

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе

Университета ИТМО

д.т.н., профессор



В.О. Никифоров

«29» июня 2017 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Санкт-Петербургского национального исследовательского университета информационных технологий, механики и оптики (Университет ИТМО) Министерства образования и науки Российской Федерации

Диссертация «Проявление реакции клеток животных на внешние воздействия с помощью атомно-силовой микроскопии» выполнена на кафедре нанофотоники и метаматериалов.

В период подготовки диссертации соискатель Халисов Максим Миндигалеевич работал в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, лаборатория физиологии возбудимых мембран, старший лаборант.

В 2013 г. окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий механики и оптики» (Университет ИТМО) Министерства образования и науки Российской Федерации по направлению 200100 Приборостроение.

В настоящее время является аспирантом Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий механики и оптики» (Университет ИТМО) Министерства образования и науки Российской Федерации, кафедра нанофотоники и метаматериалов по специальности 05.11.01 Приборы и методы измерения (измерения механических величин).

Справка об обучении №23/2017, выдана в 2017 г. Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий механики и оптики» (Университет ИТМО) Министерства образования и науки Российской Федерации.

Научный руководитель – Анкудинов Александр Витальевич, д.ф.-м.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физико-технический институт имени А. Ф. Иоффе Российской академии наук, лаборатория физико-химических свойств полупроводников, старший научный сотрудник; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий механики и оптики» (Университет ИТМО) Министерства образования и науки Российской Федерации, кафедра нанофотоники и метаматериалов, доцент.

По итогам рассмотрения принято следующее заключение:

1. Личное участие соискателя ученой степени в получении результатов, изложенных в диссертации.

Личный вклад автора заключается в анализе литературных источников по теме диссертации, отработке методик измерения геометрических и механических характеристик живых клеток в физиологически адекватных условиях с помощью атомно-силового микроскопа, проведении экспериментов с клетками на атомно-силовом микроскопе, обработке экспериментальных данных.

Основные представленные в диссертации оригинальные экспериментальные результаты получены автором лично.

Анализ экспериментальных и теоретических результатов и подготовка публикаций проводились совместно с научным руководителем и другими соавторами.

2. Степень достоверности результатов проведенных соискателем ученой степени исследований.

Достоверность результатов подтверждена многократно воспроизводимыми экспериментами, продемонстрированным соответствием данных измерений и примененных для их описания аналитических моделей, согласием полученных экспериментальных результатов с современными знаниями об устройстве живых клеток эукариот. Она обусловлена совместным использованием взаимодополняющих методов сканирующей зондовой и оптической микроскопии, а также современных теоретических представлений о взаимодействии зонда сканирующего зондового микроскопа с мягкими и вязкими объектами, помещенными в вязкую среду.

3. Новизна и практическая значимость.

Научная новизна

1. Обнаружено, что жесткость биомеханической системы: «зонд атомно-силового микроскопа (АСМ) – нативный объект (фибробласт куриного эмбриона в жидкой питательной среде) – коллагеновая подложка» не зависит от размеров вершины зонда, если радиус ее кривизны порядка или менее 100 нм, а время индентирования составляет $\sim 10^{-3}$ с. Это также показывает, что, варьируя радиус кривизны вершины АСМ зонда в диапазоне от единиц до сотен нанометров, можно проявить в устройстве интактных фибробластов ткани сердца куриных эмбрионов более жесткую, по сравнению с внутренностью, внешнюю оболочку. Результат показывает новую и достаточно универсальную возможность для изучения устройства внешних слоев нативных клеток методом атомно-силовой микроскопии.

2. При исследовании с помощью АСМ в режиме количественной наномеханики модуля Юнга нативных клеток необходимо учитывать дополнительное натяжение плазматической мембраны, вызванное контактом с подложкой. Обнаружено, что у интактных крысиных эритроцитов на полилизинной подложке эффект, нарушая целостности объекта, приводит, как минимум, к 3-х кратному

увеличению их модуля Юнга.

