

На правах рукописи

НЕКРАСОВ ВЯЧЕСЛАВ МИХАЙЛОВИЧ

**ИССЛЕДОВАНИЕ БИСПЕЦИФИЧЕСКОЙ АГРЕГАЦИИ
МИКРО- И НАНОЧАСТИЦ С ПОМОЩЬЮ СВЕТОРАССЕЯНИЯ.**

01.04.17 – «химическая физика, горение и взрыв,
физика экстремальных состояний вещества»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Новосибирск – 2013

Работа выполнена
в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институте химической кинетики и горения
Сибирского отделения Российской академии наук

Научный руководитель: кандидат физико-математических наук,
Чернышев Андрей Витальевич,
ИХКГ СО РАН

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
Докторов Александр Борисович,
ИХКГ СО РАН

кандидат физико-математических наук,
Ломзов Александр Анатольевич,
ИХБФМ СО РАН

Ведущая организация: доктор физико-математических наук,
Лукзен Никита Николаевич, Междуна-
родный Томографический Центр СО
РАН

Защита диссертации состоится «26» июня 2013 г. в 15⁰⁰ часов на засе-
дании диссертационного совета Д 003.014.01 в Федеральном государст-
венном бюджетном учреждении науки Институте химической кинетики и
горения Сибирского отделения Российской академии наук по адресу:
630090, Новосибирск 90, ул. Институтская 3, ИХКГ СО РАН.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИХКГ СО РАН

Автореферат разослан «23» мая 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.х.н.



А.А. Онищук

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время существует актуальная проблема учета гетерогенности биологических систем, возникающая при описании динамики биологических систем. В настоящее время такие системы, как правило, исследуются в приближении средних параметров, когда все элементы системы считаются одинаковыми по своим свойствам. Это приближение не всегда обоснованно, и иногда может приводить к неправильным эффектам. Поэтому вопрос корректного учета существующих неоднородностей является актуальным при попытке понять, насколько это может быть важно.

Ключевую роль в этих исследованиях играет выбор удобной модельной системы. Потенциально функция распределения может влиять на скорость протекания реакции в биологических системах.

Интерес к изучению таких систем дополнительно стимулирован практическими интересами некоторых вопросов иммуноагглютинации, имеющими приложения в медицинской сфере.

Основные цели работы:

1. Модифицировать сканирующий проточный цитометр для измерения поляризационного сигнала индикатриссы от одиночных частиц.
2. Провести теоретический анализ возможного влияния функции распределения частиц по количеству поверхностных рецепторов на скорость агрегации частиц.
3. Разработать подходы к определению константы димеризации агрегации частиц в том случае, когда измерение абсолютной концентрации частиц в процессе реакции затруднено.

Научная новизна работы. Впервые разработана модифицированная схема сканирующего цитометра, позволяющая измерять одновременно два сигнала индикатриссы, являющихся различными комбинациями элементов матрицы Мюллера. Проведенные эксперименты на латексных микросферах и хламидомонадах доказали преимущества данной схемы перед стандартной в области дискриминации различных субпопуляций частиц в одной пробе.

Разработанная математическая модель, учитывающая конечную функцию распределения частиц по количеству рецепторов, позволяет корректно учитывать гетерогенность агрегирующих частиц.

Предложен новый функционал от концентраций частиц, позволяющий определять константу скорости димеризации в реакции агрегации в том случае, когда невозможно измерение абсолютных концентраций частиц в ходе реакции, а также при существовании “мертвого” времени измерений.

Практическая значимость работы заключается в разработке нового инструментального решения для измерения оптических сигналов от индивидуальных частиц, которое улучшает возможности для решения обратной задачи определения параметров измеряемых частиц. Разработанная математическая модель агрегации неоднородных по количеству поверхностных рецепторов позволяет корректно учитывать существующую гетерогенность частиц. Предложенный функционал от концентраций частиц позволяет определять константу димеризации даже без знания абсолютных концентраций частиц.

Полученные результаты имеют значения для дальнейшей работы по корректному определению параметров биоспецифической агрегации.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Улучшенная схема поляризационного сканирующего цитометра повышает информативность оптических измерений одиночных частиц. Уста-

новлено, что средние размеры и показатель преломления хламидомонад составляют (8.9 ± 1.6) мкм и (1.439 ± 0.021) , соответственно.

