



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
КАРДИОЛОГИИ**

(ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России)

ОГРН 1037739144640 ИНН 7731243467
121552, г.Москва, ул. 3-я Черепковская, д.15А
Тел.: +7(499)140-93-36, факс: +7(495)414-60-31
www.cardioweb.ru, e-mail: info@cardioweb.ru

Исх.№ _____ от _____
на № _____ от _____

Ученому секретарю

диссертационного совета Д 002.034.01
доктору физико-математических наук

А.Л. Булянице

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации М.М. Халисова «Применение атомно-силовой микроскопии для детектирования отклика нативных клеток на внешние воздействия», представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 01.04.01 – приборы и методы экспериментальной физики.

Измерение механических свойств живых клеток эукариот чрезвычайно важно для решения многих биологических задач, но прогресс в этой области практически отсутствовал в связи со значительными сложностями измерения жесткости таких нежных объектов как клетки. Попытки напрямую измерить механические свойства клеток начали предпринимать с относительным успехом во второй половине XX века, надавливая на клетки микропипеткой или засасывая цитоплазму клетки в капилляр. Такие подходы не могли претендовать на высокую точность, пространственное и временное разрешение и фактически были прологом к применению метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) для изучения клеточной механики. Однако с момента изобретения АСМ и до его применения в исследованиях жесткости живых клеточных объектов тоже прошло не одно десятилетие, и сегодня метод АСМ требует оптимизации и валидации для надежной работы с живыми объектами. Диссертационная работа М.М. Халисова как раз и посвящена этой актуальной проблеме.

Метод АСМ является основным в этой работе. Используя зондовый микроскоп Bruker BioScope Catalyst и квазистатический режим PeakForce QNM, автор выполнил большое количество измерений на различных клеточных объектах, среди которых фибробласты, эритроциты, эндотелиальные клетки и нейроны. Автор измерял жесткость этих различных по происхождению, морфологии и физиологии клеток, используя зонды различной кривизны: острые с нанометровым кончиком иглы и скругленные, имеющие

на конце иглы шарик субмикронного размера. Данные, полученные разными типами зондов, были сравнены между собой. Также сравнивались однотипные зонды различных производителей.

Диссертант продемонстрировал неоднородность механических свойств цитоплазмы фибробластов, у которых выявлялся жесткий корковый слой, скрывающий более мягкую внутреннюю область. АСМ изучение этих клеток показало, что применение к ним стандартных моделей для расчета модуля Юнга дают различия в 5-8 раз, в то время как расчет средних локальных жесткостей давал практически совпадающие результаты для острого и сферического инденторов. Эти результаты показали, что, по крайней мере, для некоторых типов клеток расчет модуля Юнга не вполне корректен в силу несовершенства применяемых моделей, основанных на допущении изотропных упругих свойств материала по направлению деформации. Для живых клеток это не всегда так.

Автор показал, как меняется жесткость и форма эритроцитов, фиксированных на полилизине, и провел исследования зависимости жесткости эндотелиальных клеток от состояния основных компонентов их цитоскелета. Эндотелий отличается от других изученных клеток заметно более тонкой краевой цитоплазмой, имеющей толщину порядка 100-200 нм. Учитывая вертикальный ход индентора АСМ около 100 нм, возникала проблема учета влияния жесткой подложки при измерении жесткости самой цитоплазмы. Диссертанту удалось показать, что даже в таких случаях возможно проводить измерения биологического объекта – при разрушении цитоскелетных компонентов эндотелия специфическими ингибиторами (латрункулин В, нокодазол) удалось наблюдать достоверное двукратное снижение жесткости цитоплазмы. В то же время при обработке сенсорных нейронов убаином наблюдалась тенденция к упрочнению их цитоплазмы в области сомы. Интересно, что средние эффективные модули упругости нейронов на коллаген-фибронектиновой и полилизиновой подложках отличались в несколько раз, свидетельствуя о том, что механические свойства живых клеток модулируются в широких пределах и зависят как от внутриклеточных, так и от внеклеточных переменных. Точно также в разы отличались и эффективные модули упругости разных типов клеток, изученных в работе М.М. Халисова. Наконец, автор продемонстрировал, что измерение жесткости нейронов зондами разных производителей дает отличающиеся результаты. Этого можно было ожидать, и автор сделал заключение, что для повышения достоверности измерения эффективного модуля Юнга клеток, как минимум, необходимо использовать зонды одного типа.

Многое из того, что успел изучить и опубликовать в своих работах М.М. Халисов, было сделано впервые. Самое главное достижение его работы, на мой взгляд, это систематическое экспериментальное исследование границ применимости метода контактной АСМ для изучения живых клеток. Полученные М.М. Халисовым результаты, несомненно, послужат ориентиром для будущих исследований в этой области. Кроме того, его наблюдения ставят вопрос о разработке новых методов оценки механических свойств живой клетки, которые должны учитывать анизотропность ее упругих свойств в пространстве и времени.

Полученные диссертантом результаты опубликованы в 6 статьях российских и зарубежных рецензируемых журналах, многократно представлены на научных конференциях и симпозиумах. По результатам работы сделано 6 выводов. Они адекватно отражают полученные данные. Принципиальных замечаний по сути работы при прочтении автореферата не возникло.

В результате ознакомления с авторефератом диссертационной работы М.М. Халисова «Применение атомно-силовой микроскопии для детектирования отклика нативных клеток на внешние воздействия» можно заключить, что по своей

актуальности, новизне, научному и методическому уровню, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов она полностью соответствует п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (ред. от 01.10.2018), а диссертант М.М. Халисов заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата технических наук по специальности 01.04.01 – приборы и методы экспериментальной физики.

Главный научный сотрудник
и.о. руководителя лаборатории клеточной подвижности
Института экспериментальной кардиологии
Национального медицинского исследовательского
центра кардиологии Минздрава России
доктор биологических наук, профессор

Ширинский Владимир Павлович
ул. 3-я Черепковская д. 15а, Москва 121552, Россия
эл. почта: shirinsky@gmail.com
тел.: 8495-414-7246

Подпись д.б.н., профессора В.П. Ширинского заверяю
Ученый секретарь ИЭК НМИЦ кардиологии МЗ РФ

В.П. Ширинский

О.С. Плеханова

05.12.2018