3. Продемонстрировано, что метод атомно-силовой микроскопии позволяет при миллисекундных временах индентирования измерять изменения модуля Юнга клеток, контактирующих как с полилизинном, так и с фибронектином, вызванные фармакологическим веществом. Действие убаина на живые сенсорные нейроны куриных эмбрионов приводит к увеличению твердости сомы этих клеток в 1,5 раза. Показано также, что коленовая кислота, как и убаин, не модифицирует морфологию клеток и, в отличие от последнего, не меняет их твердости.

4. Доказано, что близость твердой подложки не влияет на детектирование методом атомно-силовой микроскопии изменений модуля Юнга цитоскелета, возникающих под действием специфических ингибиторов. При индентировании в квазистатическом режиме АСМ дистальных областей микрососудистого эндотелия мышинных легких толщиной ~100 нм наблюдается уменьшение модуля Юнга, вызванное ингибиторами компонентов цитоскелета (тубулина, актина, миозина), даже при индентации, сравнимой с толщиной образца.

Практическая значимость

1. Механические свойства интактных фибробластов сердечной ткани куриных эмбрионов более точно и достоверно характеризует контактная жесткость, чем модуль Юнга, вычисленный по моделям Снеддона и ДМТ для стандартных острых и субмикронных сферических зондов соответственно.

2. Исследования механических свойств нефиксированных эритроцитов крыс показали, что необходимая для АСМ измерений иммобилизация этих клеток на полилизине может приводить к существенной зависимости измеряемых значений модуля Юнга от времени. Эффект важно учитывать в разработках по диагностике клеток крови в АСМ.

3. При измерении в квазистатическом режиме АСМ модуля Юнга сенсорных нейронов куриных эмбрионов стандартными острыми зондами с различными характеристиками, обнаружено существенное расхождение средних значений данного параметра. Это проявляет важность сохранения неизменной геометрии зондового датчика при накоплении статистических данных измерений модуля Юнга клеток выбранного вида. Предпочтение следует отдать кантилеверам с длинным острием и умеренно острым кончиком, с радиусом кривизны несколько десятков нанометров.

4. Проявление действия веществ-ингибиторов цитоскелета в виде снижения модуля Юнга тонких областей микрососудистого эндотелия мышинных легких необходимо принимать во внимание при исследовании методом атомно-силовой микроскопии роли различных белков в регуляции механических свойств эндотелиальных клеток.

4. Ценность научных работ соискателя ученой степени.

Соискатель представил важные технические результаты по особенностям применения атомно-силовой микроскопии для изучения реакции клеток животных на внешние воздействия. В его работах представлен внушительный экспериментальный материал, на базе которого рассматриваются вопросы о

влиянии на определяемые значения модуля Юнга клеток таких методических факторов, как геометрическая форма АСМ зонда и радиус кривизны его кончика, химический состав подложки, на которой находятся клетки. Реализована сравнительно простая практическая методика для проверки соответствия данных индентационных измерений и моделей контактного взаимодействия, применяемых при вычислении модуля Юнга. В качестве более универсальных параметров для количественного анализа механических свойств нативных клеток предлагаются контактная жесткость, либо деформация. В целом, работа способствует повышению точности, информативности, снижению инвазивности АСМ исследований механических характеристик интактных клеток животных.

Проведенные автором эксперименты способствуют развитию методик исследования с помощью АСМ реакции клеток животных на внешние воздействия. Результаты работы представляют ценность для применения АСМ при изучении нативных клеток в физиологическом и патологических состояниях, и при проявлении действия на клетки различных физико-химических стимулов.

Диссертация соответствует научной специальности: 01.04.01 «Приборы и методы экспериментальной физики», а также требованиям, установленным п. 14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (ред. от 02.08.2016).

5. Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем.

5.1. Научные издания, входящие в международные реферативные базы данных и системы цитирования.