2. Разработанная математическая модель агрегации в гетерогенной системе позволяет учитывать распределение частиц по параметрам для определения константы скорости агрегации мономеров, существенно различающихся по количеству поверхностных сайтов связывания.

3. Для уравнения Смолуховского предложен функционал от вектора концентраций агрегатов для определения константы скорости димеризации. Показано, что для широкого класса ядер уравнения Смолуховского значение этого функционала линейно зависит от времени на начальной стадии.

Личный вклад соискателя. Все приведенные в работе результаты получены либо самим автором, либо при его непосредственном участии.

Апробация работы. Изложенные в диссертационной работе результаты докладывались и обсуждались на следующих международных и всероссийских конференциях: XII Всероссийский семинар “Нейроинформатика и ее приложения” (Красноярск, 2004); Proceedings of the forth international conference on bioinformatics of genome regulation and srtructure (Novosibirsk, 2004); Chemical and Biological problems of Proteomics, International Conference (Новосибирск, 2004); Десятая Всероссийская Научная Конференция Студентов-Физиков и Молодых Ученых (Москва, 2004); III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии (Москва, 2010); Материалы молодежной конкурс-конференции “Фотоника и оптические технологии” (Новосибирск, 2011).

Публикации. Материалы диссертации представлены в 4 статьях, опубликованных в рецензируемых научных журналах из списка ВАК, и 6 тезисах докладов на всероссийских и международных конференциях.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, трех глав, выводов, списка литературы. Работа изложена на 127 страницах,

содержит 27 рисунков, 4 таблиц. Список цитируемой литературы включает 117 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении изложена актуальность темы диссертации, сформулированы цели и задачи работы.

Первая глава представляет собой литературный обзор. В первой части главы описаны наиболее распространенные оптические методы исследования реакции агрегации, которые условно делятся на две основные группы – исследования на ансамбле и на одиночных частицах. Обсуждаются преимущества и недостатки каждого из подходов с точки зрения применимости в практических приложениях. Во второй части описывается свойства уравнения Смолуховского, являющегося базовым для понимания процессов агрегации. Рассмотрены случаи точных, аналитических решений уравнения Смолуховского для различных физических приложений. Приведены существующие способы приближенных и асимптотических методов решения в некоторых частных случаях. В частности, описывается асимптотическое поведение на начальных стадиях реакции агглютинации, и на поздних стадиях, с точки зрения теории динамического скалирования. Обсуждается вопрос существования гель-эффекта для различных ядер уравнения Смолуховского. Отдельно рассмотрен вопрос влияния разнообразных физических факторов на скорость агрегации для биоспецифических реакций. Особое внимание уделено практическим приложениям теории агрегации, в частности определению концентрации антител в растворе в медицинских приложениях.

Глава заканчивается описанием проблем, возникающих при исследовании реакции агглютинации в биомедицинских приложениях и формулировкой общих целей диссертации.

Первую главу завершает **постановка задачи**, где указаны конкретные задачи, сформулированные исходя из общей цели.

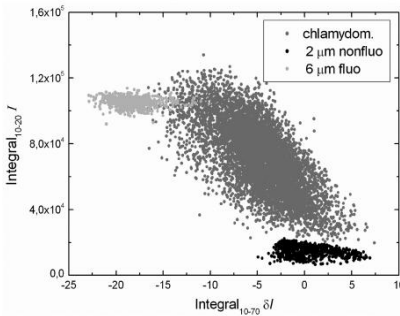


Рис. 1 Экспериментальные сигналы от хламидомонад и микросфер размерами 2 и 6 мкм.

нациями матрицы Мюллера. Данная модификация существенно улучшила возможности сканирующего цитометра в области идентификации и характеристики измеряемых частиц, что было продемонстрировано на двух экспериментальных системах – модельных полистирольных микросферах и зеленых водорослях (*Chlamydomonas reinhardtii*). На рис.1 приведен результат измерений в терминах интегральных оптических сигналов от двух индикатрисс, от пробы частиц, содержащей хламидомонады и два типа латексных микросфер, размерами 2 и 6 мкм. На рис.2

