

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.034.01 НА БАЗЕ  
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ  
НАУКИ ИНСТИТУТА АНАЛИТИЧЕСКОГО ПРИБОРОСТРОЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИАП РАН)  
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 27 декабря 2018 г., протокол №8

о присуждении Халисову Максиму Миндигалеевичу, гражданину РФ, ученой  
степени кандидата технических наук

Диссертация «Применение атомно-силовой микроскопии для детектирования отклика нативных клеток на внешние воздействия» по специальности 01.04.01 – приборы и методы экспериментальной физики – принята к защите 22.10.2018, протокол № 6-2 диссертационным советом Д 002.034.01 на базе Института аналитического приборостроения Российской академии наук (ИАП РАН), 190103, Рижский пр., д. 26, Санкт-Петербург, РФ, приказ о создании диссертационного совета № 714/нк от 02.11.2012 года.

Соискатель, Халисов Максим Миндигалеевич, гражданство РФ, 1990 года рождения, в 2013 г. окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики», а в 2017 году очную аспирантуру Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики» (Университет ИТМО); работает научным сотрудником в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук.

Диссертация выполнена на кафедре нанофотоники и метаматериалов Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики» (Университет ИТМО).

Научный руководитель – доктор физико-математических наук Анкудинов Александр Витальевич, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук, лаборатория физико-химических свойств полупроводников, старший научный сотрудник.

**Официальные оппоненты:**

1. Бауэр Светлана Михайловна, доктор физико-математических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», математико-механический факультет, профессор кафедры теоретической и прикладной механики.

2. Лебедев Дмитрий Витальевич, кандидат физико-математических наук, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» Федерального государственного бюджетного учреждения «Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова», отделение молекулярной и радиационной биофизики, исполняющий обязанности заместителя руководителя  
**дали положительные отзывы на диссертацию.**

**Ведущая организация** – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)», в своем **положительном заключении**, подписанном Мошниковым Вячеславом Алексеевичем, доктором физико-математических наук, заместителем заведующего кафедрой микро- и наноэлектроники по научной работе; Александровой Ольгой Анатольевной, кандидатом физико-математических наук, доцентом кафедры микро- и наноэлектроники и утвержденном Гайворонским Дмитрием Вячеславовичем, кандидатом технических наук, заместителем директора департамента науки Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)», **указала на следующие 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. Для обозначения динамического полуконтактного режима работы АСМ автор использовал малораспространенный в русскоязычной научной литературе термин «тэппинг».
3. Стоило более подробно изучить, почему использование зондовых датчиков разных производителей для индентирования сенсорных нейронов в шестой главе приводит к получению несходных результатов измерения эффективного модуля Юнга и какие характеристики зондов за это ответственны.
4. Не везде был соблюден единый стиль оформления рисунков. Кроме того, излишним был бы перевод англоязычных обозначений на некоторых рисунках на русский язык.
5. Тексты диссертации и автореферата содержат опечатки. Так, в диссертации на стр. 20 во втором абзаце вместо «электро-» написано «элетро-»; также ошибки допущены в словах «пъезосканер» (в подписи к рисунку 2.2 на стр. 32), «индентирование» (во втором абзаце на стр. 39), «ингибирование» (восьмая строка снизу на стр. 91). В предпоследней строке таблицы 1 на стр. 24 единицы измерения модуля Юнга указаны на английском, а не на русском языке. В автореферате на стр. 15 в последней строке описания содержания пятой главы работы с опечаткой написано слово «нокодазол».

Соискатель имеет 25 (двадцать пять) опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 25 (двадцать пять) работ, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, входящих в Перечень ВАК РФ 6 (шесть) работ, а также 19 (девятнадцать) тезисов докладов и материалов конференций.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Анкудинов А.В., **Халисов М.М.**, Пенниайнен В.А., Подзорова С.А., Крылов Б.В. Применение атомно-силовой микроскопии для исследования процессов внутриклеточной сигнализации в нейронах // Журнал технической физики, Т.85, №10, 2015. С. 126-130. 0,625 п.л. / 0,125 п.л. Вклад Халисова М.М.: проведение измерений и анализ экспериментальных данных, обсуждение результатов, участие в написании статьи.
2. **Khalisov M.M.**, Ankudinov A.V., Penniyaynen V.A., Dobrota D., Krylov B.V. Application of atomic force microscopy for investigation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase

signal-transducing function // *Acta Physiologica Hungarica*, V. 102, N. 2, 2015. P. 125-130. 0,75 п.л. / 0,15 п.л. Вклад Халисова М.М.: проведение измерений и анализ экспериментальных данных, обсуждение результатов, участие в написании статьи.

