

Заключение диссертационного совета МГУ.011.1
по диссертации на соискание учёной степени кандидата наук

Решение диссертационного совета от «25» октября 2022 г. № 68

О присуждении Никишину Игорю Игоревичу, гражданину Российской Федерации,
учёной степени кандидата физико-математических наук.

Диссертация «Развитие методов микроскопии высокого разрешения для исследования внеклеточных везикул» по специальности 1.1.10 – «Биомеханика и биоинженерия» (физико-математические науки) принята к защите диссертационным советом 21 сентября 2022 г, протокол № 64.

Соискатель - Никишин Игорь Игоревич, 1993 г. рождения, в 2017 г. окончил физический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова по специальности 03.04.02 - "Физика". С 2017 по 2021 гг. Никишин Игорь Игоревич проходил обучение в аспирантуре на биологическом факультете МГУ имени М.В.Ломоносова по специальности 06.06.01- "Биологические науки". До октября 2021 Никишин И. И. работал на биологическом факультете, в должности - младшего научного сотрудника. В настоящее время Никишин И. И. работает в ООО "Визми" в должности научного сотрудника.

Диссертация выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель – Багров Дмитрий Владимирович, кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Официальные оппоненты:

1. Батищев Олег Вячеславович, доктор физико-математических наук, доцент, Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук, заместитель директора института по научной работе.
2. Хомутов Геннадий Борисович, доктор физико-математических наук, доцент, МГУ имени М.В. Ломоносова, физический факультет, кафедра биофизики, профессор.

3. Быков Виктор Александрович, доктор технических наук, ГК «НТ-МДТ Спектрум Инструментс», почетный Президент.

Оппоненты дали положительные отзывы на диссертацию. Выбор официальных оппонентов обоснован их компетентностью в области спиновых и магнитных эффектов в биофизике, что подтверждается наличием публикаций в этой сфере исследований.

На автореферат поступило 2 отзыва. Все отзывы положительные.

Всего опубликовано 12 статей. По теме диссертации опубликовано всего 5 статей, из них 5 статей в научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и РИНЦ.

Публикации автора по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах Web of Science, Scopus, RSC. РИНЦ:

1. Igor Nikishin, Ruslan Dulimov, Gleb Skryabin, Sergey Galetsky, Elena Tchevkina, and Dmitry Bagrov. Scanev – a neural network-based tool for the automated detection of extracellular vesicles in tem images. *Micron*, 145:103044, 2021. DOI: j.micron.2021.103044. IF SCOPUS - 2.251.

2. Igor Nikishin, Dmitry Bagrov, Elena Tchevkina, Gleb Skryabin, and Ruslan Dulimov. Detection and characterization of extracellular vesicles in transmission electron microscopy by convolutional neural network. *International Journal of Biomedicine*, 9(S16), 2019. DOI: 10.21103/IJBM.9.Suppl/_1.OR24. IF SCOPUS - 0.260.

3. D. V. Bagrov, A. M. Senkovenko, I. I. Nikishin, G. O. Skryabin, P. B. Kopnin, and E. M. Tchevkina. Application of afm, tem, and nta for characterization of exosomes produced by placenta-derived mesenchymal cells. *Journal of Physics: Conference Series*, 1942(1):012013, 2021. DOI: 10.1088/1742-6596/1942/1/012013. IF SCOPUS - 0.55.

4. Г. О. Скрыбин, А. В. Комельков, П. Б. Копнин, И. И. Никишин, С. А. Кузьмичев и Е. М. Чевкина. Влияние нокдауна кавеолина-1 на белковый состав экстраклеточных везикул, секретируемых клетками немелкоклеточного рака легких. *Успехи молекулярной онкологии*, 8(1):41–46, 2021. DOI: 10.17650/2313-805x2021-8-1-41-46. ИФ РИНЦ - 0.5.

5. Gleb O. Skryabin, Andrei V. Komelkov, Sergey A. Galetsky, Dmitry V. Bagrov, Evgeniy G. Evtushenko, Igor I. Nikishin, Kirill I. Zhordaniia, Elizaveta E. Savelyeva, Maria E. Akselrod, Iulia G. Paianidi, and Elena M. Tchevkina. Stomatin is highly

expressed in exosomes of different origin and is a promising candidate as an exosomal marker. *Journal of Cellular Biochemistry*, 122(1):jcb.29834, 2021. DOI: 10.1002/jcb.29834. IF SCOPUS - 4.429

Основные результаты диссертационной работы были представлены на 9 международных и российских научных конференциях (статьи в сборниках – 1, тезисы – 9, доклады – 8).

Диссертационный совет отмечает, что представленная диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена важная научная проблема, что можно квалифицировать как научное достижение.