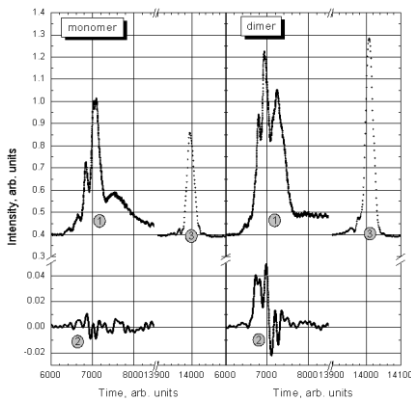


Рис. 2 Два различных поляризационных оптических сигнала от мономеров и димеров микросфер с размерами 2 мкм

Вторая глава посвящена описанию схемы сканирующего проточного цитометра. Предложен вариант модификации, названный поляризационным сканирующим цитометром, позволяющий измерять одновременно две сигнала индикатриссы, являющимися различными комбинациями матрицы Мюллера. Данная модификация существенно улучшила возможности сканирующего цитометра в области идентификации и характеристики измеряемых частиц, что было продемонстрировано на двух экспериментальных системах – модельных полистирольных микросферах и зеленых водорослях (*Chlamydomonas reinhardtii*). На рис.1 приведен результат измерений в терминах интегральных оптических сигналов от двух индикатрисс, от пробы частиц, содержащей хламидомонады и два типа латексных микросфер, размерами 2 и 6 мкм. На рис.2 приведены два поляризационных

сигнала индикатриссы для мономеров и димеров латексных частиц, имеющих размеры 2 мкм.

Третья глава посвященная результатам работы в исследовании динамики агрегации частиц, и состоит из двух разделов. Первый раздел главы посвящен развитию кинетической теории агрегации и содержит результаты, касающиеся теоретической части работы. В первом подразделе выводится следующая формула для зависимости константы реакции между двумя одинаковыми по размеру сферическими частицами для модели белых сфер с черными пятнами в кинематическом пределе.

$$k(x_1, y_1, x_2, y_2) = k_{ag}(x_1 y_2 + x_2 y_1) \quad (1)$$

где $x_{1,2}$ и $y_{1,2}$ – количество свободных и занятых лигандами рецепторов на поверхности частиц соответственно, k_{ag} – кинетическая константа.

На основании данной формулы было показано, что кинетика образования димеров C_2 в первоначальные моменты времени не зависят от явного вида функции распределения агрегирующих частиц по количеству рецепторов на поверхности, а зависит только от средних параметров, таких как концентрация рецепторов в объеме I_0 и концентрация антител в растворе A_0

$$\frac{dC_2}{dt} = k_{ag}(A - A_0)(I_0 - A_0 + A) \quad (2)$$

В следующем подразделе рассмотрен вопрос о влиянии конечной ширины функции распределения частиц по количеству рецепторов на поверхности на дальнейшую динамику агрегации. Показано, что в дальнейшем конечная ширина функции замедляет скорость агрегации по сравнению с тем случаем, когда все частицы одинаковые. Для частного случая,

когда функцию распределения можно представить в виде суммы двух дельта-функций, получено аналитическое решение.

В следующем подразделе доказано, что если функцию распределения частиц по посадочным местам можно представить в виде гауссового распределения, то для начальных стадий агрегации функция распределения мономеров по количеству рецепторов, эволюционирует тоже в гауссиан с неизменной дисперсией, но изменяющейся амплитудой и средним количеством рецепторов. Для более сложного случая, когда первоначальное распределение представляется в виде суммы гауссианов, получены уравнения, описывающие поведение функции распределения по количеству рецепторов в виде системы обыкновенных дифференциальных уравнений.

Далее, в следующем подразделе, рассмотрен вопрос определения константы димеризации агрегирующих частиц. Показано, что если ввести

следующий функционал от концентрации агрегатов $Y = \frac{\sum_{i=2}^{\infty} C_i}{C_1}$, который

есть доля суммы всех агрегатов относительно мономеров, то можно доказать следующую зависимость этого функционала от времени.

$$Y(t) = \frac{1}{2} C_1(0) k_{11} t + o(t^3) \quad (3)$$

где $C_1(0)$ – первоначальная концентрация мономеров в растворе, k_{11} – константа димеризации. Данный функционал позволяет определять константу димеризации частиц, измеряя только относительную долю агрегатов в растворе в процессе реакции. Существует также несколько других стандартных способов определения константы димеризации k_{11}

$$N = \sqrt{\frac{C_1(0)}{C_1(t)}} - 1 \approx \frac{1}{2} k_{11} C_1(0) t + o(t^2)$$

$$S = \frac{C_1(0)}{\sum_{i=1}^{\infty} C_i(t)} - 1 \approx \frac{1}{2} k_{11} C_1(0) t + o(t^2)$$
(4)

Однако они требуют измерения абсолютной концентрации частиц в процессе реакции, что далеко не всегда возможно с точки зрения экспериментальных возможностей.