3. **Халисов М.М.**, Тимощук К.И., Анкудинов А.В., Тимошенко Т.Е. Атомно-силовая микроскопия набухания и упрочнения закрепленных на подложке интактных эритроцитов // *Журнал технической физики*, Т. 87, №2, 2017. С. 282-285. 0,5 п.л. / 0,125 п.л. Вклад Халисова М.М.: идея статьи, проведение измерений и анализ экспериментальных данных, обсуждение результатов, участие в написании статьи.
4. **Халисов М.М.**, Пеннийнен В.А., Есикова Н.А., Анкудинов А.В., Крылов Б.В. Особенности рецептор- и трансдуктор-опосредованной активации внутриклеточных сигнальных каскадов в сенсорном нейроне, выявленные с помощью метода атомно-силовой микроскопии // *Письма в журнал технической физики*, Т. 43, №1, 2017. С. 89-94. 0,375 п.л. / 0,075 п.л. Вклад Халисова М.М.: идея статьи, проведение измерений и анализ экспериментальных данных, обсуждение результатов, участие в написании статьи.
5. **Халисов М.М.**, Анкудинов А.В., Пеннийнен В.А., Няпшаев И.А., Кипенко А.В., Тимощук К.И., Подзорова С.А., Крылов Б.В. Атомно-силовая микроскопия устройства поверхностных слоев интактных фибробластов // *Письма в журнал технической физики*, Т. 43, №4, 2017. С. 56-63. 0,5 п.л. / 0,062 п.л. Вклад Халисова М.М.: проведение измерений и анализ экспериментальных данных, обсуждение результатов, участие в написании статьи.
6. **Khalisov M.M.**, Ankudinov A.V., Penniyaynen V.A., Timoshenko T.E., Timoshchuk K.I., Samsonov M.V., Shirinsky V.P. Peculiarities of living cell response to the external stimuli revealed via quasistatic mode of atomic force microscopy // *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, V. 256, N. 1, 2017. P. 012010-1–6. 0,5 п.л. / 0,071 п.л. Вклад Халисова М.М.: идея статьи, проведение измерений и анализ экспериментальных данных, обсуждение результатов, участие в написании статьи.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

**1.Бауэр Светланы Михайловны**, доктора физико-математических наук, профессора, Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», математико-механический факультет, профессора кафедры теоретической и прикладной механики. Замечания:

- Во введении диссертации отсутствуют сведения об апробации результатов работы, хотя в автореферате они содержатся.
- Диссертация написана хорошим языком, но автор использует много специальных терминов, что неизбежно в такой работе. Однако пояснения терминов не всегда приводятся.
- В главе 3 представлен статистический анализ полученных значений эффективного модуля Юнга по поверхности фибробластов. Представлены средние значения и соответствующие медианы. Было бы интересно привести также данные рассеивания полученных значений (как это сделано при представлении экспериментальных данных в главе 6).
- Есть вопросы по оформлению диссертации. Например, на рисунке 5.4 не хватает обозначений (а), (б); не на всех рисунках единообразно указаны их размеры; гистограммы эффективного модуля Юнга в разных главах оформлены неодинаково. В тексте встречаются опечатки, хотя их и немного.

**2. Лебедева Дмитрия Витальевича**, кандидата физико-математических наук, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» Федерального государственного бюджетного учреждения «Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова», отделение молекулярной и радиационной биофизики, исполняющий обязанности заместителя руководителя. Замечания:

- Отсутствует единый раздел с описанием используемых методов статистического анализа и представления результатов, хотя они и упоминаются в тексте и понятны из контекста работы.
- Поскольку клетки являются многокомпонентными неоднородными объектами, непонятно, насколько изначально обосновано применение моделей индентации однородных материалов, в частности модели Герца, для анализа

результатов измерений на клетках. Рассматриваемые в работе модели дают различные зависимости силы от глубины индентации (от линейной до квадратичной), однако автор не приводит данные о том, какая из зависимостей лучше всего соответствует наблюдаемой в эксперименте.

- Приведенные в диссертации результаты основаны на данных, полученных только методами атомно-силовой и оптической микроскопии, что делает обсуждение биологического аспекта результатов измерений несколько спекулятивным.