1. Ankudinov A.V., Khalisov M.M., Penniyaynen V.A., Podzorova S.A., Krylov B.V. Application of atomic force microscopy for studying intracellular signalization in neurons // *Technical Physics*, V. 60, N. 10, 2015. P. 1540-1544. 0,625 п.л. / 0,125 п.л.
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.
3. Khalisov M.M., Timoshchuk K.I., Ankudinov A.V., Timoshenko T.E. Atomic Force Microscopy of Swelling and Hardening of Intact Erythrocytes Fixed on Substrate // *Technical Physics*, V. 62, N. 2, 2017. P. 310-313. 0,5 п.л. / 0,125 п.л.
4. Khalisov M.M., Penniyaynen V.A., Esikova N.A., Ankudinov A.V., Krylov B.V. Characteristics of Receptor- and Transducer-Coupled Activation of the Intracellular Signalling in Sensory Neuron Revealed by Atomic Force Microscopy // *Technical Physics Letters*, V. 43, N. 1, 2017. P. 85-87. 0,375 п.л. / 0,075 п.л.
5. Khalisov M.M., Ankudinov A.V., Penniyaynen V.A., Nyapshaev I.A., Kipenko A.V., Timoshchuk K.I., Podzorova S.A., Krylov B.V. An Atomic-Force-Microscopy Study of the Structure of Surface Layers of Intact Fibroblasts // *Technical Physics Letters*, V. 43, N. 2, 2017. P. 209-212. 0,5 п.л. / 0,062 п.л.

5.2. Научные издания, входящие в перечень российских рецензируемых журналов.

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.
2. 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.
3. Халисов М.М., Пенниайнен 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.
4. Халисов М.М., Анкудинов А.В., Пенниайнен 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.

5.3. Публикации, которые приравниваются к рецензируемым научным изданиям.

Нет.

5.4. Публикации в иных изданиях.

1. Тимошенко Т.Е., Халисов М.М., Анкудинов А.В. Исследование структурно-механических свойств эритроцитов при нормо- и гипоксии средствами атомно-силовой микроскопии // Сборник тезисов Всероссийской конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга», С.-Петербург-Колтуши, 24-26 июня 2014 г. С. 136.
2. Халисов М.М., Анкудинов А.В., Тимошенко Т.Е., Пенниайнен В.А. Исследование геометрии и упругости живых клеток в режиме атомно-силовой микроскопии PeakForce QNM // Сборник тезисов IX Международной конференции «Аморфные и микрокристаллические полупроводники», Санкт-Петербург, 7-10 июля 2014 г. С. 375-376.
3. Халисов М.М., Анкудинов А.В., Пенниайнен В.А. Изучение сенсорных нейронов с помощью режима PeakForce QNM атомно-силовой микроскопии // Сборник статей седьмой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», Санкт-Петербург, 20-21 ноября 2014 г. С. 106-112.
4. Халисов М.М., Анкудинов А.В. Механические и топографические портреты различных видов живых клеток, полученные в атомно-силовом микроскопе // Труды VII всероссийской школы-семинара студентов, аспирантов и молодых ученых по направлению «Диагностика наноматериалов и наноструктур» Рязань, РГРТУ, 15-19 сентября 2014 г. С. 242-246.

