

ОТЗЫВ
официального оппонента
на диссертацию Тимошука Кирилла Игоревича
«Методики исследования мягких объектов в атомно-силовой
микроскопии», представленную на
соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по
специальности 01.04.01 - Приборы и методы экспериментальной физики

Актуальность темы диссертации

Метод атомно-силовой АСМ хорошо известен, а в последнее время активно используется для исследования механических характеристик мягких объектов, включая исследование живых клеток. Клетки - очень сложный объект для АСМ, предназначенного для изучения с помощью атомарно острого зонда в основном твердотельных образцов. В диссертации К.И. Тимошука отмечается отсутствие стандартизации и единства измерений в публикациях, посвященных использованию АСМ при изучении клеток, описаны причины возникновения такой ситуации. В частности, обсуждается главная, которая заключается не только в не точном, но и в корне неправильном измерении зависимости силы взаимодействия от деформации образца, служащей в последующем для извлечения данным по локальным механическим характеристикам таким, как, например, модуль Юнга.

Работа Тимошука К.И. решает задачи по разработке более точных методик атомно-силовой микроскопии (АСМ), одновременно направленных на повышение адекватности измерений механических характеристик т.н. «мягких» объектов, и делает попытку стандартизировать измерения и обеспечить их единство.

Автор показывает некорректность стандартной модели скользящего контакта зонда с поверхностью образца. Обычно, в современных АСМ для обработки результатов экспериментов применяется теория Герца, пренебрегающая сдвиговыми напряжениями в образце и, соответственно, предполагающая его зондирование только в нормальном направлении. В реальности зонд деформирует образец также и в плоскости сканирования, что

делает применение теории Герца некорректным, а результаты измерений неверными. Как следствие, необходимы более адекватные модели и решения для АСМ измерений, учитывающие сдвиговые деформации образца и трение в контакте. Например, в 2018 году на рынке появился первый образец АСМ прибора с совмещенной схемой оптического рычага и интерферометра, позволяющей измерять три параметра и, в принципе, исчерпывающе описывать трехмерные отклонения зонда кантилевера. Решение, однако, еще далеко от совершенства. Например, в новом приборе, запущенном в производство компанией Asylum Research, сигнал смещения, детектируемый интерферометром, на порядок менее чувствителен к величине деформации кантилевера, чем сигнал угла изгиба или кручения, измеряемый методом оптического рычага.

В связи с вышесказанным, проведенная автором с помощью стандартного АСМ прибора работа по теме диссертационной работы *«Методики исследования мягких объектов в атомно-силовой микроскопии»*, ***безусловно, является своевременной, востребованной и актуальной.***

Краткая характеристика содержания диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, заключения, списка литературы. Общий объем диссертации составляет 129 страниц, включая 24 рисунка, 10 таблиц и список цитируемой литературы из 158 наименований.

Во введении обоснована актуальность проведенного исследования, изложены цель и задачи работы, описаны научная новизна и практическая значимость полученных результатов, сформулированы выносимые на защиту положения, а также описаны апробация результатов работы, публикации автора по теме диссертационного исследования, достоверность и надежность результатов исследования, личный вклад автора работы, а также структура и объем диссертации.

В первой главе представлен литературный обзор по теме диссертационного исследования. В нём приводится краткая информация об объекте изучения данной работы, рассматриваются распространенные методы изучения механических параметров индивидуальных клеток, а также результаты, достигнутые при применении описанных методов. Излагается суть АСМ в качестве активного метода измерения механических параметров клеток, основного метода исследования, используемого в данной работе, и его возможности для метрологии механических параметров. Кратко описываются основные механические модели для анализа АСМ-данных, их основные достоинства и недостатки. Описываются квазистатические режимы АСМ для изучения механических параметров образца и преимущества их применения в работе с нативными клетками. Перечисляются основные достоинства и недостатки АСМ при исследовании нативных клеток.

Во второй главе приводится принцип действия атомно-силового микроскопа, рассмотрен оптимизированный для биологических образцов зондовый микроскоп Bruker BioScope Catalyst и особенности квазистатического режима PeakForce QNM, которые выбраны основными инструментами получения результатов данной работы. Описаны особенности выбора зондового АСМ-датчика для измерений механических параметров нативных клеток и их пробоподготовки для АСМ-исследований. Демонстрируются варианты определения эффективного модуля Юнга в режиме PeakForce QNM, условия и параметры сканирования клеток в данном режиме. Кроме того, описан процесс калибровки АСМ-кантилеверов, особенности экспериментов по изучению клеток, обосновывается выбор параметров сканирования нативных клеток в режиме PeakForce QNM и приведена общая информация об обработке АСМ-данных.

