

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»

Актуальность и важность темы диссертационной работы, выполненной И.И. Никишиным, обусловлена активным развитием в мире в настоящее время научных исследований, связанных с изучением структуры и физиологической роли внеклеточных липидных везикул в организме. Важность этих исследований помимо фундаментальных научных аспектов обусловлена определенными перспективами практического биомедицинского применения внеклеточных везикул в клинической практике для диагностики и, возможно, терапии. Принципиальным и ключевым по важности моментом экспериментальных исследований внеклеточных везикул является их визуализация и структурно-функциональная характеристика, которая в настоящее время проводится с использованием методов микроскопии высокого разрешения. Эти методы трудоемки, сложны и зачастую затрудняют интерпретацию получаемых изображений вследствие физических ограничений методов, возможных артефактов и изменений объектов при приготовлении образцов и в ходе экспериментов. Это обстоятельство дополнительно обуславливает особую значимость и актуальность выполненного диссертантом исследования.

Новизна диссертационного исследования заключается в том, что на основе полученных оригинальных экспериментальных данных И.И. Никишину удалось сформировать оригинальный размеченный (аннотированный) набор ПЭМ-изображений внеклеточных везикул для обучения нейросетей. Им создан новый программный инструмент для компьютерной автоматизированной обработки изображений, позволяющий

оптимизировать существующие процедуры исследования внеклеточных везикул методами зондовой и электронной микроскопии.

Разработанные Никишиным Игорем Игоревичем оригинальные методики и технологии визуализации внеклеточных везикул позволили выявить новый потенциальный экзосомальный маркер – стоматин, представляющий собой белок, ассоциированный с липидными рафтами. Методика исследования внеклеточных везикул методом АСМ, предложенная автором диссертационного исследования, позволяет сократить время приготовления образца и уменьшить количество адсорбированных примесей. Принципиально новой оказалась методика корреляционной микроскопии АСМ-ПЭМ, которая позволила доказать отличие характеристической морфологии внеклеточных везикул, наблюдаемой на ПЭМ-изображениях от рельефа их поверхности, детектируемого методом АСМ. Этот результат является важным для правильной интерпретации данных визуализации биологических объектов, получаемых различными методами микроскопии высокого разрешения.

Теоретическая значимость диссертационного исследования И.И. Никишина обусловлена тем, что полученные результаты вносят существенный вклад в развитие современных методов микроскопии высокого разрешения и других биоинженерных методов и технологий. На основании полученных эмпирических данных сформирован набор размеченных (аннотированных) изображений внеклеточных везикул, на котором обучена нейросеть Mask R-CNN. Разработанная методика позволяет дополнить теоретические представления о размерах и форме объектов с использованием двух методов, а также минимизировать присущие каждому из них артефакты. Разработанная авторская методика позволяет обеспечить метрологическую прослеживаемость производимых измерений.

Практическая значимость диссертационного исследования автора заключается в том, что разработанная и апробированная им методика корреляционной микроскопии может быть использована для исследования

различных по своей физико-химической природе объектов и позволяет визуализировать индивидуальные частицы методами АСМ и ПЭМ. Разработанные методики визуализации применимы к различным внеклеточным везикулам вне зависимости от их происхождения, что эмпирически доказано при использовании внеклеточных везикул, выделенных из различных образцов (кондиционированной среды культивирования первичных и перевиваемых клеток, сыворотки крови, клинических образцов асцитической жидкости, смыва из полости матки и др.). Этот результат имеет большое практическое значение, поскольку потенциально расширяет возможности применения современных методов микроскопии в реальной клинической практике.

Обоснованность и достоверность результатов исследования обеспечивается непротиворечивостью промежуточных и основных результатов; сопоставлением с данными, полученными другими исследователями; применением методов статистической обработки эмпирических результатов; методологической обоснованностью исходных положений; многократной воспроизводимостью экспериментов. Использование методических разработок позволило продемонстрировать универсальность и воспроизводимость результатов, а также их самосогласованность.

Автором в процессе теоретического анализа и эмпирического исследования реализовано масштабное изучение возможностей применения методов микроскопии высокого разрешения для исследования внеклеточных везикул, полученные результаты вполне можно признать достоверными и обоснованными. Выбор цели исследования, постановка исследовательских задач отражают его разносторонность и многоаспектность.

