

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидат физико-математических наук Никишина Игоря Игоревича
на тему: «Развитие методов микроскопии высокого разрешения для
исследования внеклеточных везикул»
по специальности 1.1.10 – «Биомеханика и биоинженерия»

Научная работа, представленная Никишиным И.И. на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук, посвящена развитию методов характеристики внеклеточных везикул с использованием методов микроскопии высокого разрешения, которая позволяет не только измерить размеры везикул, но и проверить их целостность, оценить чистоту, проверить степень их агрегации для решения последующих практических задач. На основе собственного эмпирического опыта автором создан новый программный инструмент для обработки изображений, позволяющий оптимизировать существующие процедуры исследования внеклеточных везикул АСМ, установить особенности возникновения контраста на ПЭМ-изображениях. В результате исследования в рамках развитой автором методической основы был выявлен новый потенциальный экзосомальный маркер – стоматин.

Диссертационное исследование, выполненное Никишиным Игорем Игоревичем, предлагает теоретически и эмпирически обоснованную, практически апробированную программу на основе компьютерной нейросети (bioeng.ru/scanev) для автоматизированной обработки ПЭМ-изображений везикул и получения распределений частиц по размерам, которая характеризуется высокой скоростью обработки информации и простотой использования в сравнении с существующими аналогами.

Структура диссертационной работы включает введение, три главы, заключение, список литературы и приложения. В первой главе проведен анализ литературный обзор имеющихся знаний о внеклеточных везикулах,

методах их исследования и выделения. Описаны различные методы исследования внеклеточных везикул, используемые при выполнении данной работы, прежде всего, это методы микроскопии высокого разрешения. Во второй главе описаны материалы и методы исследования. Также подробно и детализировано описаны все экспериментальные процедуры и этапы обработки полученных данных. В третьей главе представлены результаты исследования, сгруппированные по четырем подразделам: разработка нейронной сети для детекции внеклеточных везикул и веб-приложения ScanEV; возможности применения предложенных методик визуализации в рамках исследования стоматина как потенциального экзосомального маркера; разработка методики атомно-силовой микроскопии (АСМ) для исследования внеклеточных везикул; описание методики корреляционной микроскопии, позволяющей получать АСМ и ПЭМ изображения одних и тех же индивидуальных внеклеточных везикул.

Диссертационная работа обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, выносимые на защиту, и свидетельствуют о личном вкладе автора диссертации в науку.

Личный вклад диссертанта в разработку научной проблемы заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования, а также разработке методики корреляционной микроскопии, которая позволяет получать изображения конкретных индивидуальных объектов, осажденных на сетку для ПЭМ, двумя независимыми методами (АСМ и ПЭМ) последовательно.

Обоснованность и достоверность полученных автором экспериментальных данных подтверждена многократной воспроизводимостью экспериментов. Разработанные методики и технологии экспериментального исследования были использованы для образцов различного происхождения, что позволило, в свою очередь, продемонстрировать воспроизводимость и универсальность результатов. В ходе проверки результатов экспериментов зафиксирована

самосогласованность (отсутствие внутренних противоречий), а также соответствие и соотнесенность с другими экспериментальными методами.

Практическая значимость полученных в диссертационной работе Никишина И.И. результатов состоит в том, что разработанные автором методики визуализации применимы к различным внеклеточным везикулам вне зависимости от их происхождения. Это показано с использованием внеклеточных везикул, выделенных из кондиционированной среды культивирования первичных и перевиваемых клеток, сыворотки крови, клинических образцов асцитической жидкости, смыва из полости матки и других.

Несомненны возможности применения результатов диссертационного исследования по использованию методики корреляционной микроскопии с целью визуализации индивидуальных частиц методами АСМ и ПЭМ при изучении внеклеточных везикул.

Научная новизна диссертационного исследования И.И. Никишина заключается в том, что в работе сформирован оригинальный размеченный (аннотированный) набор ПЭМ-изображений, включающий изображения образцов внеклеточных везикул различного происхождения, используемых для обучения нейросетей. Автором разработана и апробирована уникальная программа для автоматизированной обработки ПЭМ-изображений везикул и получения распределений частиц по размерам. В ходе исследования был обнаружен новый экзосомальный маркер – стоматин.

Основные научные результаты, полученные в диссертации Никишина Игоря Игоревича, в полной мере отражены в автореферате и в 12 печатных работах, среди которых 5 статей, опубликованных в научных изданиях, индексируемых в российских и международных базах.

Диссертация выполнена на высоком научном уровне. Никишин И.И. проявил себя как состоявшийся ученый-исследователь, обладающий высокой научной эрудицией, зрелой методологической культурой, профессиональной компетентностью, способный решать сложные теоретико-экспериментальные

задачи. Обоснованные в диссертации теоретические положения и полученные в эмпирическом исследовании результаты рекомендуются для широкого использования специалистами-биологами.

В целом, представленная диссертация является интересным и современным научным трудом, но, как всякая диссертация не лишена некоторых неточностей:

Так на стр.22 отмечается, что полуконтактный режим (или таппинг мода) имеет разрешение меньшее, чем режимы контактной моды, что не верно (см. Scanning Probe Microscopy. The Lab on Tip, p.87) - разрешение в этом режиме зависит от выбора типа кантиллеров и параметров сканирования.

На стр. 23 диссертации автор отмечает артефакты метода АСМ, в числе которых перечислены нелинейность сканера и крип пьезокерамики. Но это не артефакты метода, а артефакты метода на приборе диссертанта – относительно старой модели АСМ – Solver-PRO-M. Уже более 15 лет моделях приборов используются сканеры с прецизионными емкостными датчиками, в которых эти проблемы решены. Т.е. проблемы, связанные с дефектами сканера являются не недостатками метода АСМ, а недостатками используемой модели прибора. В современных приборах используются новые методы сканирования, такие как прыжковая микроскопия (Hybrid Mode, сканирующая зондовая спектроскопия), режим автоматического выбора параметров сканирования, мода ScanTronics (<https://www.ntmdt-si.ru/products/atomic-force-microscopes/ntegra-ii>), что значительно облегчает работу с объектами, в том числе биологическими.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.1.10 – «Биомеханика и биоинженерия» (по физико-математическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском

государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Никишин Игорь Игоревич заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.1.10 – «Биомеханика и биоинженерия».

Официальный оппонент,
доктор технических наук (05.27.01 - твердотельная электроника, радиоэлектронные компоненты, микро- и нанoeлектроника, приборы на квантовых эффектах; 01.04.01 - приборы и методы экспериментальной физики),
Почетный президент группы компаний
НТ-МДТ Спектрум Инструментс,
профессор МФТИ, лауреат премии
Правительства РФ
в области науки и техники,
Президент нанотехнологического общества России

Быков Виктор Александрович

10.10.2022

124482, Москва, Зеленоград, корп. 317-А а/я 144, НТ-МДТ, Тел.: +7(499)110-2050.
Факс: +7(499) 110-2070, E-mail: info@ntmdt-si.ru,
Быков Виктор Александрович.

Подпись Быкова Виктора Александровича заверяю,
Ученый секретарь ГК
«НТ-МДТ Спектрум Инструментс»
к.ф.-м.н.

_____ Рябоконе В.Н.