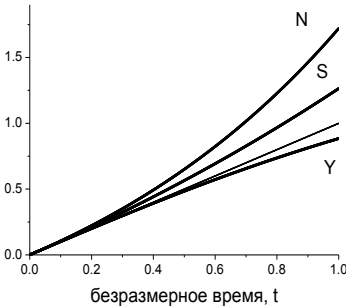


Рис. 3 Результат численного моделирования Y, S, N для уравнения Смолуховского с ядром $k(i,j)=i+j$

Причем в отличие от других существующих методов линейаризации зависимости измеряемых параметров предложенный функционал сохраняют линейность вплоть до малостей третьего порядка по времени, независимо от конкретного вида ядра в уравнении Смолуховского.

На рис.3 приведен пример моделирования функционалов Y, S, N для ядра в виде $k(i,j)=i+j$, а также их отличие от прямой линии, которая является точным решением для ядра в виде константы. Можно отметить, что функционал Y ведет себя практически линейным образом на широком интервале безразмерных времен. Например, для безразмерного времени $t=1$ функционал $Y=0.9$ и отличается от прямой на 10%, причем концентрация мономеров для $t=1$ падает более чем в 3 раза. Таким образом, данный параметр позволяет экспериментально определять константу k_{11} просто линей-

ной аппроксимацией относительной доли агрегатов, даже без измерения абсолютных концентраций и при наличии значительного мертвого времени экспериментальной установки.

В том случае, когда в начальный момент времени в растворе есть не только мономеры, но и агрегаты, то формула (3) требует модификации

$$Y(t) = \left(\frac{M_0(0)}{C_1(0)} - 1 \right) + \frac{tk(1,1)C_1(0)}{2} \left[\frac{M_0(0)}{C_1(0)} \right]^2 \quad (5)$$

где $M_0(0)$ – первоначальная концентрация всех частиц. В этом случае определение константы димеризации также возможно по начальному на-

клону функционала Y , если учесть поправочный фактор $\left[\frac{M_0(0)}{C_1(0)} \right]^2$.

Следующий подраздел посвящен рассмотрению реакции агрегации латексных полимерных микросфер в том случае, когда необходимо учитывать дискретную природу рецепторов на поверхности частиц. Необходимость учитывать дискретность рецепторов возникает в том случае, когда характерное число занятых рецепторов на поверхности частицы сравнимо с единицей. В этом случае уже важно учитывать стохастическую природу химических реакций, которая приводит к тому, что возникает распределение частиц по количеству рецепторов на поверхности, даже в том случае, если все частицы одинаковые. При малых концентрациях антител в растворе возможно возникновение ситуации, когда на поверхности агрегатов частиц отсутствуют связанные антитела, несмотря на ненулевую концентрацию антител в растворе. Это приводит к тому, что кинетика реакции агрегации в случае малых концентрациях антител происходит по другим закономерностям, нежели в том случае, когда не учитывается в явном виде дискретность рецепторов на поверхности частиц. В силу существенной гетерогенности образующихся агрегатов по количеству свободных и заня-

тых рецепторов на своей поверхности становится затруднительным расчет кинетики агрегации с помощью классических уравнений Смолуховского, оперирующих такими средними параметрами, как доля занятых и свободных рецепторов. В данном случае необходимо детальный учет всех участвующих в агрегации частиц, каждая из которых обладает индивидуальными параметрами. Для решения этой задачи использовался стандартный алгоритм, разработанный Gillspie, моделирующий химические реакции из первых принципов. Предложенная модель константы реакции между агрегатами различных размеров и с различным числом поверхностных рецепторов позволило на основе данного алгоритма провести численное моделирование реакции агрегации существенно неоднородной популяции частиц.