**3.Терукова Евгения Ивановича**, доктора технических наук, профессора, заместителя генерального директора по науке НТЦ тонкопленочных технологий в энергетике при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Физико-техническом институте им. А.Ф. Иоффе.

Замечания:

1. Не мешало бы и в тексте автореферата привести обоснование использования термина «эффективный модуль Юнга».

2. В разделе, посвященном изучению сенсорных нейронов, возможно, полезна была бы информация об исследованиях других авторов, раскрывающих влияние типа подложки на механические характеристики сенсорных нейронов.

3. На рисунках встречается мелкий шрифт.

**4. Толстихиной Аллы Леонидовны**, доктора физико-математических наук, и.о. заведующего Сектором сканирующей зондовой микроскопии Института кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.

Замечания:

1. При формулировании актуальности поставленных задач желательно было опереться на существующие в данный момент знания в этой области, например, на книги по применению АСМ в биологии («Atomic force microscopy in cell biology» Ed. Bhanu P. Jena, J.K. Heinrich Horber, 2002. Haugstad G. «Atomic force microscopy». 2012...).

2. Автор допускает стилистические ошибки, затемняющие смысл текста. Например, на стр. 3 непонятен смысл второго абзаца. Какие методики АСМ автор считает рутинными и почему «их становление тормозит недостаточное понимание...»?

3. Часто не хватает запятых, особенно перед словом «соответственно».

**5. Вишнякова Николая Владимировича**, кандидата технических наук, директора Регионального центра зондовой микроскопии коллективного пользования Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Рязанский государственный радиотехнический университет».

Замечание:

– при описании содержания глав 4-6 упор сделан на экспериментальные результаты исследования клеточных биообъектов, хотя было бы важным раскрыть особенности методов и методик АСМ для измерения характеристик этих объектов.

**6. Возняковского Александра Петровича**, доктора химических наук, заведующего сектором ФГУП «Ордена Ленина и ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательского института синтетического каучука имени академика С.В. Лебедева».

Замечания:

1. На стр. 14 и 15 при указании концентраций добавляемых к клеткам веществ лучше было соблюдать единый стиль – использовать либо приставки, либо 10 в степени.

2. Для пояснения данных на рисунке 9 было бы полезно привести характеристики моделей зондов, использованных для индентирования сенсорных нейронов.

**7. Филатова Дмитрия Олеговича**, доктора физико-математических наук, доцента, техника Научно-образовательного центра «Физика твердотельных наноструктур» ФГАОУ ВО «Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского».

Замечание:

На странице 10 приведено по 2 значения эффективного модуля Юнга фибробластов при измерении острыми и субмикронными сферическими зондами, однако, не пояснено, как получены эти значения. Автор по-разному обозначает типы зондов в тексте автореферата и на рисунке 9.

**8. Чубинского-Надеждина Владислава Игоревича**, кандидата биологических наук, научного сотрудника лаборатории ионных механизмов клеточной сигнализации ФГБУН Института цитологии РАН.

Замечание:

В тексте присутствуют опечатки: например, на странице 15 вместо «нокодзол» написано «нокадозол». Хотя сокращение СЭМ является общеизвестным,

тем не менее, его стоило расшифровать. Также следует обратить внимание на оформление иллюстраций – шрифт на рисунках не везде одинаковый по размеру. Кроме того, описание рисунка 8 недостаточно полное, оно не дает информацию о фрагментах рисунка в правом нижнем углу на а,б.

**9. Шура Владимира Яковлевича**, доктора физико-математических наук, профессора, главного научного сотрудника Научно-исследовательского института физики и прикладной математики Института Естественных наук и Математики Уральского федерального университета (УрФУ), директора Уральского центра коллективного пользования «Современные нанотехнологии» УрФУ.

Без замечаний.

**10. Ширинского Владимира Павловича**, доктора биологических наук, профессора, главного научного сотрудника, и.о. руководителя лаборатории клеточной подвижности Института экспериментальной кардиологии Национального медицинского исследовательского центра кардиологии Минздрава России.

Без замечаний.

**Все отзывы, как содержащие, так и не содержащие замечаний, положительны.**

Выбор ведущей организации и официальных оппонентов обосновывается большим опытом работы в областях оптической и сканирующей зондовой микроскопии, исследований белковых и пептидных комплексов с высоким пространственным разрешением, теоретической механики, моделирования структурных и функциональных свойств различных биологических объектов.

