

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе  
Университета ИТМО  
д.т.н., профессор



 В.О. Никифоров

«07» октября 2019 г.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Диссертация: «Методики исследования мягких объектов в атомно-силовой микроскопии».

Соискатель: Тимошук Кирилл Игоревич

Диссертация выполнена на физико-техническом факультете, федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий механики и оптики».

В период подготовки диссертации соискатель Тимошук Кирилл Игоревич работал в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий механики и оптики», физико-технический факультет; должность: инженер

В 2015 году соискатель 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 20.01.00 «Приборостроение».

В 2019 году окончил очную аспирантуру федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий механики и оптики» по направлению подготовки 12.06.01 «Фотоника, приборостроение, оптические и биотехнические системы и технологии». Диплом об окончании аспирантуры № 107824 4740949, выдан 21.06.2019.

В 2019 году прикреплялся для сдачи кандидатского экзамена по специальности 01.04.01 – «Приборы и методы экспериментальной физики» в федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт аналитического приборостроения Российской академии наук» (ИАП РАН), удостоверение № 3 от 23.09.2019.

Научный руководитель – Анкудинов Александр Витальевич, доктор физико-математических наук, основное место работы: федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Физико-технический институт имени А.Ф. Иоффе Российской академии наук», лаборатория физико-химических свойств полупроводников, старший научный сотрудник.

По итогам рассмотрения принято следующее заключение:

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

Личный вклад соискателя состоит в анализе литературных источников по теме диссертации, отработке методик измерения геометрических и механических характеристик нативных клеток в физиологически адекватных условиях с помощью атомно-силового микроскопа, проведении экспериментов с клетками на атомно-силовом микроскопе, обработке экспериментальных данных. Вклад соискателя заключается как в постановке задач и формулировании целей исследования, так и в написании научных статей.

**2. Степень достоверности результатов проведенных соискателем ученой степени исследований.**

Достоверность результатов обусловлена достаточным объемом выборок при сравнительном анализе групп нативных клеток по геометрическим и механическим характеристикам, измеренным посредством атомно-силового микроскопа; использованием современных знаний об устройстве нативных клеток и теоретических представлений о взаимодействии зондового датчика сканирующего зондового микроскопа с мягкими и вязкими объектами, помещенными в жидкую среду; использованием методов оптической и лазерной конфокальной микроскопии, дополняющих сканирующую зондовую микроскопию.

**3. Новизна, научная и практическая значимость результатов исследования заключается в том, что:**

а) впервые предложено по зависимости измеряемого модуля Юнга,  $E_A$ , от  $\lambda$ , отношения высоты зонда к длине консоли используемого АСМ-кантилевера, определять состояния зацебления или скольжения в контакте АСМ-зонд–мягкий объект. Наличие зависимости  $E_A(\lambda)$  характеризует среднестатистический объект как липкий, отсутствие – как скользкий. Такая условная классификация важна, так как только у скользких объектов АСМ-данные получают однозначную трактовку;

б) впервые предложено идентифицировать состояние скольжения АСМ-зонда на мягком объекте по положительным экстремумам сигнала деформации на его наклонных участках;

в) используя методику определения состояния зацебления или скольжения в контакте АСМ-зонд–мягкий объект по зависимости  $E_A(\lambda)$ , удалось детектировать скользкие фибробласты и достоверно зарегистрировать уменьшение их податливости после воздействия колхицина, способствующего деполимеризации тубулиновых микротрубочек;

г) разработаны две методики сортировки объектов на липкие и скользкие по отношению к материалу АСМ-зонда: первая характеризует объекты в среднем, а вторая классифицирует каждый отдельный объект, – которые способствуют адекватной интерпретации результатов АСМ-измерений механических свойств мягких объектов;

д) показана необходимость контролировать значения параметра  $\lambda$  – отношения длины зонда к длине консоли кантилевера – в процессе накопления

статистических данных измерений эффективного модуля Юнга мягких объектов методом АСМ для обеспечения адекватности таких измерений;

е) установлено, что при отсутствии информации об удельном вкладе латеральных и нормальных сил во взаимодействие АСМ-зонда с образцом, следует для изучения механических свойств образца выбирать АСМ-кантилеверы с минимальным  $\lambda$ ;

ж) Предложенная методика охарактеризации отдельных объектов является оперативным инструментом скоростной ревизии литературных данных, накопленных в АСМ-измерениях механических свойств мягких объектов;

з) Результаты, представленные в диссертационной работе были получены на установке BioScope Catalyst с режимом PeakForce QNM компании Bruker. Однако, разработанные методики можно также успешно применять при использовании приборов с аналогичными режимами других производителей (HybriD mode, НТ-МДТ СИ; Quantitative Imaging (QI), JPK Instruments; Digital Pulsed Force Mode, WITec; Fast Force Mapping Mode, Asylum Research).