На основании выполненных автором исследований впервые:

1. Сформирован оригинальный размеченный (аннотированный) набор ПЭМ-изображений внеклеточных везикул (188 изображений, 1558 индивидуальных частиц) для обучения нейросетей. В него включены изображения образцов ВВ различного происхождения – выделенных из асцитов, плазмы крови, кондиционированной среды культивирования клеток A549, COLO704, EFO21, SKOV3, а также смыва из полости матки.
2. Разработана программа (bioeng.ru/scanev) для автоматизированной обработки ПЭМ-изображений везикул и получения распределений частиц по размерам. По сравнению с ближайшим аналогом, программой FRU-Net, она демонстрирует большую скорость обработки и большее удобство использования за счет веб-интерфейса.
3. Разработанные методики визуализации ВВ помогли обнаружить новый экзосомальный маркер – стоматин (белок ассоциированный с липидными рафтами).
4. Предложена методика исследования внеклеточных везикул методом АСМ, которая позволила радикально сократить время приготовления образца и уменьшить количество адсорбированных примесей. Была впервые показана самосогласованность результатов, получаемых при измерении ВВ методом АСМ.
5. Разработана методика корреляционной микроскопии АСМ-ПЭМ, она впервые применена к образцам ВВ. Впервые показано, что характеристическая морфология ВВ, наблюдаемая на ПЭМ-изображениях, отличается от рельефа их поверхности.

Теоретическая и практическая значимость работы:

1. Набор размеченных (аннотированных) изображений внеклеточных везикул, на котором обучена нейросеть Mask R-CNN, является полностью оригинальным. Программа (веб-приложение) ScanEV для автоматизированного распознавания везикул на ПЭМ-изображении является новой, хотя и создана на базисе существовавшей ранее нейросети Mask R-CNN. Эта программа используется исследователями, которые работают с ВВ, для автоматизации обработки ПЭМ-изображений.
2. Последовательная проверка методики визуализации экзосом с помощью АСМ на самосогласованность результатов была выполнена впервые. Эта методика может быть полезна для оценки размеров экзосом различного происхождения.
3. Методика корреляционной микроскопии, которая позволила визуализировать индивидуальные частицы методами АСМ и ПЭМ, является новой. К внеклеточным везикулам такая методика была применена впервые. Эта методика может быть использована для исследования различных по своей физико-химической природе объектов, она позволяет дополнить наши представления о размерах объектов с использованием двух методов и минимизировать артефакты, присущие каждому из них. Кроме того, эта методика поможет обеспечить метрологическую прослеживаемость измерений.
4. Разработанные методики визуализации применимы к различным внеклеточным везикулам вне зависимости от их происхождения. Это показано с использованием ВВ, выделенных из кондиционированной среды культивирования первичных и перевиваемых клеток, сыворотки крови, клинических образцов асцитической жидкости, смыва из полости матки и других

Диссертация представляет собой самостоятельное законченное исследование, обладающее внутренним единством. Положения, выносимые на защиту, содержат новые научные результаты и свидетельствуют о личном вкладе автора в науку:

1. Разработана программа ScanEV для автоматизированной обработки изображений внеклеточных везикул (ВВ), полученных методом ПЭМ с контрастированием тяжелыми металлами. Программа представляет собой нейросеть, обученную на оригинальном наборе изображений; она позволяет автоматически находить на изображениях ВВ и измерять их размеры.

2. Разработана методика корреляционной микроскопии, которая позволяет получать изображения конкретных индивидуальных объектов, осажденных на сетку для ПЭМ, двумя независимыми методами (АСМ и ПЭМ) последовательно.

3. Морфология, которую имеют внеклеточные везикулы, при исследовании методом ПЭМ с контрастированием тяжелыми металлами, лишь отчасти связана с деформацией ВВ при их адсорбции на подложку и определяется, прежде всего, затеканием внутрь них контрастирующего агента.

4. Разработанные методики визуализации универсальны, т.е. применимы к ВВ вне зависимости от их происхождения. Разработанные методики помогли установить новый потенциальный экзосомальный маркер – стоматин

Достоверность экспериментальных данных подтверждена многократными повторами экспериментов. Методические разработки были использованы для образцов различного происхождения, что позволило продемонстрировать воспроизводимость и универсальность результатов. Результаты экспериментов проверялись на отсутствие внутренних противоречий (т.е. самосогласованность) и на соответствие с другими экспериментальными методами.

На заседании диссертационный совет принял решение присудить Никишину И. И. И. ученую степень кандидата физико-математических наук специальности 1.1.10 – «Биомеханика и биоинженерия» (физико-математические науки).

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, участвовавших в заседании (из 26 человек, входящих в состав совета), из них 8 докторов наук по специальности по специальности 1.1.10 – «Биомеханика и биоинженерия» (физико-математические науки), проголосовали: за -20, против - нет, недействительных бюллетеней нет.

Председатель диссертационного совета

д.ф.-м.н., профессор

Твердислов В.А.

Учёный секретарь диссертационного совета

к.т.н., доцент

Сидорова А.Э.

25.10.2022