5. Халисов М.М., Анкудинов А.В. Исследование действия убаина на сенсорные нейроны с помощью режима PeakForce QNM атомно-силовой микроскопии // Сборник тезисов докладов IV Всероссийского конгресса молодых ученых Университета ИТМО, Санкт-Петербург, 7-10 апреля 2015 г.
6. Тимощук К.И., Халисов М.М., Анкудинов А.В. Исследование корреляции формы, упругих и оптических свойств живых эритроцитов // Сборник тезисов докладов IV Всероссийского конгресса молодых ученых Университета ИТМО, Санкт-Петербург, 7-10 апреля 2015 г.
7. Самсонов М.В., Халисов М.М., Пенниайнен В.А., Анкудинов А.В., Ширинский В.П. Высокмолекулярная киназа легких цепей миозина участвует в регуляции упругости кортикальной цитоплазмы эндотелия микрососудов легких мыши // Материалы докладов V съезда биофизиков России, том 1, Ростов-на-Дону, Южный федеральный университет, 4-10 октября 2015 г. С. 238.
8. Халисов М.М., Анкудинов А.В., Тимощук К.И., Тимошенко Т.Е. Наблюдение методом атомно-силовой микроскопии упрочнения эритроцитов на подложке с сильной адгезией // Сборник статей XX международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования, разработка и применение высоких технологий в промышленности и экономике», Санкт-Петербург, 24-26 ноября 2015 г. С. 164-167.
9. Халисов М.М., Анкудинов А.В. Особенности механических и геометрических свойств живых эритроцитов, закрепленных на полилизинной подложке // Сборник тезисов докладов V Всероссийского конгресса молодых ученых Университета ИТМО, Санкт-Петербург, 12-15 апреля 2016 г.
10. Shirinsky V.P., Kazakova O.A., Samsonov M.V., Khalisov M.M., Khapchaev A.Yu., Penniyaynen V.A., Ankudinov A.V., Krylov B.V. Spatiotemporal activity profiling of key myosin regulators in endothelial cells with regard to control of cell stiffness and barrier dysfunction // Abstract book of Russian conference with international participation "Experimental and computational biomedicine", Ekaterinburg, April 10-12, 2016. P. 53.
11. Samsonov M.V., Khalisov M.M., Khapchaev A.Yu., Penniyaynen V.A., Ankudinov A.V., Krylov B.V., Shirinsky V.P. The role of 210 kda myosin light chain kinase and RHOA-activated protein kinase in control of microvascular endothelial cell stiffness // Materials of International Symposium "Biological motility", Pushchino, 2016. P. 208-209.
12. Samsonov M.V., Khalisov M.M., Khapchaev A.Y., Vorotnikov A.V., Penniyaynen V.A., Ankudinov A.V., Krylov B.V., Lankin V.Z., Shirinsky V.P. Effects of disease-related aldehydes on endothelial cells: a comparative study and probing possible molecular mechanisms // Materials of International Symposium "Biological motility", Pushchino, 2016. P. 209-211.
13. Халисов М.М., Тимощук К.И., Анкудинов А.В., Тимошенко Т.Е. Форма и модуль Юнга неподвижных интактных эритроцитов // Тезисы докладов

- Первой российской конференции «Физика - наукам о жизни» ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, 12-16 сентября 2016 г. С. 72.
14. Халисов М.М., Пеннийнен В.А., Анкудинов А.В., Крылов Б.В. Исследование реакции живых нейронов на неопиоидный анальгетик посредством атомно-силовой микроскопии // Тезисы докладов Первой российской конференции "«Физика - наукам о жизни» ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, 12-16 сентября 2016 г. С. 53.
15. Тимошук К.И., Халисов М.М., Анкудинов А.В., Тимошенко Т.И. Изучение рельефа и механических свойств живых эритроцитов методами АСМ // Труды XXI Международного симпозиума "Нанопластика и наноэлектроника" Т. 1, Нижний Новгород, 13-16 марта 2017 г. С. 337-338.
16. Халисов М.М., Анкудинов А.В. Особенность устройства иммобилизованных на подложке живых фибробластов, выявленная с помощью атомно-силовой микроскопии // Труды XXI Международного симпозиума "Нанопластика и наноэлектроника" Т. 1, Нижний Новгород, 13-16 марта 2017 г. С. 345-346.

Диссертация «Проявление реакции клеток животных на внешние воздействия с помощью атомно-силовой микроскопии» Халисова Максима Миндигалеевича соответствует требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (ред. от 02.08.2016) и пунктам 2, 4 и 8 Паспорта специальности ВАК технических наук по специальности 01.04.01 «Приборы и методы экспериментальной физики».

Диссертация рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 01.04.01 «Приборы и методы экспериментальной физики».

Заключение принято на заседании кафедры нанопластики и метаматериалов.

Присутствовало на заседании 43 чел.

Результаты голосования: «за» - 43 чел., «против» - 0 чел., «воздержалось» - 0 чел., протокол № 7 от « 15 » июня 2017 г.

Председательствующий

(д.ф.-м.н., г.н.с.,
кафедра нанопластики и метаматериалов, зав.каф.)



Белов П. А.

Подпись лица, оформившего заключение

(секретарь кафедры нанопластики и метаматериалов, инж.)



Шикер А. Ю.