

## **Отзыв**

официального оппонента 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**

Сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) – один из важных инструментов нанотехнологии, который сейчас активно применяется не только для исследования характеристик твердого тела, но и для изучения широкого спектра биологических объектов. Благодаря своей универсальности, информативности и гибкости среди разновидностей СЗМ наибольшее распространение в биологии получила атомно-силовая микроскопия (АСМ). Данный метод исследования успешно используют для получения информации о морфологии и механических характеристиках животных клеток. Эффективность АСМ при исследовании таких объектов доказана большим количеством публикаций по этой теме.

В последнее время основной интерес сфокусирован на АСМ изучении клеток в нативном состоянии. Нативные клетки представляют собой неоднородные структурно сложные и изменчивые системы, поэтому их исследование посредством АСМ зонда является нетривиальной задачей и сопряжено с рядом трудностей. В частности, до сих пор недостаточно исследованы различные внешние воздействия, влияющие на результаты АСМ измерений нативных клеток.

Диссертационная работа М.М. Халисова посвящена прояснению вкладов различных внешних факторов в результаты АСМ измерений животных клеток различных типов. В работе были развиты методики, повышающие точность детектирования механических и геометрических характеристик четырех тестовых объектов – нативных клеток: фибробластов, эритроцитов, эндотелиоцитов, сенсорных нейронов. Предложенные методики основаны на перспективном в исследованиях нативных клеток квазистатическом режиме АСМ PeakForce QNM компании Bruker, позволяющем одновременно регистрировать топографию поверхности экспериментальных объектов, а также их механические параметры (модуль Юнга, величину деформации, диссипацию энергии). Т.к. квазистатические режимы АСМ внедрены в коммерческие зондовые микроскопы сравнительно недавно, их применение в исследованиях нативных клеток пока носило ограниченный характер. Полученные в работе результаты могут быть использованы для повышения надежности АСМ измерений нативных клеток. Исходя из вышесказанного, актуальность темы диссертационной работы не вызывает сомнений.

## **Практическая значимость**

Полученные результаты и выводы диссертационной работы могут быть использованы в АСМ исследованиях иммобилизованных на подложке нативных животных клеток в физиологически адекватных условиях. Особый интерес результаты работы могут представлять при изучении нативных клеток в квазистатических режимах АСМ, предполагающих зондирование клеток с частотой  $\sim 0,1$  кГц. Учитывая большое многообразие типов животных клеток и несхожесть их свойств, можно заключить, что наиболее полезны выводы работы будут для исследователей фибробластов, эритроцитов, эндотелиоцитов, сенсорных нейронов или схожих с перечисленными типов клеток.

Диссертационная работа общим объемом 185 страниц состоит из введения, 6 глав, заключения и списка литературы. Она содержит 57 рисунков и 2 таблицы, а список литературы составляет 246 наименований. По результатам диссертации опубликовано 5 статей в научных журналах, рекомендованных ВАК, и 19 работ в материалах конференций.

Во *Введении* изложены актуальность, цель и задачи, сведения об апробации работы, личный вклад автора. Кроме того, приведены выносимые на защиту положения, новизна и практическая значимость полученных результатов.

*Первая глава* является обзорной. В ней рассмотрены методы изучения механических характеристик клеток. Кратко описана суть АСМ в различных режимах работы, при измерении механических параметров клеток. Представлены достоинства и недостатки метода при исследовании нативных клеток.

Во *второй главе* изложен принцип работы атомно-силового микроскопа, описано используемое оборудование и объясняется основной режим АСМ, использованный в диссертационной работе – PeakForce QNM. Рассмотрено определение модуля Юнга, приведена информация об особенностях проведения экспериментов с нативными клетками, а также представлены различные варианты артефактов изображений, осложняющих анализ экспериментальных данных при сканировании нативных клеток.

В *третьей главе* описана методика АСМ, которая позволила выявить неоднородность механических характеристик зондируемых слоев нативных фибробластов куриных эмбрионов. Она заключалась в применении для сканирования клеток зондов с разной формой субмикронного кончика и использовании параметра контактной жесткости для оценки механических характеристик фибробластов. Было показано, что определение модуля Юнга клеток по стандартным моделям расчета для двух типов зондов привело к сильному расхождению его средних значений, в то время как величины контактной жесткости при измерении острым и субмикронным сферическим зондами практически совпали. Таким образом, был получен важный новый результат, заключающийся в том, что величина контактной жесткости более адекватно описывала механические характеристики нативных фибробластов

при сканировании клеток зондами с разной геометрией субмикронного кончика в режиме PeakForce QNM, чем модуль Юнга.

*Четвертая глава* посвящена исследованию нефиксированных крысиных эритроцитов, закрепленных на полилизиновой подложке. Было обнаружено, что свойства эритроцитов на полилизиновой подложке изменяются во времени. По данным оптической микроскопии, сначала эритроциты представляли собой окрашенные круглые объекты на фоне прозрачной подложки, а затем клетки выцветали, становясь едва видимыми. С помощью АСМ визуализации было установлено, что изменение оптических свойств эритроцитов сопровождалось также трансформацией клеток (увеличением высоты) и ростом их модуля Юнга. При этом, в отличие от опубликованных ранее моделей других авторов, автором диссертации было показано, что мембрана клеток при обесцвечивании остается целой. Таким образом, было установлено, что зарегистрированный эффект нестабильности свойств нативных эритроцитов на полилизине может существенно повлиять на результаты АСМ измерения этих клеток и его нужно учитывать при исследовании эритроцитов.