**Диссертационный совет отмечает**, что на основании выполненных соискателем исследований:

**разработана** апробированная на биологических клетках методика измерения локальных механических характеристик неоднородных слоистых образцов, заключающаяся в сопоставлении значений контактной жесткости поверхности, измеренных пирамидальными и сферическими нанозондами при индентировании образца методом атомно-силовой микроскопии в квазистатическом режиме;

**показано**, что для увеличения точности измерений механических характеристик расположенных на твердой подложке нативных биологических клеток необходимо учитывать обнаруженный при АСМ индентировании эритроцитов крыс



скачкообразный рост эффективного модуля упругости наружных слоев клеток, сопровождающийся изменением их формы;

**доказано**, что предложенный метод АСМ индентирования, примененный на периферийных слоях нативных микрососудистых эндотелиальных клеток мышей, подвергнутых воздействию ингибиторов полимеризации белков цитоскелета, обеспечивает достоверную регистрацию изменений механических характеристик тонкого биоматериала при глубине деформации, сопоставимой с толщиной образца;

**получены** экспериментальные доказательства чувствительности метода АСМ при временах индентирования  $\sim 10^{-3}$  сек к упрочнению (увеличению эффективного модуля Юнга) нативных сенсорных нейронов, размещенных на различных подложках, что позволяет детектировать действие фармакологического вещества на биологические клетки.

**Теоретическая значимость исследования** обоснована тем, что применительно к проблематике диссертации результативно, с **получением обладающих новизной результатов**:

**использованы** метод АСМ при временах индентирования  $\sim 10^{-3}$  сек (в квазистатическом режиме) для измерений эффективного модуля Юнга биообъекта в виде нативной животной клетки и модели контактной механики для анализа результатов измерений;

**выявлено**, что значения эффективного модуля Юнга биообъекта, измеренные методом АСМ индентирования, зависят как от формы используемых наноинденторов, так и от примененных моделей индентирования сплошной упругой среды, в частности, в случае фибробластов обнаружено пятикратное расхождение значений эффективного модуля Юнга;

**представлены** доказательства важности измерений контактной жесткости – более адекватного, чем эффективный модуль Юнга, параметра для описания механических свойств таких биообъектов как нативные фибробласты;

**доказано**, что такой механический параметр, как средний эффективный модуль Юнга, измеренный методом АСМ индентирования в квазистатическом режиме, может являться количественным индикатором состояния биообъекта, включая нативные эритроциты, эндотелиальные клетки, сенсорные нейроны.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики** подтверждается тем, что:

- предложенная АСМ методика измерений механических свойств неоднородных многослойных образцов апробирована на нативных фибробластах и позволяет исследовать неоднородности в устройстве наружных слоев различных материалов, включая биообъекты с предполагаемым значением модуля Юнга в диапазоне до нескольких мегапаскалей;
- на примере АСМ измерений механических параметров эритроцитов обоснована необходимость проведения исследования механических свойств нативных биологических клеток до их набухания и обесцвечивания;
- проведенные АСМ измерения эффективного модуля Юнга достоверны даже при толщине образца, близкой к глубине индентирования, что позволяет определять вклад различных белков в регуляции механических свойств биообъектов, включая эндотелиоциты.

**Достоверность** результатов исследования обеспечивается воспроизводимостью экспериментов, использованием современных представлений о взаимодействии АСМ зонда с нативными животными клетками, совмещением взаимодополняющих методов исследования - АСМ и оптической микроскопии, качественным совпадением экспериментальных данных с независимыми литературными источниками, и апробацией основных результатов работы на конференциях.

**Личный вклад** соискателя состоит в получении всех основных результатов диссертации: составлении литературного обзора, проведении экспериментов, обработке данных и непосредственном участии в анализе экспериментов. Подготовка публикаций по теме диссертации проводилась совместно с научным руководителем и другими соавторами.

На заседании 27.12.2018 г. диссертационный совет принял решение присудить Халисову Максиму Миндигалеевичу ученую степень кандидата технических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 17 докторов наук, участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 0 человек, проголосовали: за - 16, против - нет, недействительных бюллетеней - 1.

Председатель  
диссертационного совета  
д.т.н., проф.

Курочкин В.Е.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
д.ф.-м.н.

Буляница А.Л.

