

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

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 25 декабря 2017 г. №13
о присуждении Халисову Максиму Миндигалеевичу, гражданину Российской Федерации, 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 19.10.2017 г., протокол № 9 диссертационным советом Д 002.034.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института аналитического приборостроения Российской академии наук (ИАП РАН), 190103, Санкт-Петербург, Рижский пр., д.26, приказ 714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель Халисов Максим Миндигалеевич, Гражданство РФ, 1990 года рождения окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования - «Санкт-Петербургский национальный исследовательский Университет информационных технологий, механики и оптики»; работает старшим лаборантом в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук.

Диссертация выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургском национальном исследовательском университете информационных технологий, механики и оптики» (Университете 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:

Васютинский Олег Святославович, доктор физико-математических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук, лаборатория физической газодинамики, главный научный сотрудник;

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.

Оппонент Васютинский Олег Святославович сделал следующие замечания:

1. В Главе 3 диссертации показано, что при зондировании нативных фибробластов сердца куриных эмбрионов измеряемые значения модуля Юнга существенно зависят от формы используемых зондов и делается вывод о том, что механические характеристики нативных фибробластов более адекватно описывать не с помощью модуля Юнга, а с помощью величины контактной жесткости, которая мало менялась в зависимости от формы зонда. Как следует из дискуссии на стр. 80, обнаруженный факт, в основном, обусловлен приблизительно одной и той же величиной деформации фибробласта разными зондами при данной приложенной силе, что вероятно свидетельствует либо о структурной неоднородности исследованных фибробластов (внешние слои существенно менее жесткие, чем внутренние), либо о том, что жесткость клетки, в основном, обусловлена упругими свойствами ее мембраны. Таким образом, сделанный в диссертации вывод о большей адекватности использования контактной жесткости для описания механических характеристик фибробластов, вероятно, носит частный характер и применим только к клеткам с определенной (слоистой) структурой. Необходимо более подробно рассмотреть справедливость сделанного в диссертации вывода для разных типов нативных клеток.
2. В Главе 4 при исследовании эритроцитов с помощью АСМ продемонстрировано, что эритроциты, прикрепленные к подложке с помощью раствора полилизина,

претерпевают определенную эволюцию: они обесцвечиваются, принимают шарообразную форму с одновременным отвердеванием (увеличением модуля Юнга), а затем происходит разрыв плазматической мембраны и лизис клеток. На стр. 107, 109 автором предлагается механизм взаимодействия нативных эритроцитов с полилизиновой подложкой, сопровождающийся набуханием за счет поступления жидкости извне и разрыва мембраны за счет ее перенапряжения. Однако из текста не ясно, каким образом автор установил сам факт увеличения объема обесцвеченных клеток, процедура измерения объема не описана. Кроме того, предложенный механизм лизиса представляется излишне механистичным: неясно, под действием каких причин и каким образом жидкость извне начинает поступать в клетку через неповрежденную мембрану. Представляется возможным, что отвердевание клетки и последующий разрыв мембраны происходят не за счет поступления жидкости извне, а за счет изменений внутриклеточной и мембранной структуры вследствие биохимических реакций, происходящих при отравлении клеток полилизином.

3. При построении моделей изменения механических свойств эндотелиальных клеток под действием ингибиторов компонентов клеточного цитоскелета в Главе 5 на стр. 128 не рассматриваются возможные изменения упругих свойств клеточных мембран, которые играли существенную роль в исследованиях, описанных в других главах диссертации. Необходимо прокомментировать, к каким изменениям моделей может привести учет изменения упругих свойств клеточных мембран.

Оппонент Лебедев Дмитрий Витальевич сделал следующие замечания:

Отсутствует единый раздел с описанием используемых методов статистического анализа и представления результатов, хоть они и упоминаются в тексте и понятны из контекста работы. Также автор не дает определение модуля Юнга в применении к описанию механических свойств клеток, которые являются многокомпонентными, неоднородными объектами. В классическом понимании модуль Юнга применяется для описания свойств однородного материала. По-видимому, в работе речь идет о кажущемся или измеряемом модуле упругости, который в общем случае, разумеется, зависит от способа измерения. В этой связи непонятно, насколько изначально обоснованно 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 данных о том, какая из зависимостей лучше всего соответствует наблюдаемой в эксперименте.

Кроме того, приведенные в диссертации результаты основаны на данных, полученных только методами атомно-силовой и оптической микроскопии, что делает обсуждение биологического аспекта результатов измерений несколько спекулятивным. Так, использование блокаторов механочувствительных катионных каналов и другого трансмембранного транспорта, задействованного в регуляции объема, позволило бы более уверенно говорить о физиологическом значении наблюдаемого изменения морфологии закрепленных на подложке эритроцитов, а оценка изменения содержания соответствующих белков – однозначно связать наблюдаемые изменения модуля Юнга клеток эндотелия именно с изменениями в цитоскелете. В части обсуждения механизма влияния убаина на механические свойства нервных клеток также необходимо учесть вклад множества факторов, на которые влияет ингибирование $3\text{Na}-2\text{K}-\text{ATP}$ азы, начиная от мембранного потенциала клетки и клеточного объема.