#### **4. Ценность научных работ соискателя ученой степени.**

Ценность проведенной соискателем работы заключается в разработке методик исследования мягких объектов в атомно-силовой микроскопии. Было разработано две методики классификации мягких объектов по преобладанию нормальных или латеральных сил в их контакте с зондом АСМ-кантилевера, одна для охарактеризации среднестатистической группы однотипных объектов, вторая для охарактеризации каждого отдельного объекта непосредственно в процессе АСМ-сканирования, которые в совокупности позволяют существенно увеличить адекватность, чувствительность и быстродействие измерений механических свойств мягких объектов. Кроме того, была проведена довольно масштабная экспериментальная работа по изучению взаимодействия зонда АСМ-кантилевера с мягкими объектами, представленными разными типами нативных клеток, проливающая свет на различные факторы, важные при исследовании механических свойств мягких объектов и способные влиять на результаты измерений. Были рассмотрены такие нетривиальные методические факторы, как продолжительность АСМ-сканирования, пиковая сила индентации, положение фокуса лазерного луча на консоли АСМ-кантилевера и так далее.

В частности, согласно разработанной методике скользящий объект распознается по характерным экстремумам сигнала деформации или модуля Юнга в АСМ-изображении, что представляет удобным критерием для автоматической сортировки АСМ-изображений в разработках методов математической обработки экспериментальных результатов.

Изложенные в диссертации экспериментальные результаты и выводы способствуют развитию методик исследования характера взаимодействия контакта АСМ-зонд-мягкий объект. Результаты работы полезны для изучения посредством АСМ охарактеризации индивидуальных геометрических и механических свойств мягких объектов, ярким представителем которых являются нативные клетки, определению их физиологического и патологических состояний, тестированию действия различных токсинов или лекарств.

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 01.10.2018).

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

Основное содержание диссертации опубликовано в 13 статьях, из них 4 публикаций в изданиях, рецензируемых Web of Science или Scopus и журналах из перечня ВАК и 9 публикаций в иных изданиях (с указанием авторского вклада).

Научные издания, входящие в международные реферативные базы данных и системы цитирования и перечень российских рецензируемых журналов:

1. 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 - 2017. - Т. 87. - № 2. - С. 282-285. 0,5 п.л. / 0,1 п.л. Вклад Тимощука К.И.: проведение измерений и анализ экспериментальных данных, обсуждение результатов, написание статьи. В статье обсуждается возможный механизм эффекта увеличения измеряемого методом АСМ модуля юнга интактных эритроцитов крыс.

2. Халисов М.М., Анкудинов А.В., Пеннийнен 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 - 2017. - Т. 43. - № 4. - С. 56-63. 0,5 п.л. / 0,05 п.л.. Вклад Тимощука К.И.: проведение измерений и анализ экспериментальных данных, обсуждение результатов, написание статьи. Вклад Тимощука К.И.: проведение измерений и анализ экспериментальных данных, обсуждение результатов, написание статьи. В статье рассматривается вклад радиуса закругления АСМ-зонда в значения измеряемой высоты и жесткости контакта зонда с клеткой.

3. Анкудинов А.В., Халисов М.М., Пеннийнен В.А., Подзорова С.А., Тимощук К.И., Крылов Б.В. Эффект длины зонда на кантилере атомно-силового микроскопа в измерениях механических свойств нативных нейронов // Письма в Журнал технической физики - 2018. - Т. 44. - № 15. - С. 38-45. 0,5 п.л. / 0,1 п.л.. Вклад Тимощука К.И.: идея статьи, проведение измерений и анализ экспериментальных данных, обсуждение результатов, написание статьи. В статье рассматривается зависимость измеряемого кажущегося модуля Юнга клеток от отношения высоты АСМ-зонда к длине консоли используемого кантилера.

4. Тимощук К.И., Халисов М.М., Пеннийнен В.А., Крылов Б.В., Анкудинов А.В. Исследование механических характеристик нативных фибробластов с помощью атомно-силового микроскопа // Письма в Журнал технической физики - 2019. - Т. 45. - № 18. - С. 44-47. 0,5 п.л. / 0,125 п.л.. Вклад Тимощука К.И.: идея статьи, проведение измерений и анализ экспериментальных данных, обсуждение результатов, написание статьи. В статье сравниваются вклады латеральной и нормальной силы взаимодействия в контакте АСМ-зонд-образец при АСМ-индентировании нативных фибробластов.

Публикации в иных изданиях:

5. Халисов М.М., Тимощук К.И. Исследование корреляции формы, упругих и оптических свойств живых эритроцитов. // Сборник тезисов докладов конгресса молодых учёных. Электронное издание. - 2015. - Режим доступа:

<https://openbooks.itmo.ru/ru/file/1402/1402.pdf>, своб. 0,125 п.л. / 0,06 п.л.. Вклад Тимощука К.И.: проведение измерений и анализ экспериментальных данных, обсуждение результатов, написание текста публикации.

6. **Тимощук К.И.**, Халисов М.М., Анкудинов А.В., Тимошенко Т.Е. Форма и модуль Юнга неподвижных интактных эритроцитов. // Тезисы докладов Первой российской конференции "Физика - наукам о жизни". - 2016. - С. 72. 0,0625 п.л. / 0,02 п.л. Вклад Тимощука К.И.: проведение измерений и анализ экспериментальных данных, обсуждение результатов, написание текста публикации.

