

На правах рукописи



Тимощук Кирилл Игоревич

МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ МЯГКИХ ОБЪЕКТОВ В АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Специальность 01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики.

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики».

Научный руководитель: **Анкудинов Александр Витальевич**
доктор физико-математических наук

Официальные оппоненты: **Мошников Вячеслав Алексеевич**
доктор физико-математических наук, профессор, ФГАОУ
ВО «Санкт-Петербургский государственный
электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И.
Ульянова (Ленина)», профессор кафедры микро- и
наноэлектроники

Егоров Владимир Валерьевич
кандидат биологических наук, ФГБУ «Научно-
исследовательский институт гриппа им. А.А.
Сморodinцева» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, заведующий лабораторией
генной инженерии и экспрессии рекомбинаторных белков,
ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.
Константинова (ПИЯФ) НИЦ «Курчатовский институт»
», старший научный сотрудник лаборатории биофизики
макромолекул

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный
университет»

Защита состоится 23 декабря 2019 г. в 11:00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.034.01 на базе Института аналитического приборостроения РАН (ИАП РАН) по адресу: 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31–33 лит. А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ИАП РАН по тому же адресу и на сайтах "www.iairas.ru" и "www.iai.rssi.ru". Отзывы на диссертацию и автореферат направлять по адресу: 190103, г. Санкт-Петербург, Рижский пр., д. 26, Институт аналитического приборостроения РАН, а/я 207.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2019 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 002.034.01
доктор физико-математических наук



Буляница А.Л.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы:

Метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) считается перспективным в исследованиях по охарактеризации индивидуальных геометрических и механических параметров мягких объектов, ярким представителем которых являются нативные клетки, определению их физиологического и патологических состояний, тестированию действия различных токсинов или лекарств.

Несмотря на популярность метода АСМ, ощущается явное отсутствие стандартизации и единства измерений: результаты измерений одних и тех же объектов у разных исследователей сильно разнятся. В особенности это касается исследований т.н. «мягких объектов» – таких, контактная жесткость зонда АСМ-кантилевера с которыми существенно меньше жесткости консоли АСМ-кантилевера. Такая ситуация может являться следствием упрощенного взгляда на контакт АСМ-зонда с образцом. Обычно считается, что в образце нет сдвиговых напряжений, он индентируется только в нормальном направлении, т.е. АСМ-зонд не деформирует его в плоскости сканирования, поскольку скользит по поверхности. Исходя из этого предположения, для обработки результатов экспериментов используются основанные на теории Герца модели упругого контакта. Если же зонд не скользит по поверхности образца, применять такие модели в принципе нельзя, и корректная постановка вопроса о точности измерений становится невозможной.

Ряд исследователей указывали на проблему, обусловленную ограниченностью методики детектирования отклонений АСМ-кантилевера – оптического рычага. В такой схеме измеряется два параметра: угол изгиба и угол кручения консоли АСМ-кантилевера в точке фокуса лазерного луча, выбранной обычно на конце консоли, в то время как вектор смещения и приложенной силы имеет три компонента. Поскольку угол изгиба определяется по наклону лишь в одной точке консоли АСМ-кантилевера, невозможно распознать аномальный прогиб консоли, который, в свою очередь, может служить причиной ошибочных измерений амплитуды и направления силы взаимодействия.

Если зонд защемляется на поверхности образца, то консоль АСМ-кантилевера во время вертикального движения прогнётся, т.е. профиль угла прогиба будет иметь экстремум, в отличие от ситуации, когда зондовый датчик скользит по образцу и консоль изгибается, т.е. угол изгиба монотонно возрастает либо убывает к концу консоли АСМ-кантилевера.

Такая неопределенность осложняет анализ результатов измерений в большинстве современных атомно-силовых микроскопов, вносит неоднозначность в их интерпретацию и становится причиной ошибок.

Особенно важно иметь это ввиду при исследовании таких объектов, как: гидрогели, полимеры и нативные клетки.

Лишь недавно начали предлагаться конструктивные решения проблемы, и, наконец, появилась схема измерения отклонения кантилевера, совмещающая в себе методы оптического рычага и интерферометра.

Как следствие рассмотренного состояния дел, в вопросе о точности АСМ-измерений механических параметров образца оказывается весьма актуальным критический анализ стандартных силовых кривых, учитывающий граничные условия в контакте зонд-образец: скольжение контакта, защемление, а также переходы между такими состояниями.

Вышесказанное обосновывает актуальность диссертационного исследования, применяющего АСМ для изучения мягких объектов.

Цель и задачи работы

Цель работы: создать новые методики атомно-силовой микроскопии для адекватных измерений механических параметров (деформации, контактной жесткости, модуля Юнга) и рельефа морфологии нативных клеток животных, полимерных гидрогелей, других мягких объектов.