Последний подраздел посвящен проблеме межпопуляционной динамики микроорганизмов в проточных реакторах типа хемостат при учете гетерогенности микроорганизмов по скорости роста. На вход такого реактора подаются метаболиты постоянной концентрации с постоянной объемной скоростью, а на выходе выводится такой же объемный поток, через который выводится метаболиты и микроорганизмы, живущие в хемостате. Как хорошо известно, в таких реакторах в стационарном состоянии концентрация метаболитов и микроорганизмов не зависит от концентрации в хемостате метаболитов и микроорганизмов в начальный момент времени, что делает такие системы привлекательными для изучения. При отсутствии среди микроорганизмов взаимодействия типа “хищник-жертва” ранее было показано, что верна следующая формула:

$$\sum_{i=1}^m \frac{\partial A_i}{\partial A_i^0} = m - n \quad (6)$$

где A_i и A_i^0 - стационарные концентрации метаболитов в хемостате и на входе в хемостат, n и m - число различных типов микроорганизмов и ме-

таболитов, существующих в хемостате. Вывод данной формулы была основан на уравнениях биокинетики, описывающих рост микроорганизмов в терминах средних концентраций. В данном подразделе решен вопрос, что изменится в том случае, если более детально учитывать существующее распределение микроорганизмов по возрасту, который может влиять на скорость роста. Оказывается, даже в этой более детальной модели скорости роста микроорганизмов, эффект квантования плотностнозависимых факторов роста сохраняется в неизменном виде (6). Также был рассмотрен вопрос влияния еще одного типа гетерогенности микроорганизмов, связанный с неоднородностью популяций микроорганизмов по удельной скорости роста. В этом случае было показано, что для стационарного состояния соотношение (6) также остается верным.

В следующем разделе описываются экспериментальные результаты, посвященные исследованию биоспецифической агрегации. В первом подразделе сделан анализ точности определения параметров константы димеризации для реакции агрегации, в том случае, если пользоваться предложенным функционалом Y , являющимся относительной долей агрегатов в растворе. Показано, что если в эксперименте измерять N частиц, то среднеквадратическое отклонение параметра Y из-за случайных флуктуаций, связанных с конечным числом измеренных агрегатов за одно измерение можно определить, как

$$\sigma = (1 + Y) \sqrt{\frac{Y}{N}} \quad (7)$$

Эта формула позволяет заранее планировать условия проведения эксперимента для достижения требуемой точности определения параметров агрегации.

Следующий подраздел экспериментального раздела посвящен определению константы димеризации для модельной системы из латексных мик-

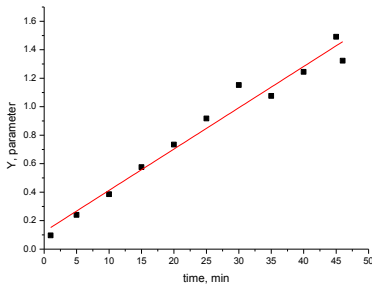


Рис. 4 Динамика функционала Y для полимерных микросфер, покрытых биотином.

$$k_{11} = (0.061 \pm 0.003) * 10^{-15} \frac{CM^3}{c}$$

регации в раствор, содержащий микросферами с биотином, добавлялся стрептавидин. Далее, в определенные моменты времени из реагирующей смеси извлекался малый объем, который разбавлялся в 100 раз, для замедления реакции, и в дальнейшем измерялся на сканирующем проточном цитометре. Благодаря тому, что сканирующий проточный цитометр позволяет легко отделять мономеры от агрегатов микросфер, возможно опреде-

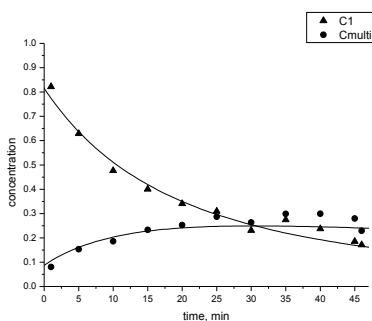


Рис. 5 Результат агрегации для предыдущего эксперимента, обработанного по стандартной методике

$$k_{11} = (0.062 \pm 0.008) * 10^{-15} \frac{CM^3}{c}$$

росфер с помощью предложенного функционала Y . В качестве системы антителорецептор был использован классическая пара биотин-стрептавидин. На поверхность двухмикронных микросфер был нанесен биотин, а в качестве антител в раствор добавлялся стрептавидин. В эксперименте по агре-

гации функционала Y . Таким образом, последовательно измеряя Y в несколько моментов времени, возможно определять константу димеризации, зная первоначальную абсолютную концентрацию мономеров микросфер.