Также выражено сомнение относительно защищаемого положения 3 в части «селективное разрушение цитоскелетных структур приводит к уменьшению измеренного модуля Юнга...», поскольку требуется подтвердить факт разрушения на основе проведения эксперимента признанными методами.

Ведущая организация Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)», Санкт-Петербург, в своем положительном заключении, подписанном **Лучинным Виктором Викторовичем**, доктором технических наук, профессором, заведующим кафедрой микро- и нанoeлектроники; **Александровой Ольгой Анатольевной**, кандидатом физико-математических наук, ученым секретарем и доцентом кафедры микро- и нанoeлектроники и утвержденном **Гайворонским Дмитрием Вячеславовичем**, кандидатом технических наук, доцентом, проректором по

научной работе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургского государственного электротехнического университета «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. 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».

Соискатель имеет 24 (двадцать четыре) опубликованные работы, в том числе по теме диссертации 24 (двадцать четыре) работы, в том числе работ, опубликованных в рецензируемых научных изданиях из Перечня ВАК РФ, 5 (пять), а также 19 (девятнадцать) тезисов докладов и материалов конференций.

К наиболее значимым, отражающим основное содержание диссертации, относятся:

1. Анкудинов А.В., **Халисов М.М.**, Пеннийайнен 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. (БАК, WoS, Scopus).
2. **Khalisov M.M.**, Ankudinov A.V., Penniyaynen V.A., Dobrota D., Krylov B.V. Application of atomic force microscopy for investigation of Na⁺,K⁺-ATPase signal-transducing function // Acta Physiologica Hungarica, V. 102, N. 2, 2015. P. 125-130. 0,75 п.л. / 0,15 п.л. (БАК, WoS, Scopus).
3. **Халисов М.М.**, Тимошук 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. (БАК, WoS, Scopus).
4. **Халисов М.М.**, Пеннийайнен 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. (БАК, WoS, Scopus).
5. **Халисов М.М.**, Анкудинов А.В., Пеннийайнен В.А., Няпшаев И.А., Кипенко А.В., Тимошук 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. (БАК, WoS, Scopus).

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Агеева Олега Алексеевича, члена-корреспондента РАН, доктора технических наук, профессора, профессора кафедры нанотехнологий и микросистемной техники ФГАОУ ВО «Южного федерального университета»; **Ильиной Марии Владимировны**, кандидата технических наук, доцента кафедры нанотехнологий и микросистемной техники ФГАОУ ВО «Южного федерального университета».

Замечания:

- 1) структура и оформление автореферата вызывают некоторые вопросы. Так из текста автореферата остается неясно: чем отличаются значения модуля Юнга в скобках и без скобок (стр. 10, первый абзац); с какой целью рассчитывается

отношение модулей Юнга по Снеддону и ДМТ (формула (6)); зачем приведены формулы (3) и (4), если последующие вычисления используют только более простые формулы (1) и (2);

- 2) не смотря на то, что цель работы заключается в повышении точности детектирования механических характеристик нативных объектов, погрешность измерения модуля Юнга нативных объектов на основе описанных методик АСМ доходит до 100% (стр. 10, 14, 15)
- 3) на стр. 8 автореферата указано, что «в главе 3 предложена методика, позволяющая установить, что наружный слой нативного фибробласта куриного эмбриона, культивированного на коллагеновой подложке, жестче более глубоких слоев клетки». Однако из текста автореферата остается неясным, в чем заключается предложенная методика. Кроме того отсутствуют значения жесткости наружных и глубоких слоев клетки (на стр. 10 приведены только значения средней локальной жесткости), что не дает возможность сделать вывод, что наружные слои более жесткие;
- 4) в пункте 1 научной новизны (стр. 4) указано, что «жесткость биомеханической системы «зонд АСМ – нативный объект – коллагеновая подложка» не зависит от размеров вершины зонда, если радиус ее кривизны порядка или менее 100 нм». При этом в автореферате приведены исследования зондами радиусом 12 и 325 нм, что явно недостаточно для обоснования данного заключения;
- 5) многие выводы носят общий характер и не всегда обоснованы. Например, вывод о том, что «предпочтение следует отдать кантилеверам с длинным зондом и умеренно острым кончиком» (пункт 4 практической значимости), требует уточняющих количественных характеристик. Вывод 5 работы на стр. 17 основывается на результатах измерения модуля Юнга, имеющих 90% погрешность, и противоречат статистической оценке данных экспериментальных исследований (стр. 15).

