

**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 темы диссертации**

Диссертационная работа Халисова М.М. посвящена исследованию механических свойств биологических клеток методами АСМ. В последнее время метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) все чаще используется для исследования характеристик биологических объектов, в особенности животных клеток. В диссертации приведены данные о резко увеличивающемся в последнее время числе публикаций, посвященных использованию АСМ при изучении этих объектов. В биомедицине востребованы рутинные методики изучения индивидуальных клеток с помощью АСМ. Становление таких методик тормозит недостаточное понимание взаимосвязей между свойствами (геометрическими и механическими) и функциональным состоянием клеток, а также неполнота информации о меж- и внутритиповой индивидуальности клеток. В связи со сказанным, тема представленной к защите диссертационной работы, безусловно, является **актуальной**.

**Краткая характеристика содержания диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, 6 глав, заключения и списка литературы. Она содержит 57 рисунков и 2 таблицы. Список литературы содержит 246 наименований.

Во введении изложены цель и задачи работы, обосновывается ее актуальность. Представлены выносимые на защиту положения и описана практическая значимость полученных результатов.

В первой главе диссертации представлен интересный большой обзор работ, посвященных различным методам изучения механических характеристик клеток. Особенное внимание уделяется методу АСМ – излагается его суть, обсуждаются различные режимы работы АСМ – традиционные (силовая спектроскопия, Force Volume и др.), и более новые квазистатические режимы (PeakForce QNM, Bruker; Hybrid mode, НТ-МДТ и др.), а также преимущества и недостатки метода АСМ при исследовании животных клеток. Представлены основные модели для расчета модуля

упругости по данным АСМ. Поясняется термин "эффективный модуль Юнга" для анализа результатов АСМ индентирования клеток.

Во второй главе описан принцип действия атомно-силового микроскопа. Описан также оптимизированный для биологических образцов зондовый микроскоп Bruker BioScope Catalyst и режим работы, который использовался для изучения животных клеток. Обсуждаются особенности выбора зондового датчика для измерений нативных клеток и подготовки образцов с клетками для АСМ исследования, а также варианты определения модуля Юнга.

В третьей главе диссертации описана методика АСМ, позволяющая определить неоднородность механических параметров зондируемых слоев нативных фибробластов куриных эмбрионов. Для сканирования клеток использовались зонды с разной формой кончика – стандартные острые, а также разработанные недавно зонды с субмикронной сферической частицей. Сравнивались результаты быстрого индентирования. Ранее результаты быстрого индентирования фибробластов с разной геометрией кончика зонда не проводились. Показано, что определение эффективного модуля Юнга клеток по стандартным моделям расчета для разных типов зондов приводит к сильному расхождению средних значений. В результате исследования сделано заключение, что величина контактной жесткости лучше описывает механические характеристики фибробластов при сканировании клеток зондами с разной геометрией кончика. Контактные жесткости, измеренные острым и субмикронным сферическим зондами, в экспериментах оказались близки.

В четвертой главе исследованы нефиксированные крысиные эритроциты на полилизинной подложке. По данным оптической микроскопии сначала эритроциты представляли собой окрашенные объекты округлой формы и имели красноватую окраску. Обнаружено, что некоторые клетки обесцвечиваются, но мембрана клеток остается целой.

В пятой главе представлены результаты изучения мышечных эндотелиальных клеток (ЭК). Показано, что АСМ позволяет исследовать вклад различных белковых молекул в механические характеристики слоев клеток.

В шестой главе диссертации описано применение АСМ при исследовании действия веществ, обладающих анальгетическим эффектом (уабаина и коеновой кислоты), на нативные сенсорные нейроны куриных эмбрионов. Описаны два типа подложки, к которым прикреплялись сенсорные нейроны. Обнаружено существенное расхождение определяемого эффективного модуля Юнга при использовании разных подложек.

Отмечается, что это расхождение связано с тем, что в экспериментах с разными подложками использовались зонды с разными свойствами и исследована зависимость получаемого с помощью АСМ эффективного модуля Юнга клеток от характеристик используемых зондов. Подчеркивается вывод о необходимости использования зондов одного типа при описании действия на сенсорные нейроны веществ с анальгетическим эффектом. Полученные результаты показали, что убаин вызывает упрочнение клетки, т.е. увеличение среднего эффективного модуля Юнга.

В заключении сформулированы основные результаты работы.

### **Научная новизна и практическая значимость исследования**

Автором получены новые и интересные данные, важные для физики, механики и биологии нативных клеток. Результаты работы **могут быть использованы** в АСМ исследованиях сенсорных нейронов и эритроцитов, фибробластов или подобных типов клеток.

### **Обоснованность и достоверность результатов работы**

Результаты работы не подвергаются сомнению, поскольку исследования опирались на современные представления о механизмах взаимодействия твердотельного индентора (зонда АСМ) с мягким объектом (нативными клетками), использовались общепринятые методики обработки данных, применялись взаимодополняющие методы атомно-силовой и оптической микроскопии. Результаты исследований не противоречили имеющимся в литературе данным по исследованию животных клеток методом АСМ. Кроме того, результаты работы были опубликованы в рецензируемых научных журналах и апробированы на российских и международных конференциях.

### **Замечания**

В качестве замечаний к диссертационной работе можно отметить следующее:

1. Во введении диссертации отсутствуют сведения об апробации результатов работы, хотя в автореферате они содержатся.
2. Диссертация написана хорошим языком, но автор использует много специальных терминов, что неизбежно в такой работе. Однако пояснения терминов не всегда приводятся.
3. В главе 3 представлен статистический анализ полученных значений эффективного модуля Юнга по поверхности фибробластов. Представлены средние значения и соответствующие медианы. Было бы

интересно привести также данные рассеивания полученных значений (как это сделано при представлении экспериментальных данных в главе 6).

4. Есть вопросы и по оформлению диссертации. Например, на рисунке 5.4 не хватает обозначений (а), (б); не на всех рисунках единообразно указаны их размеры; гистограммы эффективного модуля Юнга в разных главах оформлены неодинаково. В тексте встречаются опечатки, хотя их и не много.

Приведенные замечания не носят принципиальный характер и не влияют на общее положительное впечатление от работы.

### **Заключение**

Диссертационная работа Халисова М.М. «Применение атомно-силовой микроскопии для детектирования отклика нативных клеток на внешние воздействия», является завершенной, высоко квалифицированной экспериментальной работой. Материалы диссертации представлены в 6 статьях, опубликованных в журналах, включенных в перечень ВАК, и были представлены в докладах на 19 международных и российских конференциях.

Диссертация отвечает требованиям ВАК и соответствует п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г. (ред. от 01.10.2018), а ее автор, Халисов Максим Миндигалеевич, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата технических наук по специальности 01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики.

ОФИЦИАЛЬНЫЙ ОППОНЕНТ  
доктор физико-математических наук,  
профессор, профессор кафедры теоретической  
прикладной механики СПбГУ,  
198504, Санкт-Петербург,  
Университетский пр., д.28,  
Математико-механический факультет СПбГУ  
Тел. +7(812)4284165  
Email: [s.bauer@spbu.ru](mailto:s.bauer@spbu.ru)

 С.М. Бауэр

