

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора

департамента науки

СПбГЭТУ «ЛЭТИ»

Гайворонский Д.В.

«6» декабря 2018 г.



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.

Актуальность темы

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 эффективного 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 полилизиновой 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-кратному увеличению их эффективного модуля Юнга.

4. Доказано, что близость твердой подложки не препятствует АСМ детектированию в квазистатическом режиме изменений эффективного модуля Юнга цитоскелета дистальных областей микрососудистого эндотелия мышинных 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.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, шести глав, заключения, списка литературы. Диссертация изложена на 143 страницах текста, включая 58 рисунков, 2 таблицы, список литературы из 246 источников.

Во **введении** изложены актуальность темы диссертации, цель и задачи, научная новизна и практическая значимость работы, приведены выносимые на защиту положения, обоснованы достоверность и надежность результатов работы.

Первая глава представляет собой литературный обзор по теме диссертационной работы. В ней рассмотрены различные методы изучения механических характеристик животных клеток. Описан основной экспериментальный метод данной работы, примененный для изучения нативных клеток животных – атомно-силовая микроскопия (АСМ), а также основные режимы работы данного метода. Перечислены основные достоинства и недостатки АСМ при исследовании нативных животных клеток.

Вторая глава – методическая, посвящена подробному описанию основной экспериментальной установки, атомно-силового микроскопа Bruker BioScope Catalyst, и методики исследования животных клеток с помощью квазистатического режима работы зондового микроскопа PeakForce QNM.

Кроме того, уделено внимание особенностям проведения экспериментов для эффективного исследования изучаемых в работе объектов.

В **третьей главе** предложена методика, позволившая установить, что наружный слой нативного фибробласта куриного эмбриона, культивированного на коллагеновой подложке, жестче более глубоких слоев клетки. Она заключалась в индентировании нативных фибробластов зондами двух типов: стандартными острыми и специальными, субмикронными сферическими.

В **четвертой главе** приведены результаты исследования нативных (нефиксированных) крысиных эритроцитов на полилизинной подложке. Было показано, что со временем свойства этих клеток меняются: при наблюдении в оптическом микроскопе эритроциты обесцвечиваются, а также, по данным АСМ, их высота и эффективный модуль Юнга увеличиваются. Такое изменение свойств эритроцитов связано с сильной адгезией клеток к полилизину.

Пятая глава представляет результаты изучения эндотелиальных клеток (ЭК) мышей. Продемонстрировано, что несмотря на небольшую толщину периферии ЭК, соизмеримую с глубиной индентирования зондом АСМ, удастся регистрировать изменения механических свойств этих клеток под действием веществ, специфически действующих на различные основные компоненты цитоскелета. Это открывает доступ к изучению вкладов различных белковых молекул в механические характеристики ЭК.

В **шестой главе** основным объектом изучения были сенсорные нейроны куриных эмбрионов. Данные, полученные в результате исследования действия веществ с анальгетическим эффектом – убаина и коеновой кислоты – на эти клетки, свидетельствовали о том, что вещества производили разный эффект. Убаин вызывал рост эффективного модуля Юнга сенсорных нейронов, в то время как коеновая кислота не влияла на данный параметр клеток. Важным результатом главы также является показанная зависимость измеренного эффективного модуля Юнга сенсорных нейронов от типа использованного зондового датчика.

В **заключении** диссертации приведены основные результаты и выводы работы.

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 эффективного модуля Юнга клеток и вносить дополнительную ошибку в данные.

Показанная возможность детектирования с помощью АСМ изменений эффективного 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 эффективного модуля Юнга сенсорных нейронов куриных эмбрионов при измерении в квазистатическом режиме АСМ наглядно проявляет важность сохранения неизменной геометрии кантилеверов, выбранных для проведения статистических измерений эффективного 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, НТ-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. 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, нелишним был бы перевод англоязычных обозначений на некоторых рисунках на русский язык.
5. Тексты диссертации и автореферата содержат опечатки. Так, в диссертации на стр. 25 в последнем абзаце вместо «электро-» написано «элетро-»; также ошибки допущены в словах «пъезосканер» (в подписи к рисунку 2.2 на стр. 41), «индентирование» (во втором абзаце на стр. 50), «ингибирование» (на стр. 117). В предпоследней строке таблицы 1 на стр. 31 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».

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 пункте 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 (ред. от 01.10.2018), 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 наноэлектроники Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)», Протокол №8 от 6 ноября 2018 года.

Доктор физико-математических науки, заместитель заведующего кафедрой микро- и наноэлектроники по научной работе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)».
Адрес: 197376, СПб, ул. Профессора Попова, 5
телефон кафедры: 234-31-64
e-mail: vamosnikov@mail.ru

Мошников Вячеслав Алексеевич

Кандидат физико-математических наук, доцент кафедры микро- и наноэлектроники Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)».
Адрес: 197376, СПб, ул. Профессора Попова, 5
телефон кафедры: 234-31-64
e-mail: oaaleksandrova@gmail.com

Александрова Ольга Анатольевна