2. 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 Российской академии наук.

Замечания:

На рисунках присутствует мелкий шрифт. Допущена ошибка в нумерации рисунков (два рисунка под номером 5). В отношении к результатам по сенсорным нейронам, возможно, полезна была бы информация об исследованиях других авторов, раскрывающих влияние типа подложки на измеряемые значения модуля Юнга.

3. 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, а стр.3 непонятен смысл второго абзаца с.3. Какие методики АСМ автор считает рутинными и почему «их становление тормозит недостаточное понимание...»?
3. Часто не хватает запятых, особенно перед словом соответственно.

4. 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».

Замечания:

Автореферат диссертации не лишен некоторых недостатков. В частности, допущена ошибка в нумерации рисунков: на страницах 12 и 13 друг за другом следуют два рисунка под номером 5. В результате, нумерация рисунков с 6-го по 9-ый оказывается неверной. На рисунке под номером 6 не хватает обозначений «а» и «б». На странице 10 приведено по 2 значения модуля Юнга фибробластов при измерении острыми и субмикронными сферическими зондами, однако, не пояснено, как получены эти значения.

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

Замечания:

Автореферат содержит ряд недостатков. В тексте присутствуют опечатки: например, на странице 14 вместо «нокодазол» 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.

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

Замечания:

1. На стр. 13 и 14 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 8 было бы полезно привести характеристики моделей зондов, использованных для индентирования сенсорных нейронов.

7. 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.

8. Ширинского Владимира Павловича, доктора биологических наук, профессора, руководителя лаборатории клеточной подвижности Института экспериментальной кардиологии Национального медицинского исследовательского центра кардиологии Минздрава России.

Без замечаний.

Выбор ведущей организации и официальных оппонентов обосновывается большим опытом работы в области сканирующей зондовой микроскопии, а также флуоресцентных и голографических исследований клеток, анализа микроскопических изображений, моделирования структурных и функциональных свойств различных компонентов клетки.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана экспериментальная методика, позволившая выявить неоднородности в механических характеристиках наружных слоев нативных фибробластов куриных эмбрионов на коллагеновой подложке. Она заключается в индентировании клеток в квазистатическом режиме АСМ, использовании субмикронных зондов с разной геометрией кончика (острых и сферических) и анализе величины контактной жесткости для характеристики механических характеристик фибробластов;

показана необходимость учитывать эффект резкого изменения формы и эффективного модуля упругости нефиксированных эритроцитов крыс на полилизиновой подложке в АСМ измерениях этих клеток;

доказана возможность достоверной регистрации изменений механических характеристик тонких периферийных (дистальных) областей нативных микрососудистых эндотелиальных клеток мышей при обработке клеток ингибиторами компонентов цитоскелета;

получены экспериментальные свидетельства, что метод АСМ при миллисекундных временах индентирования способен регистрировать упрочнение нативных сенсорных нейронов куриных эмбрионов на фибронектине или полилизине под действием фармакологического вещества.

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

использованы метод АСМ при миллисекундных временах индентирования (в квазистатическом режиме) и модели контактной механики для анализа полученных результатов:

выявлено существенное количественное расхождение оценок эффективного модуля Юнга фибробластов при использовании различных моделей сплошной упругой среды;

представлены аргументы в пользу контактной жесткости, как более адекватного, по сравнению с модулем Юнга, параметра описания механических характеристик клеток;

обоснована возможность и перспективность использования представленных результатов для моделирования механических и геометрических характеристик нативных животных клеток;

доказана прогностическая ценность результатов при решении задач по выявлению механических свойств клеток различных типов.

Значение полученных соискателем результатов исследования для **практики** подтверждается следующим:

предложенная АСМ методика изучения механических свойств нативных фибробластов позволяет исследовать неоднородности в устройстве наружных слоев других клеток;

при исследовании в АСМ механических свойств нефиксированных эритроцитов обоснована необходимость проведения измерений до обесцвечивания иммобилизованных на полилизине клеток;

для решения актуальной задачи исследования роли различных белков в регуляции механических свойств эндотелиоцитов был предложен и верифицирован простой способ регистрации механических характеристик нативных микрососудистых эндотелиальных клеток, позволяющий детектировать изменения модуля Юнга эндотелиоцитов даже в областях с малой толщиной клетки на подложке.

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 изучении научной литературы по теме исследования и составлении литературного обзора, получении всех основных результатов диссертации – 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 25.12.2017 диссертационный совет принял решение присудить Халисову М.М. ученую степень кандидата технических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 16 докторов наук, участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 0 человек, проголосовали: за - 15, против - нет, недействительных бюллетеней - 1.

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



Куручкин В.Е.

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



Буляница А.Л.