Задачи работы:

- Сформировать критерии классификации контакта АСМ-зонда с мягкими объектами по принципу «липкий-скользкий» для обеспечения адекватности АСМ-измерений их механических и геометрических параметров.

- Разработать методику определения вклада геометрической формы кантилевера в результаты измерений кажущейся контактной жесткости и эффективного модуля Юнга мягких объектов. Апробировать данную методику на нативных нейронах, исследуя их методом АСМ в условиях близких к физиологическим.

- Разработать методику выявления состояний скольжения-залипания в контакте АСМ-зонда с индивидуальным мягким объектом. Апробировать данную методику на нативных фибробластах, исследуя их методом АСМ в условиях близких к физиологическим.

Научная новизна работы:

1. Впервые предложено по зависимости измеряемого модуля Юнга, E_A , от λ – отношения высоты зонда к длине консоли используемого АСМ-кантилевера, определять состояния защемления или скольжения в контакте АСМ-зонд–мягкий объект. Наличие зависимости $E_A(\lambda)$ характеризует контакт АСМ-зонда со среднестатистическим объектом из группы однотипных объектов как липкий, отсутствие – как скользкий. Такая условная классификация важна, так как в случае липкого контакта зонда с объектом АСМ-данные получают неоднозначную трактовку.
2. Впервые предложено идентифицировать скользкий тип контакта АСМ-зонда с мягким объектом по положительным экстремумам кривой деформации на его наклонных участках, получаемых при АСМ-исследовании.

3. Разработанная методика определения липкого или скользкого контакта АСМ-зонда с мягким объектом по зависимости $E_A(\lambda)$ впервые позволила детектировать фибробласты, тип контакта АСМ-зонда с которыми является скользким, и достоверно зарегистрировать уменьшение их податливости после воздействия колхицина, способствующего деполимеризации тубулиновых микротрубочек.

Практическая значимость работы:

1. Разработаны две методики сортировки мягких объектов по принципу «липкого-скользкого» контакта с АСМ-зондом, которые способствуют адекватной интерпретации результатов АСМ-измерений механических параметров мягких объектов. Первая методика позволяет классифицировать среднестатистический объект из группы однотипных объектов, вторая методика позволяет классифицировать каждый отдельный объект.
2. Показана необходимость контролировать значения параметра λ – отношения длины зонда к длине консоли кантилевера, в процессе накопления статистических данных измерений эффективного модуля Юнга однотипных мягких объектов методом АСМ для обеспечения адекватности таких измерений.
3. Установлено, что при отсутствии информации об удельном вкладе латеральных и нормальных компонент силы взаимодействия АСМ-зонда с образцом, следует для изучения механических параметров образца выбирать АСМ-кантилеверы с минимальным λ .
4. Предложенная методика классификации контакта АСМ-зонда с индивидуальным объектом по принципу «липкий-скользкий» позволяет на основе сделанной оценки типа контакта оценивать адекватность результатов литературных данных, накопленных в АСМ-измерениях механических параметров мягких объектов.
5. 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).

Положения, выносимые на защиту:

1. При АСМ-исследовании мягких объектов необходимо классифицировать их по преобладанию вклада нормальных (F_Z ; скользкий контакт) или латеральных (F_Y ; защемленный, липкий контакт) сил в контакте зонд-объект в изгиб консоли кантилевера, поскольку АСМ-измерения механических параметров в условиях липкого контакта с объектом трактуются неоднозначно. Вклад нормальных сил преобладает, когда $F_Z/F_Y \gg \lambda$, где λ – это отношение высоты зонда к длине консоли кантилевера.

2. Адекватность АСМ-измерений средних значений кажущихся модуля Юнга, контактной жесткости, деформации мягкого объекта обеспечивается независимостью измеряемых значений от λ .
3. Рост кажущейся деформации, измеряемой в АСМ на наклонных участках однородного образца, относительно значений на его горизонтальных участках, свидетельствует о проскальзывании на образце зонда в момент взаимодействия. Выявленный эффект классифицирует контакт с индивидуальным объектом как скользкий непосредственно в ходе АСМ-измерений, не требуя использования кантилеверов с различным λ .

Апробация работы

Основные положения и результаты работы докладывались и обсуждались на Первой российской конференции «Физика – наукам о жизни» ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН (Санкт-Петербург, 2016); Международной зимней школе по физике полупроводников 2016 (Санкт-Петербург, 2016); XXI Международном симпозиуме «Нанофизика и наноэлектроника» (Нижний Новгород, 2017); Всероссийской молодежной конференции с международным участием "Современные аспекты интегративной физиологии" (Санкт-Петербург, 2018); XIII Международной научной конференции "Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии" (Минск, 2018); XLVII Научной конференции с международным участием "Неделя науки СПбПУ" (Санкт-Петербург, 2018); XXVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов" (Москва, 2019).