Избранная автором структура диссертации отражает логику и характер проведенного научного исследования. Диссертационная работа включает в себя введение, три главы, заключение, список литературы и приложения. В первой главе представлен анализ и систематизация имеющихся знаний о

внутриклеточных везикулах, а также методах их выделения и исследования. Описаны различные методы и процедуры исследования внутриклеточных везикул, используемые при выполнении данной работы. Особое внимание уделено автором методам микроскопии высокого разрешения, которые описаны подробно и профессионально. Отмечены возможности, достоинства и недостатки методов электронной и зондовой микроскопии, возможные причины и источники артефактов и искажений изображений. Вторая глава посвящена подробному представлению материалов и методов исследования. В данной главе описаны все экспериментальные процедуры и этапы обработки полученных данных (в том числе с использованием компьютерных программ). Очень подробно и профессионально описаны методы обработки изображений с использованием алгоритмов искусственного интеллекта. Третья глава содержит результаты экспериментального исследования, которые представлены в четырех подразделах, соответствующих этапам проведенного эксперимента: разработка нейронной сети для детектирования внутриклеточных 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 внутриклеточных везикул; описание методики корреляционной микроскопии, позволяющей получать АСМ и ПЭМ изображения одних и тех же индивидуальных внутриклеточных везикул.

В заключении представлены итоги работы и обобщения полученных результатов. Ключевые положения работы и итоги диссертации изложены в выводах.

Личный вклад диссертанта в разработку научной проблемы заключается в создании и апробации методики корреляционной микроскопии АСМ-ПЭМ, которая позволила визуализировать индивидуальные частицы методами АСМ и ПЭМ, а также непосредственном участии на всех этапах исследования. Авторские разработки позволяют получать изображения

конкретных индивидуальных объектов, осажденных на сетку для ПЭМ, двумя независимыми методами (АСМ и ПЭМ) последовательно и применимы к различным внеклеточным везикулам вне зависимости от их происхождения. Разработанная Никишиным И.И. программа (bioeng.ru/scanev) для автоматизированной обработки ПЭМ-изображений везикул и получения распределений частиц по размерам позволяет повысить скорость обработки и удобство применения, которое обеспечивается удобным веб-интерфейсом.

Результаты представленной научной работы отражены в полной мере в тексте автореферата, а также в 12 печатных работах, среди которых 5 статей, опубликованных в научных изданиях, индексируемых в российских и международных наукометрических базах.

В целом представленные результаты диссертационного исследования Игоря Игоревича Никишина свидетельствуют о высокой научной самостоятельности соискателя, его диссертационная работа характеризуется научной новизной, а практические результаты представляются достаточно перспективными для широкого круга био-медицинских и других применений.

Положительно оценивая работу в целом, необходимо отметить и ряд имеющихся в ней недостатков и высказать некоторые пожелания, а именно:

1. В работе методами микроскопии исследуются довольно сложно устроенные мембранные биологические структуры – внеклеточные везикулы. На наш взгляд анализ изображений таких сложных систем требует сравнения с простым контролем – биомиметическими липидными везикулами – липосомами, которые не содержат белков и других компонентов в мембране и во внутреннем объеме. Такое сравнение позволило бы более убедительно интерпретировать изображения образцов, содержащих внеклеточные микровезикулы, выявить особенности их структуры.

2. Было бы важно, на наш взгляд, более детально проанализировать взаимодействие ацетата уранила (контрастирующего агента) с различными

структурными компонентами внеклеточных везикул, подложкой и другими компонентами исследуемых суспензий. Это позволило бы более убедительно интерпретировать получаемые электронномикроскопические изображения.

3. Было бы неплохо также использовать для визуализации изучаемых внеклеточных везикул и сравнительного анализа получаемых изображений другие методы микроскопии – сканирующую электронную микроскопию и криоПЭМ. Но учитывая сложность текущей обстановки это скорее пожелание на будущее.

4. В работе имеются, хоть и в небольшом количестве, опечатки и грамматические погрешности. Например, на стр. 58 – «липоротейны». Имеются непонятные слова и жаргонизмы – «рекрутинг белков», механизм «сортинга»..., загрязняющие текст на русском языке.

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 физико-математических наук,
профессор кафедры биофизики физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Хомутов Геннадий Борисович

Контактные данные:

тел.: +7 495 939-16-82, e-mail: gbk@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация:

03.01.02 – «Биофизика»

Адрес места работы:

119991, ГСП-1, г. Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 2,
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова», физический факультет.

Тел.: +7 495 939-16-82

Факс: +7 495 932-88-20

E-mail: info@physics.msu.ru

Подпись сотрудника физического факультета МГУ Г.Б. Хомутова удостоверяю: