные границы размеров и показателей преломления частиц, детектируемых на СПЦ. Отметим, что предлагаемые в данной главе способы оценки параметров сигналов рассеяния и чувствительности прибора применимы не только для СПЦ, но и для любых проточных цитометров.

Третья глава диссертации содержит описание используемых в работе методов решения прямых и обратных задач светорассеяния. Важной научной проблемой, рассматриваемой в рамках данной главы, является исследование единственности и точности задачи восстановления размера и показателя преломления субмикронных частиц по интегральным сигналам светорассеяния, измеряемым в фиксированных телесных углах. В результате, в диссертации установлен диапазон параметров частиц, для которых существует однозначное решение обратной задачи светорассеяния. Несмотря на то, что полученные выводы основаны на измерениях сигналов FSC и SSC, осуществляемых с помощью СПЦ, они могут быть распространены на измерения посредством других приборов, регистрирующих светорассеяние от одиночных частиц в двух заданных направлениях (с поправкой на особенности их конкретной оптической конфигурации).

Кроме того, для преодоления проблем с устойчивостью и точностью решения обратной задачи, вызванных влиянием инструментальных искажений на измеряемые индикатрисы светорассеяния, в работе предлагается несколько подходов для повышения достоверности и надежности результатов морфологической характеристики частиц.

Эффективность этих подходов проверяется экспериментально для частиц разных форм и в широком диапазоне размеров, что позволяет говорить об их применимости не только к решению задач, поставленных в данной работе, но и при проведении других исследований с помощью СПЦ. Также большое внимание в главе уделяется рассмотрению различных подходов и критериев для дифференциации разнородных популяций клеток и частиц. Эти исследования проведены как с использованием различных оптических моделей частиц при решении обратной задачи светорассеяния, так и на основании одних только экспериментальных данных.

Четвертая, пятая и шестая главы диссертации посвящены экспериментальным исследованиям и практическому применению предлагаемых в третьей главе диссертации методов и подходов для анализа трех конкретных биологических дисперсных систем: (1) жировых частицы в молоке, (2) чистых и смешанных культур шаровидных и палочковидных бактерий, (3) субпопуляций микрочастиц в плазме крови. Показано, что высокая точность, достигнутая при решении обратной задачи светорассеяния, позволяет не только определять размеры одиночных частиц с точностью до нескольких десятков нанометров, но также измерять показатель преломления сферических и сфероидальных клеток и частиц с точностью до 0.02.

Полученные в работе оценки имеют ценность для оптических методов диагностики рассеивающих сред, в которых информация о показателе преломления частиц закладывается а priori. Вместе с тем, отметим, что даже такая высокая точность характеристики морфологии одиночных частиц, показанная в диссертации, не всегда позволяет однозначно соотносить измеряемые объекты к той или иной субпопуляции частиц, если их размеры сопоставимы с длиной волны рассеиваемого излучения или если отличия в их морфологии составляют много меньше длины волны. Этот факт проиллюстрирован в диссертации на примере дифференциации субпопуляций хиломикрон и микрочастиц в плазме крови и на примере разделения палочковидных клеток и диплококков в смешанных культурах бактерий. В дальнейшем преодоление этой проблемы может быть достигнуто за счет уменьшения длины волны лазера или за счет уширения углового диапазона измерения индикатрис рассеяния.

**Научная новизна** работы заключается в том, что впервые технология СПЦ была применена для характеристики сложных полидисперсных систем, содержащих разнородные популяции клеток и частиц, включая биологические частицы, размер которых сравним с длиной волны. Наиболее важные научные результаты работы связаны с:

- (1) исследованием точности и однозначности решения обратной задачи светорассеяния в зависимости от объема измеряемой оптической информации;
- (2) разработкой методов повышения точности измерения морфологических характеристик одиночных частиц по светорассеянию, измеряемому на СПЦ, и достижением точности определения размера частиц до десятков нанометров, а показателя преломления до 0.02;
- (3) разработкой различных подходов для дифференциации субпопуляций разнородных частиц в составе сложных биологических дисперсных систем и их успешным применением для исследования жировых частиц молока, смешанных культур бактерий и идентификации субпопуляций микрочастиц в плазме крови.

В целом, можно утверждать, что результаты, представленные в диссертации, в полной мере отражают научную и прикладную значимость развиваемой в работе технологии СПЦ для комплексного анализа биологических полидисперсных систем при проведении различных медико-биологических, биофизических, биотехнологических и клинико-диагностических исследований, что убедительно доказывает как **практическую значимость** диссертации, так и всего направления исследования.

В диссертации представлен большой объем выполненных диссертантом как теоретических, так и экспериментальных исследований. Проведенные исследования являются новыми и их **достоверность** не вызывает сомнений. Диссертацию Коноховой А.И. можно рассматривать как вполне законченное исследование.

По результатам диссертации имеется 8 публикаций в зарубежных журналах с высоким импакт-фактором. Публикации с достаточной полнотой отражают содержание работы и позволяют оценить ее новизну, практическую и научную значимость. Научная новизна также подтверждается участием в международных и российских конференциях и семинарах.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Отмечу некоторые технические замечания, возникшие при чтении диссертации, которые ни в коей мере не умаляют ее высокую оценку.

1. На мой взгляд, в диссертации недостаточно вышукло отражена связь результатов, полученных диссертантом, с результатами предшествующих работ, выполненных в лаборатории цитометрии и кинетики ИХКиГ СО РАН.

2. В обширном списке литературы, составляющим 289 ссылок, в некоторых ссылках указан только первый автор, что усложняет понимание некоторых разделов диссертации.

Несмотря на приведенные выше замечания, считаю, что диссертационная работа отвечает всем требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Конохова Анастасия Игоревна, несомненно заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

#### **Сведения об официальном оппоненте:**

Боровой Анатолий Георгиевич,

доктор физико-математических наук, профессор.

Главный научный сотрудник, и.о. зав. группы теории рассеяния оптических волн Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института оптики атмосферы им. В.Е. Зуева Сибирского отделения Российской академии наук (ИОА СО РАН)

634055, Россия, г. Томск, площадь Академика Зуева, 1,

Телефон: +7 (3822) 492-864

Электронная почта: [bogovoi@iao.ru](mailto:bogovoi@iao.ru)

Докторская диссертация защищена по специальности 01.04.05, оптика.

Профессор-доктор



Боровой А.Г.

28 ноября 2017 г.

Подпись главного научного сотрудника, и.о. зав. группы теории рассеяния оптических волн, д.ф.-м.н., профессора Борового А.Г. заверяю

Ученый секретарь ИОА СО РАН, к.ф.-м.н.



Тихомирова О.В.