



«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной
работе СПбГЭТУ

Д.В. Гайворонский

«_____» ноября 2017 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации

на диссертацию Халисова Максима Миндигалеевича

**«Применение атомно-силовой микроскопии для детектирования
отклика нативных клеток на внешние воздействия»,**

представленную на соискание ученой степени

кандидата технических наук

по специальности 01.04.01 –

Приборы и методы экспериментальной физики.

Диссертация М.М. Халисова посвящена развитию и адаптации методик атомно-силовой микроскопии (АСМ) для эффективного детектирования вызванных разными физическими, химическими воздействиями изменений механических и геометрических характеристик животных клеток. В работе такие адаптированные АСМ методики применены для изучения четырех типов клеток в нативном, нефиксированном состоянии: фибробластов, эритроцитов, эндотелиальных клеток, сенсорных нейронов.

Значительный интерес к исследованию нативных клеток методом АСМ вызван удобными возможностями получения количественной информации о геометрических и механических свойствах этих объектов с субмикронным пространственным разрешением и в условиях, считающихся физиологически адекватными (в жидкой среде при оптимальной температуре). Применение АСМ для изучения нативных клеток востребовано в фундаментальных биологических исследованиях, медицинской диагностике (здорового/патологического состояния), тестировании действия лекарств и токсинов.

Важной нерешенной проблемой остается доведение АСМ измерений нативных клеток до уровня рутинных методик. Разработка рутинных методик невозможна без ясного представления о вкладах различных возмущающих факторов в результаты исследований. В диссертации рассмотрены следующие такие факторы: характеристики зонда, твердая подложка, сильная адгезия клеток с ней. Представленные автором данные проясняют влияние перечисленных факторов на АСМ измерения нативных

клеток. Предложенные в диссертации методики позволяют повысить надежность результатов измерения механических и геометрических характеристик столь сложных и деликатных объектов как нативные клетки.

В работе использован относительно новый высокоинформативный и щадящий квазистатический режим, отличающийся от традиционных режимов детектирования нагрузочно-разгрузочных зависимостей – силовых кривых АСМ – повышенной скоростью индентирования. Быстрое зондирование позволяет уменьшить время измерений, что принципиально важно при исследовании изменчивых и чувствительных нативных клеток. В силу новизны, квазистатический режим применялся в исследованиях нативных клеток относительно мало – это и все вышеизложенное обосновывает и подтверждает **актуальность** работы.

Научная новизна

По мнению ведущей организации, наиболее значимыми результатами работы являются:

1. Показано, что измеряемые в режиме PeakForce QNM значения контактной жесткости более точно характеризуют механические свойства нативных фибробластов сердечной ткани куриных эмбрионов, чем величины модуля Юнга, определенные по моделям Снеддона и ДМТ для стандартных острых и субмикронных сферических зондов соответственно.
2. Разработана АСМ методика, позволяющая обнаруживать неоднородности механических свойств наружных слоев клеток. Она заключается в зондировании нативных объектов двумя типами зондов с субмикронным кончиком (пирамидальным и сферическим) и использовании значений контактной жесткости для количественной характеристики механических свойств клеток. Применение этой методики для исследования фибробластов сердечной ткани показало, что внешние слои этих клеток ведут себя как жесткая по отношению к цитоплазме оболочка.
3. С помощью АСМ в режиме количественной наномеханики обнаружено, что у нефиксированных крысиных эритроцитов на полилизинной подложке дополнительное натяжение плазматической мембраны, вызванное продолжительным по времени контактом с подложкой, не нарушая целостности объектов, приводит к набуханию клеток и, как минимум, к 3-х кратному увеличению их модуля Юнга.
4. Доказано, что близость твердой подложки не препятствует АСМ детектированию в квазистатическом режиме изменений модуля Юнга цитоскелета дистальных областей микрососудистого эндотелия мышечных легких толщиной ~100 нм (сопоставимой с глубиной индентирования), возникающих под действием специфических ингибиторов основных компонентов цитоскелета (тубулина, актина). Обработка ингибиторами проявлялась в достоверно зарегистрированном размягчении тонкой периферии клеток.

Обоснованность и достоверность результатов

Достоверность результатов подтверждена многочисленными экспериментами, согласием полученных данных измерений с современными представлениями об устройстве животных клеток и непротиворечивостью результатам других авторов. Она обусловлена совместным использованием взаимодополняющих методов сканирующей зондовой и оптической микроскопии, а также современных теоретических моделей для анализа взаимодействия зонда сканирующего зондового микроскопа с поверхностью клеток.

Научная и практическая значимость работы

Научная и практическая значимость работы не подвергается сомнению.