В третьей главе работы приведена разработанная автором методика обеспечения единства АСМ-измерений через учет параметра λ , отражающего отношение длины АСМ-зонда l_T к длине консоли АСМ-кантилевера l_C . Методика позволила установить, что, во-первых, измеряемый в АСМ-режиме

PeakForce QNM эффективный модуль Юнга E нативных клеток зависит от параметра λ ; во-вторых, у сенсорных нейронов E падает с ростом λ , что указывает на залипание зонда на нейроне при измерении силовых кривых; в-третьих, наличие или отсутствие зависимости E от λ позволяет сортировать клетки как липкие или скользкие по отношению к материалу зонда соответственно.

В четвертой главе описывается разработанная автором работы методика количественных АСМ-измерений механических параметров мягких объектов на примере исследования нативных фибробластов. Подробно описывается процесс пробоподготовки нативных фибробластов для АСМ-исследования и рассматривается вклад различных факторов в результаты АСМ-измерений их механических параметров.

В результате нескольких серий экспериментов установлено, что, во-первых, в среднем измеренный модуль Юнга нативных фибробластов не зависит (или несущественно зависит) от времени АСМ-сканирования, и не изменяется (или несущественно изменяется) при повторном сканировании; во-вторых, в среднем измеренный модуль Юнга нативных фибробластов зависит от величины пиковой силы АСМ-индентирования; в-третьих, контактная жесткость системы АСМ-зонд–образец не зависит от остроты индентора и формы зонда; в-четвертых, в среднем измеренная деформация нативных фибробластов не зависит от положения фокуса лазерного луча на консоли АСМ-кантилевера.

В пятой главе диссертации представлены результаты исследования действия колхицина на нативные фибробласты. АСМ-исследование велось с помощью разработанных автором и описанных в предыдущих главах методик интерпретации результатов АСМ-измерений. Также для дополнительной верификации полученных результатов используется метод конфокальной микроскопии.

В заключении сформулированы основные выводы и результаты работы.

Основные выводы и результаты работы соответствуют *специальности*

01.04.01 - Приборы и методы экспериментальной физики.

Содержание автореферата правильно отражает содержание диссертации.

Научная новизна и практическая значимость исследования

Автором впервые получены новые данные, важные для физики и механики АСМ измерений. Результаты работы могут быть использованы в АСМ исследованиях механических характеристик мягких объектов, таких как живые клетки, гидрогели, полимеры.

Особенно интересной представляется разработанная автором методика классификации контакта АСМ-зонда с индивидуальным объектом.

Обоснованность и достоверность результатов работы

Достоверность результатов работы не вызывает сомнений. 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 конфокальной лазерной микроскопии. Результаты исследований не противоречат имеющимся в литературе данным по исследованию живых клеток методом АСМ. Результаты работы были опубликованы в рецензируемых научных журналах и апробированы на российских и международных конференциях.

Замечания

1. Не совсем удачно в названии диссертации присутствует термин "методики". "Методикой", согласно ИЮПАК, считается способ применимый только к одной специфической ситуации, например, только к образцу определенного состава. Предложенными же автором "методиками" можно изучать целый класс так называемых мягких объектов (гидрогели, полимеры, клетки...). Т.о. правильнее было бы использовать термин "методы".
2. Практическую значимость диссертации усилил бы акт внедрения или акт использования разработанных методик.
3. В главе 4, пункте 4.2.4, посвященном изучению влияния выбора положения точки фокуса лазерного луча на консоли АСМ кантилевера на значение измеряемого сигнала, не рассмотрен вопрос точности позиционирования лазерного фокуса.
5. В главе 5 диссертационной работы, посвященной в том числе исследованию воздействия вещества "колхицин", не обоснован выбор этого препарата.
6. В тексте диссертации присутствуют орфографические и стилистические ошибки. Есть замечания и к рисункам, например, у рисунка 2.3 на странице 49 не совсем удачно выбрана цветовая палитра, затрудняющая его восприятие. Кроме того, стиль оформления рисунков эклектичен.

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

Заключение

Диссертационная работа Тимощука К.И. «Методики исследования мягких объектов в атомно-силовой микроскопии», является завершенной, высоко квалифицированной методологической работой. Материалы диссертации представлены в 4 статьях, опубликованных в журналах, включенных в перечень ВАК, и были представлены в докладах на 7 международных и российских конференциях.

Диссертация 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», а ее автор, Тимошук Кирилл Игоревич, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.01 - Приборы и методы экспериментальной физики.

«28» ноября 2019 г. _____ Вячеслав Алексеевич Мошников

Адрес: 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 5
Раб. т.: (812) 234-31-64, факс: (812) 346-2758
моб. т. 8-921-987-4891,
e-mail: vamoshnikov@mail.ru

Подпись руки Мошникова Вячеслава Алексеевича удостоверяю:

Начальник отдела диссертационных советов
СПбГЭТУ «ЛЭТИ», к.э.н.



Русяева Т.Л.