

**ОТЗЫВ официального оппонента**  
**на (о) диссертацию(и) 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»**

Диссертационное исследование Никишина И.И. посвящено актуальному направлению биомеханики и биоинженерии – развитию методов исследования внеклеточных везикул.

Автор определяет актуальность исследования растущим интересом к изучению физиологической роли внеклеточных везикул и их диагностическому потенциалу. Значительный акцент сделан на недостаточную проработанность методов визуализации нанообъектов на сегодняшнем этапе развития технологий электронной микроскопии. Соответственно, возникает закономерная необходимость совершенствования и развития методик характеристики и визуализации, использующих ПЭМ и АСМ в направлении увеличения их информативности и удобства использования, а также приспособления к современным технологическим реалиям: ускорения и упрощения.

В первой главе Никишин И.И. осуществляет подробный анализ классов внеклеточных везикул, их физиологических свойств, источников происхождения и биохимического состава, обуславливающие, в свою очередь, применяемые методы микроскопии высокого разрешения. Во второй главе автор описывает используемые в работе экспериментальные процедуры получения изображений методами просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и атомно силовой (АСМ), и вспомогательных методов анализа траектории наночастиц (АТН) и иммуноблотинга. Выполненный автором теоретический анализ позволил сформулировать обоснованные положения на защиту.

Третья глава содержит описание процедуры разработки, обучения и тестирования нейросети для детекции ВВ и веб-приложению ScanEV на ее основе, апробации разработанных методик визуализации на примере исследования стоматина как потенциального экзосомального маркера, а также разработке методики атомно-силовой микроскопии (АСМ). Согласно результатам количественного сравнения нейросети Mask R-CNN (ScanEV), обученной автором, и единственной существующей на время проведения исследования нейросети FRU-Net, Никишин И.И. выявил высокие значения параметров точности (precision) и полноты (recall), что показывает ее эффективность. Применение разработанного метода ПЭМ для визуализации присутствия стоматина в экзосомах, продуцируемых различными раковыми клетками (немелкоклеточный рак легкого, клетки рака груди и яичников), а также в экзосомах из биологических жидкостей, включая плазму крови, асцитические жидкости и смыв из полости матки, подтвердило возможность использование его как валидного экзосомального маркера.

Описывая результаты применения разработанной методики атомно-силовой микроскопии (АСМ) для исследования ВВ, автор подтверждает их соответствие изображениям, получаемым другими методами микроскопии): отсутствие зависимости размера частиц (высоты  $H$  и диаметра  $D$ ) от выбора поля зрения; независимость поверхностной плотности частиц  $\sigma$  от поля сканирования; увеличение поверхностной плотности частиц  $\sigma$  при увеличении концентрации суспензии, из которой частицы наносят на подложку, при одинаковом времени их адсорбции.

Обоснованной заслугой автора явилась разработка и апробация методики корреляционной микроскопии, впервые примененная к внеклеточным везикулам, позволяющая получать АСМ и ПЭМ изображения одних и тех же индивидуальных ВВ.

Диссертант выносит на защиту четыре основных положения, которые тщательно продуманы и сформулированы в соответствии с поставленными

задачами и содержанием исследования. Представленные в заключении выводы соответствуют поставленным задачам.

Теоретическая и практическая значимость выполненного исследования заключается в разработке и создании оригинального и уникального программного обеспечения для распознавания, визуализации и оценки экзосом различного происхождения.

Объективность и достоверность полученных результатов и выводов определяются многократными повторами экспериментов, применением методических разработок для образцов различного происхождения, а также апробацией материалов как на научно-методических конференциях различного уровня, так и публикациями в ведущих рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и РИНЦ. Результаты исследования воспроизводимы, универсальны, внутренние противоречия отсутствуют.

Автореферат полностью отражает содержание представленной диссертации. Основные результаты диссертационного исследования изложены в 5 публикациях автора.

В целом диссертационная работа демонстрирует квалифицированный и творческий подход автора, как к теоретическому осмыслению поставленной проблемы, так и к ее практическому решению.

Тем не менее, у меня есть несколько вопросов и замечаний к работе:

- 1) Не совсем понятно, может ли предложенная диссертантом программа различать отдельные везикулы или частицы внутри плотного кластера или агрегата, и если может, то как.
- 2) Любые везикулы очень чувствительны к дегидратации, а потом полученные изображения как ПЭМ, так и АСМ на воздухе соответствуют сильно деформированным везикулам. Анализировалось ли влияние дегидратации на морфологию внеклеточных везикул и структуру белков на их поверхности?

- 3) Не совсем понятно упоминание липидных рафтов в контексте обнаружения стоматина на поверхности микровезикул, потому что структура липидного бислоя в работе не исследовалась.
- 4) В выводах работы сказано, что стоматин как биомаркер внеклеточных везикул был обнаружен благодаря разработанным в диссертации методикам. Однако, насколько я понял из текста диссертации, его обнаружение происходило стандартным методом иммуноблоттинга. Хотелось бы получить более подробную информацию, какие новые подходы были предложены автором в данном случае.

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,

заместитель директора института по научной работе

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук

Батищев Олег Вячеславович

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 954 86 73, e-mail: olegbati@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация:

03.01.02 – Биофизика

Адрес места работы:

119071, Ленинский просп., 31, корп. 4, Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук.  
тел.: 7 (495) 954 86 73, e-mail: olegbati@mail.ru