На рис.4 показан результат экспериментов по агре-

гации на сканирующем проточном цитометре. На рис.5 показаны результаты предыдущего эксперимента, обчисленного по стандартной методике, использующей динамику абсолютных концентраций мономеров. Видно, что результаты совпадают с точностью до ошибок. Еще раз подчеркнем, что предлагаемый подход не требует от прибора измерять абсолютной концентрации агрегирующих частиц, и также позволяет измерять реакцию на поздних стадиях.

В следующем подразделе приведены результаты по агрегации тромбоцитов человека. Эксперименты проводились по такой же схеме, как и эксперименты с латексными частица. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов выступал АДФ. В силу того, что решение обратной задачи для тромбоцитов сопряжено со значительными сложностями, в настоящий момент не существует надежных алгоритмов отделения мономеров тромбоцитов от их агрегатов, в связи с чем прямое использование функционала Y для определения константы димеризации невозможно. Однако, если сделать предположение, что экспериментально наблюдаемая функция распределения частиц по интегралу светорассеяния состоит из двух фракций, относящихся к мономерам и агрегатам, причем каждая из фракций описывается

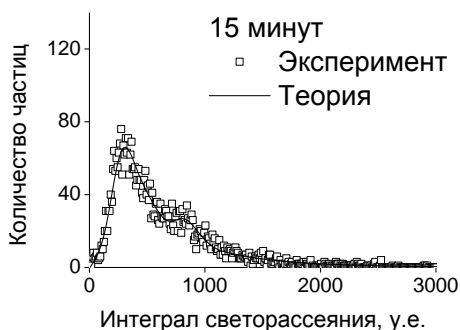


Рис. 6 Гистограмма тромбоцитов от интеграла светорассеяния

логнормальным распределением, то возможно определять относительную долю агрегатов для каждого измерения, если считать, что функция распределения мономеров тромбоцитов неизменна со временем.

На рис.6 приведен ре-

зультат обработки данных через 15 минут после начала агрегации для одного из доноров. На следующем рисунке приведены экспериментальные результаты по агрегации тромбоцитов для двух доноров, по которым были

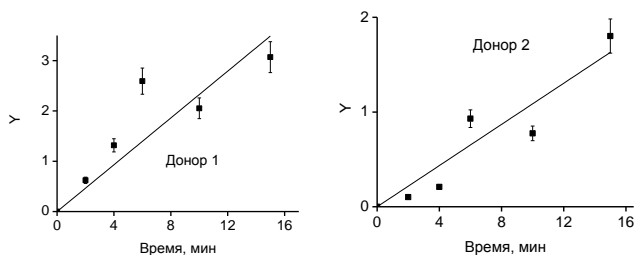


Рис. 7 Результаты агрегации для двух доноров

$k_{11} = (1.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-11} \text{ см}^3/\text{с}$ для первого и $k_{11} = (6.0 \pm 0.5) \cdot 10^{-12} \text{ см}^3/\text{с}$ для второго донора соответственно

определены константы скорости димеризации тромбоцитов, которые оказались близки к предельным диффузионным скоростям агрегации.

В последнем подразделе приведены экспериментальные результаты по агрегации полимерных частиц нанометровых размеров (70 нанометров). Для агрегации использовался один из стандартных коммерческих доступных наборов для определения белка СРБ, который является одним из важнейших маркеров острой фазы заболевания. В силу того, что размер частиц выходит за рабочий диапазон сканирующего проточного цитометра, измерения агрегации проводились на ансамбле частиц с помощью спектрофотометре на длине волны 540 нм стандартным турбодиметрическим методом, который заключался в измерении динамики оптической плотности раствора реагирующих латексных микросфер от времени. Поскольку для определения параметров агрегации требуется решать обратную задачу, которая включает в себя решение прямой задачи, необходимо уметь рассчитывать оптическую плотность раствора агрегатов с известными кон-

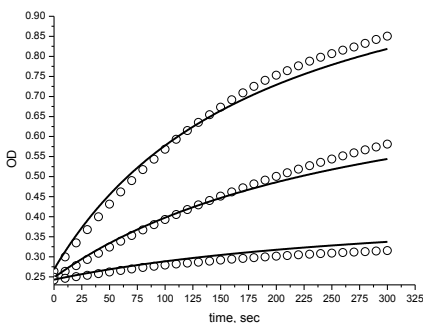


Рис. 8 Результаты подгонки экспериментальные данных по кинетики оптической плотности к теоретическим для трех различных концентраций белка.

Далее, используя алгоритмы Gillspie для динамики агрегации гетерогенных частиц, была рассчитана динамики кинетики оптической плотности раствора для различных параметров системы, которые не были известны заранее, таких как среднее число рецепторов на поверхности 70-ти нанометровых микросфер, константа аффинности антитело-рецептор и кинетическая константа. Из сопоставления теоретических и экспериментальных результатов были определены эти неизвестные параметры для данной используемой тест-системы, которые оказались равны следующим:

$$K_d = (1.82 \pm 0.7) * 10^{-11} M$$

$$N = 9.0 \pm 2.2$$

$$\beta = (4 \pm 1.4) * 10^{-6}$$

где K_d - константа аффинности, N – среднее количество рецепторов на микросфере, β - кинетическая константа.

Таким образом, можно по кинетики оптической плотности определять параметры тест-системы. Либо, зная эти параметры из предварительных экспериментов, определять неизвестную концентрацию антител в пробе.

центрациями. Это возможно с помощью использования алгоритмов расчета оптических свойств частиц с произвольной формой методом дискретных диполей. С помощью стандартных существующих алгоритмов были рассчитаны сечения экстинкции для различных агрега-

В **Заключении** сформулированы основные результаты диссертации:

1. Продемонстрировано использование новой поляризационной схемы сканирующего проточного цитометра для измерения биологических частиц (хламидомонады). Экспериментально показано, что поляризационный сигнал позволяет улучшить возможности классификации.
2. Для уравнения Смолуховского предложен функционал от вектора концентраций агрегатов для определения константы скорости димеризации. Показано, что для широкого класса ядер уравнения Смолуховского значение этого функционала линейно зависит от времени на начальной стадии.
3. На двух экспериментальных системах (агрегация тромбоцитов и агрегация латексных микросфер, покрытых биотином) определена константа скорости димеризации с помощью предложенного функционала.
4. Теоретически показано, что конечная функция распределения частиц по посадочным местам замедляет скорость протекания агрегации. В том случае, когда скорость реакции между частицами максимальна, скорость агрегации димеров на начальной стадии не зависит от функции распределения мономеров по количеству занятых рецепторов.
5. Показано, что в реакции агрегации, идущей с участием микросфер, в случае низких концентрациях добавленных антител необходимо учитывать дискретную природу рецепторов.
6. Предложено обобщение свойства “квантования” коэффициентов чувствительности в сообществе микроорганизмов с неоднородным распределением субпопуляций по скорости роста и возрасту. Показано, что учет распределения микроорганизмов по скорости роста и возрасту не нарушает “квантования” коэффициентов чувствительности контролирующих рост факторов

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. **В.М.Некрасов**, А.В.Чернышев, А.Н.Дегерменджи «Сохранение эффекта “квантования” коэффициентов чувствительности в микробных популяциях при наличии распределения клеток по скорости роста и возрасту», Доклады Академии Наук, т.406, №4 (2006): 1–3.
2. L.Fiorani, V.P.Maltsev, **V.M.Nekrasov**, A.Palucci, K.A.Semyanov, V.Spizzichino «Scanning flow cytometer modified to distinguish phytoplankton cells from their effective size, effective refractive index, depolarization, and fluorescence», *Applied Optics* 47, № 24 (2008): 4405–4412.
- 3.D.I.Strokotov, A.E.Moskalensky, **V.M.Nekrasov** «Polarized Light - scattering Profile—advanced Characterization of Nonspherical Particles with Scanning Flow Cytometry», *Cytometry Part A* 79A, № 7 (июль 1, 2011): 570–579.
4. И.В.Колесникова, **В.М.Некрасов**, Т.Н.Шерстова, Г.А.Цветовская, Е.Д.Чирикова, В.П.Мальцев, А.В.Чернышев «Определение динамических характеристик тромбоцитов по начальной стадии их агрегации», Вестник НГУ, 4 (2009): 23–30.