7. **Тимощук К.И.** Изучение зависимости геометрических, механических и оптических свойств живых эритроцитов. // Научные сообщения молодых ученых «Международная зимняя школа по физике полупроводников – 2016». - 2016. - С. 20-21. 0,125 п.л.

8. Халисов М.М., **Тимощук К.И.**, Анкудинов А.В., Тимошенко Т.Е. Изучение рельефа и механических свойств живых эритроцитов методами АСМ. // Труды XXI Международного симпозиума "Нанозфизика и нанозлектроника" 13-16 марта 2017 г. - 2017. - Т. 1. - С. 337-338. 0,125 п.л. / 0,03 п.л.. Вклад Тимощука К.И.: проведение измерений и анализ экспериментальных данных, обсуждение результатов, написание текста публикации.

9. **Тимощук К.И.** Поиск закономерностей в зависимости между механическими свойствами и функциональным состоянием клеток крови с использованием методов атомно-силовой микроскопии. // Успехи современной науки. - 2017. - Т. 2. - № 12. - С. 12-18. 0,5 п.л.

10. Халисов М.М., Анкудинов А.В., Пенниайнен В.А., **Тимощук К.И.** Особенности реакции сенсорных нейронов на вещества с анальгетическим эффектом, выявленные методом атомно-силовой микроскопии. // Материалы Всероссийской молодежной конференции с международной конференцией с международным участием "Современные аспекты интегративной физиологии". - 2018. - С. 111-112. 0,125 п.л. / 0,03 п.л.. Вклад Тимощука К.И.: проведение измерений и анализ экспериментальных данных, обсуждение результатов.

11. Анкудинов А.В., Халисов М.М., Пенниайнен В.А., Подзорова С.А., **Тимощук К.И.**, Крылов Б.В. Вклад длины зонда атомно-силового микроскопа в значения кажущегося модуля Юнга нативных нейронов. // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии: сб. докл. XIII Междунар. конф., Минск, 16-19 окт. 2018 г. - 2018. - С. 246-250. 0,25 п.л. / 0,04 п.л. Вклад Тимощука К.И.: проведение измерений и анализ экспериментальных данных, обсуждение результатов, написание текста публикации.

12. Халисов М.М., **Тимощук К.И.**, Пенниайнен В.А. Ответ сенсорных нейронов на действие коленовой кислоты, выявленный методом атомно-силовой микроскопии. // Неделя науки СПбПУ: материалы научной конференции с международным участием, 19-24 ноября 2018 г. Институт биомедицинских систем и технологий. - 2018. - С. 203-205. 0,2 п.л. / 0,06 п.л. Вклад Тимощука К.И.: проведение измерений и анализ экспериментальных данных, обсуждение результатов, написание текста публикации.

13. **Тимощук К.И.** Влияние длины зонда атомно-силового микроскопа на кажущийся модуль Юнга сенсорных нейронов. // Материалы Международного

молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2019». Электронное издание. - 2019. - Режим доступа: [https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov\\_2019/data/16073/87820\\_uid337804\\_report.pdf](https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2019/data/16073/87820_uid337804_report.pdf), своб. 0,0625 п.л.

В опубликованных работах отражены основные результаты диссертации, касающиеся применения атомно-силовой микроскопии для изучения геометрических и механических характеристик различных типов мягких объектов, в т.ч. нативных животных клеток. В частности, приведены данные об изучении нефиксированных крысиных эритроцитов, иммобилизованных на полилизиновой подложке. С помощью разработанных АСМ-методик было установлено, что в контакте таких объектов с АСМ-зондом преобладает вклад латеральных сил, что свидетельствует об отсутствии однозначной трактовки результатов измерений их механических свойств. Публикации также содержат результаты изучения нативных фибробластов, которые, в контакте АСМ-зонда с которыми, в свою очередь, преобладает вклад нормальных сил, что дает возможность адекватной трактовки измеряемых в АСМ механических параметров объекта. Наконец, в опубликованных работах представлена методика определения состояния заземления или скольжения в контакте АСМ-зонд-мягкий объект по зависимости измеряемого модуля Юнга от отношения высоты зонда к длине консоли используемого АСМ-кантилевера.

Диссертация «Методики исследования мягких объектов в атомно-силовой микроскопии» Тимощука Кирилла Игоревича соответствует требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г. (ред. от 01.10.2018) и пунктам 2 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 физико-математических наук по специальности 01.04.01 «Приборы и методы экспериментальной физики».

Заключение подготовлено на заседании физико-технического факультета.

Присутствовало на заседании 12 чел.

Результаты голосования: «за» - 12 чел., «против» - 0 чел., «воздержалось» - 0 чел., протокол № 2019-9 от «18» 09 2019 г.

Руководитель подразделения д.ф.-м.н., проф., декан физико-технического факультета Белов Павел Александрович

Диплом об окончании аспирантуры № 107824 4740949.

Выдан 21.06.2019 г.

Подпись

Сотрудника отдела МАИД ИТМО

 / Даниловский А.В.