В *пятой главе* изложены результаты изучения мышинных микрососудистых эндотелиоцитов. Для исследования различных белков, потенциально влияющих на механические характеристики эндотелиальных клеток (ЭК), важно иметь возможность надежного детектирования изменений этих характеристик при обработке клеток веществами, регулирующими активность интересующих белковых молекул. Наиболее важными областями являются удаленные от центра (ядра) тонкие регионы ЭК, потому что они определяют целостность слоя эндотелиоцитов. Для проверки того, насколько велико влияние твердой подложки на измеряемые механические характеристики ЭК, эндотелиоциты обрабатывались веществами, селективно подавляющими различные составляющие цитоскелета, и изучалось действие этих веществ на модуль Юнга ядерной и периферийной областей клеток. В результате, было зарегистрировано уменьшение измеренного модуля Юнга на периферии клеток под действием ингибиторов цитоскелета, что свидетельствует о принципиальной возможности детектирования изменений механических характеристик ЭК даже на тонкой периферии эндотелиоцитов. Сделанный вывод подтверждает способность АСМ исследовать роли различных белковых молекул в механических свойствах тонких слоев ЭК.

*Шестая глава* посвящена применению АСМ для детектирования действия веществ, обладающих анальгетическим эффектом, на нативные сенсорные нейроны куриных эмбрионов. Сенсорные нейроны для исследования прикреплялись ко дну чашек Петри либо с помощью коллагена с фибронектином, либо посредством полилизина. Первый тип подложки не обеспечил достаточно эффективной иммобилизации клеток – нейроны часто откреплялись при АСМ сканировании. Вторым вариантом подложки позволил справиться с проблемой ненадежного закрепления клеток. Было обнаружено значительное расхождение значений модуля Юнга нейронов при определении

параметра на коллаген-фибронектиновой и полилизиновой подложках. Т.к. в экспериментах с разными подложками использовались зонды с неодинаковыми свойствами, была исследована зависимость определяемого с помощью АСМ модуля Юнга клеток от характеристик применяемых зондов. Индентирование сенсорных нейронов тремя типами острых зондов привело к получению существенно разных результатов измерения модуля упругости. В связи с этим сделан вывод о необходимости использования зондов одного типа при детектировании действия на сенсорные нейроны веществ с анальгетическим эффектом. Результаты экспериментов с веществами показали, что одно из них (уабаин) вызывает увеличение среднего модуля Юнга, а другое (коленовая кислота) такого действия на сенсорные нейроны не оказывает. Таким образом, адаптированная для детектирования реакции сенсорных нейронов на субстанции с анальгетическим эффектом АСМ методика позволила выявить упрочняющее действие на клетки одного из тестируемых веществ – уабаина.

Сформулированные в *заключении* основные выводы и результаты работы обоснованы и подтверждены представленными в главах экспериментальными исследованиями.

### **Достоверность результатов**

Достоверность и обоснованность полученных результатов диссертационной работы подтверждается достаточно большим количеством проведенных измерений, использованием общепринятых методик обработки данных, совместным использованием АСМ и оптической микроскопии, сравнением полученных результатов с литературными данными. Также достоверность результатов подкреплена обсуждением на конференциях различного уровня и публикациями в научных изданиях, индексируемых в базах ВАК, Web of Science, Scopus.

### **Научная новизна**

Как наиболее важные результаты диссертационной работы, можно выделить:

Предложенную методику более адекватной, чем с помощью модуля Юнга, АСМ оценки механических характеристик внешних слоев нативных фибробластов по контактной жесткости.

Обнаруженное непостоянство геометрии и механических свойств нативных эритроцитов на полилизиновой подложке, которое может негативно повлиять на достоверность результатов АСМ измерения этих клеток.

АСМ детектирование изменений механических характеристик нативных ЭК под действием ингибиторов компонентов цитоскелета возможно даже при измерении модуля Юнга на тонких периферийных областях клеток.

### **Замечания по диссертационной работе.**

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.

Отметим, что приведенные замечания не носят принципиальный характер и не влияют на последующие выводы о качестве диссертационной работы.

### Заключение

Диссертация «Применение атомно-силовой микроскопии для детектирования отклика нативных клеток на внешние воздействия» представляет собой завершенную, выполненную на высоком научном уровне исследовательскую экспериментальную работу. Материалы диссертации апробированы в 19 докладах на международных и российских конференциях и в пяти статьях в научных журналах. Автореферат и диссертация не противоречат друг другу, автореферат в достаточной степени раскрывает содержание диссертационной работы.

Диссертационная работа по актуальности темы, а также степени достоверности, научной новизне и практической значимости результатов полностью отвечает требованиям ВАК и соответствует п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., а ее автор Халисов Максим Миндигалеевич заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата технических наук по специальности 01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики.

Главный научный сотрудник лаборатории физической газодинамики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физико-технического института им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук, доктор физико-математических наук

Олег Святославович Васютинский

*Ученый секретарь  
ФТИ им. Иоффе*

Почтовый адрес:

194021, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 26

Телефон (рабочий): +7 (812)297-20-64

Телефон (мобильный): +7 (981) 802-73-76

Факс: 7(812)297-10-17

Адрес электронной почты: osv@pms.ioffe.ru

