

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации А.В. Анкудинова «Диагностика наноустройств методами Сканирующей Зондовой Микроскопии», представленной на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики.

Как специалист в области клеточной биологии я могу оценить автореферат диссертации А.В. Анкудинова в аспекте применения метода СЗМ для исследования живых клеток. Механические свойства клеток и их механочувствительность - это весьма актуальные вопросы клеточной биологии. Известно, что механическое состояние цитоплазмы клеток животных, в том числе, и человека очень динамично. Цитоплазма может быть текучей или достаточно ригидной в одной и той же клетке, движущейся по субстрату в зависимости от фазы движения. Поначалу этот феномен не находил объяснения, поскольку оптическими методами в цитоплазме, особенно в ее краевой зоне, ничего не выявлялось. Лишь с развитием методов клеточной биологии, иммунохимии и новых подходов в микроскопии стало понятно, что механические свойства цитоплазмы клеток определяются их цитоскелетными структурами, которые и обладают высоким динамизмом. Так, по современным представлениям, цитоскелет большинства клеток состоит из трех типов фибриллярных структур – микрофиламентов (диаметр 7 нм), промежуточных филаментов (10-12 нм) и микротрубочек (25 нм). Все эти фибриллы могут обратимо разбираться под действием специфических сигналов, а для микрофиламентов и микротрубочек показано, что само их существование связано с постоянно идущими процессами сборки-разборки с обоих концов. Микрофиламенты клеток, состоящие из белка актина и ряда актин-связывающих белков, могут формировать пучки и сети и взаимодействовать с системой микротрубочек и промежуточных филаментов. Такие ассоциации и взаимодействия обязательно будут сказываться на механических свойствах цитоскелета и, следовательно, цитоплазмы в целом. Дополнительно, в тесном взаимодействии с микрофиламентами работают т.н. молекулярные моторы класса миозинов, главным образом, миозин II типа, который вызывает сокращение клеток, стягивая вместе микрофиламенты, что также приводит к повышению жесткости клеток. Считается, что переменная жесткость цитоплазмы важна для миграции клетки, например, раковой клетки сквозь трехмерный внеклеточный матрикс и метастазирования. В нормальной эндотелии кровеносных сосудов жесткость цитоплазмы, по-видимому, играет важную роль в процессах восприятия напряжения сдвига на поверхности клетки, создаваемого движущейся кровью, и последующей активации внутриклеточных сигнальных каскадов, регулирующих просвет сосудов.

Нарушение эластичности эндотелия может быть первопричиной нарушений сосудистого тонуса и развития артериальной гипертонии.

До недавнего времени для анализа жесткости (упругости) клеток применяли метод их засасывания в калиброванный капилляр. Другой подход состоял в индентации клетки с помощью стеклянного волокна (зонда) с диаметром кончика 2 микрона и наблюдении за изгибанием второго стекловолокна, несущего данный зонд. Других количественных методов прямого измерения жесткости живых клеток не существовало. С появлением метода СЗМ возникла возможность применять его в отношении живых клеток и перевести процесс анализа упругости клеток на совершенно иной качественный уровень с высоким пространственным разрешением и ранее недоступной чувствительностью. Однако на пути применения метода СЗМ для живых клеток имелся ряд проблем. Так, острая игла зонда в тактильном режиме необратимо повреждала клеточную мембрану и вызывала гибель клетки. Одним из достижений автора является преодоление этого ограничения. Им был разработан специальный субмикронный зонд для СЗМ, в котором на конец иглы стандартного зонда приклеивали сферическую частичку двуокиси кремния. В результате такой зонд мог быть многократно использован на одной и той же клетке, поскольку не вызывал ее повреждения при первом же касании. Это нововведение позволило автору сканировать живые культивируемые клетки в тактильном режиме и установить, что клетки линий А549 и L41 отличаются друг от друга по величине модуля Юнга в 4 раза. Автор запатентовал способ изготовления специализированных сферических зондов субмикронного калиброванного радиуса кривизны для СЗМ исследований и наладил мелкосерийный выпуск этих зондов.

Выполненные автором технические усовершенствования зондов для СЗМ и проведенные исследования на живых клетках, во-первых, значительно расширили спектр задач, которые возможно решить с помощью метода СЗМ живых клеток. Например, появляется возможность, анализировать во времени изменение локальной жесткости клетки при воздействии различных стимуляторов и ингибиторов биологических реакций. Во-вторых, автор показал, что с помощью его технологии СЗМ возможно выявлять внутриклеточные подмембранные структуры в живых клетках. Это, в основном, и есть цитоскелетные структуры, и анализ их распределения, коррелированный с количественной характеристикой локальной жесткости клетки, дает возможность детально описать закономерности регуляции механических свойств клеток.

Стоит отметить, что адаптация метода атомно-силовой микроскопии к изучению живых эукариотических клеток активно проводится в мире в последнее десятилетие, однако в России этим практически никто не занимается, и А.В. Анкудинов и его коллеги составляют приятное и очень важное для отечественной науки исключение. Принципиальных замечаний

по части работы А.В. Анкудинова, связанной с изучением живых клеток методом СЗМ, не имею.

Полученные диссертантом результаты опубликованы в 29 статьях в российских и зарубежных рецензируемых журналах, представлены на конференциях и конгрессах. Получен патент РФ на изобретение. Результаты, полученные в работе А.В. Анкудинова в части изучения живых клеток, имеют практическое значение в плане разработки новых подходов к исследованию механобиологии клеток человека в норме и в патологических состояниях. Полученный автором материал может быть использован при обучении студентов медико-биологических специальностей.

Диссертационная работа А.В. Анкудинова «Диагностика наноустройств методами Сканирующей Зондовой Микроскопии» по специальности 01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики по своей актуальности, новизне, научному и методическому уровню, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов полностью соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а диссертант заслуживает присуждения искомой степени доктора физико-математических наук по специальности 01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики.

Директор НИИ экспериментальной кардиологии
руководитель лаборатории клеточной подвижности
НИИ экспериментальной кардиологии
Российского кардиологического научно-производственного
комплекса МЗ ФР
доктор биологических наук, профессор

ул. 3-я Черепковская д. 15а, Москва 121552, Россия
эл. почта: shirinsky@cardio.ru
тел.: 8495-414-6703

10.10.2015



В.П. Ширинский