Апробированная на нативных фибробластах АСМ методика, позволившая обнаружить неоднородности механических свойств наружных слоев клеток, может быть применена и к образцам нативных клеток других типов. Методика заключается в зондировании образца двумя типами зондов с субмикронным кончиком (пирамидальным и сферическим) и использовании значений контактной жесткости в количественном анализе механических свойств клеток.

Практически значимым представляется результат о необходимости учета трансформации осажденных на полилизиную подложку нативных эритроцитов, т.к. данный эффект может сильно завышать результаты АСМ измерений модуля Юнга клеток и вносить дополнительную ошибку в данные.

Показанная возможность детектирования с помощью АСМ изменений модуля Юнга тонких удаленных от центра областей эндотелиоцитов, открывает доступ к изучению роли отдельных типов белковых молекул в регуляции механических характеристик этих клеток.

Обнаруженное существенное расхождение средних значений модуля Юнга сенсорных нейронов куриных эмбрионов при измерении в квазистатическом режиме АСМ наглядно проявляет важность сохранения неизменной геометрии кантилеверов, выбранных для проведения статистических измерений модуля Юнга клеток выбранного типа.

Рекомендации по использованию

Результаты работы могут быть полезны исследователям в области АСМ в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, Санкт-Петербургском государственном электротехническом университете «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина), в компании НТ-МДТ СИ, Уральском федеральном университете им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, Казанском (Приволжском) федеральном университете, Университете ИТМО, Физико-техническом институте им. А.Ф. Иоффе РАН, Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН и др. Особый интерес содержание диссертации может представлять для исследователей клеток крови, эпителиальных клеток, нейронов, фибробластов.

Работа проводилась на микроскопе с режимом PeakForce QNM компании Bruker, однако, ее результаты можно использовать и на приборах с аналогичными квазистатическими режимами других производителей (HybriD mode, HT-МДТ СИ; Quantitative Imaging (QI), JPK Instruments; Digital Pulsed Force Mode, WITec).

Замечания

1. В разделе «1.2 Методы изучения механических характеристик клеток» следовало кроме микропипеточной аспирации и оптического пинцета вкратце рассмотреть и другие активные методы изучения механических характеристик клеток.
2. В тексте на стр. 30 и в таблице 1 на стр. 31 не совпадают указанные диапазоны определенных с помощью АСМ значений модуля Юнга различных типов клеток. В тексте говорится о разбросе величин параметра в четыре порядка, в то время как в таблице он составляет лишь 2 порядка.
3. Для обозначения динамического полуконтактного режима работы АСМ автор использовал малораспространенный в русскоязычной научной литературе термин «тэппинг».
4. В предпоследней строке таблицы на стр. 31 единицы измерения модуля Юнга указаны на английском, а не на русском языке: «кРа» следует заменить на «кПа».
5. Тексты диссертации и автореферата содержат опечатки. Так, в диссертации на стр. 25 в последней строке вместо «электро-» написано «элетро-», в подписи к рисунку 2.2 на стр. 41 «пъезосканер» нужно заменить на «пъезосканер», допущена ошибка в слове «индентирование» в 6-ой строке стр. 50 – написано «индентироваание», на стр. 54 в подписи к рисунку 2.8 вместо «аппроксимация» написано «аппрокимация», в конце 15-ой строки стр. 117 с ошибкой написано слово «ингибирование» – «ингибрирование». В автореферате на стр. 14 в последней строке описания содержания пятой главы работы вместо «нокодазол» написано «нокадозол».

Перечисленные замечания не снижают общий высокий уровень работы и не уменьшают значимость полученных результатов.

Заключение

Диссертация представляет собой выполненное на актуальную тему законченное научное исследование, посвященное развитию и адаптации методик АСМ, позволяющих эффективно детектировать изменения механических и геометрических характеристик животных клеток, вызванные различными внешними воздействиями.

Автореферат не противоречит диссертации и отражает основное содержание работы. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности ВАК 01.04.01 - Приборы и методы экспериментальной физики (технические науки).

По объему, научной новизне, практической значимости полученных результатов диссертационная работа М.М. Халисова полностью отвечает требованиям, изложенным в п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, (утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г., № 842), а ее автор, Максим Миндигалеевич Халисов, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидат технических наук по специальности 01.04.01 - Приборы и методы экспериментальной физики.

Диссертационная работа доложена автором на заседании кафедры микро- и нанoeлектроники, от 27 октября 2017 года (Протокол №10).

Заведующий кафедрой микро- и нанoeлектроники
доктор технических наук, профессор



Лучинин В. В.

Ученый секретарь
Кандидат физико-математических наук, доцент



Александрова О. А.