Публикации

Основные результаты диссертации изложены в 12 печатных работах, из них 4 в научных журналах, рекомендованных ВАК, и 8 в материалах международных и российских конференций.

Достоверность и надежность результатов.

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.

Личный вклад автора

Автором получены все основные оригинальные и рутинные экспериментальные результаты диссертации. Анализ экспериментальных и теоретических результатов, а также подготовка публикаций проводились совместно с соавторами из Института Физиологии им. И.П. Павлова, ФТИ им. А.Ф. Иоффе, Университета ИТМО и научным руководителем. Вклад

автора диссертационной работы в анализ результатов и подготовку публикаций сопоставим со вкладами соавторов публикаций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, заключения, списка литературы. Общий объем диссертации составляет 129 страниц машинописного текста, включая 24 рисунка по тексту, 10 таблиц и список цитируемой литературы из 158 наименований работ отечественных и зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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 так же структура и объем диссертации.

Первая глава представляет собой литературный обзор по теме диссертационного исследования. Приведена краткая информация об объекте изучения данной работы – нативной клетке. Рассмотрены распространенные методы изучения механических параметров индивидуальных клеток: активные (регистрирующие отклик клетки на деформацию под действием внешних сил), такие как микропипеточная аспирация и оптический пинцет, и пассивные (позволяющие детектировать генерируемые самой клеткой силы), такие как микрореология и методы деформируемых подложек, а так же результаты, достигнутые при применении описанных методов. Изложена суть АСМ в качестве активного метода измерения механических параметров (деформации, контактной жесткости, модуля Юнга) клеток, основного метода исследования, используемого в данной работе, и его возможности для метрологии механических параметров. Кратко описаны основные механические модели для анализа АСМ-данных, их основные достоинства и недостатки. Представлен обзор квазистатических режимов АСМ для изучения механических параметров образца (PeakForce QNM, Bruker; HybriD mode, НТ-МДТ и др.) и преимущества их применения в работе с нативными клетками. Перечислены основные достоинства и недостатки АСМ при исследовании нативных клеток. Рассмотрена проблема отсутствия стандартизации результатов АСМ-измерений механических параметров нативных клеток [1]. По результатам и выводам, сделанным в процессе написания литературного обзора, определены цель и задачи диссертационного исследования.

Вторая глава является методической, а также содержит отдельные оригинальные результаты, полученные автором работы. В ней приведен принцип действия атомно-силового микроскопа [2]. Рассмотрены оптимизированный для биологических образцов зондовый микроскоп Bruker BioScope Catalyst и особенности квазистатического режима PeakForce QNM, которые выступили основными инструментами получения результатов данной работы [3]. Описаны особенности выбора зондового АСМ-датчика для измерений механических параметров нативных клеток и их пробоподготовки для АСМ-исследований. Показаны варианты определения эффективного модуля Юнга в режиме PeakForce QNM. Изложены условия и параметры сканирования клеток в PeakForce QNM. Кроме того, описан процесс калибровки АСМ-кантиллеров, особенности экспериментов по изучению клеток, обоснован выбор параметров сканирования нативных клеток в режиме PeakForce QNM и приведена общая информация об обработке АСМ-данных. Также в данной главе определяются такие термины, как "мягкий объект", "скользящий объект" и "липкий объект".

Третья глава описывает предложенную автором работы методику обеспечения единства АСМ-измерений через учет параметра λ , отражающего отношение длины АСМ-зонда l_T к длине консоли АСМ-кантиллера l_C , позволившая 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 [4] 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. Для АСМ-индентирования нативных нейронов были применены АСМ-зонды трех различных типов: NITRA-TALL-V-G-(A) (AppNano, США), SNL-(D) и DNP-(C) (Bruker, США).

Расчет эффективного модуля Юнга (E) производился в рамках модели Снеддона, в которой форма острия АСМ-зонда аппроксимируется конусом [5] по формуле (1):

$$E = \frac{3\pi}{8} \frac{F_S}{\text{tg}\alpha * \delta^2} \quad (1)$$

где F_S – сила отталкивания зонда от образца, α – половинный угол раствора конического индентора, δ – величина деформации.

АСМ-исследования выявили отсутствие корреляции результатов измерений модуля Юнга нативных нейронов от таких параметров, как коэффициент жесткости консоли, длина консоли, длина зонда или материал зонда, и наличие обратной зависимости измеряемого модуля Юнга от параметра λ .

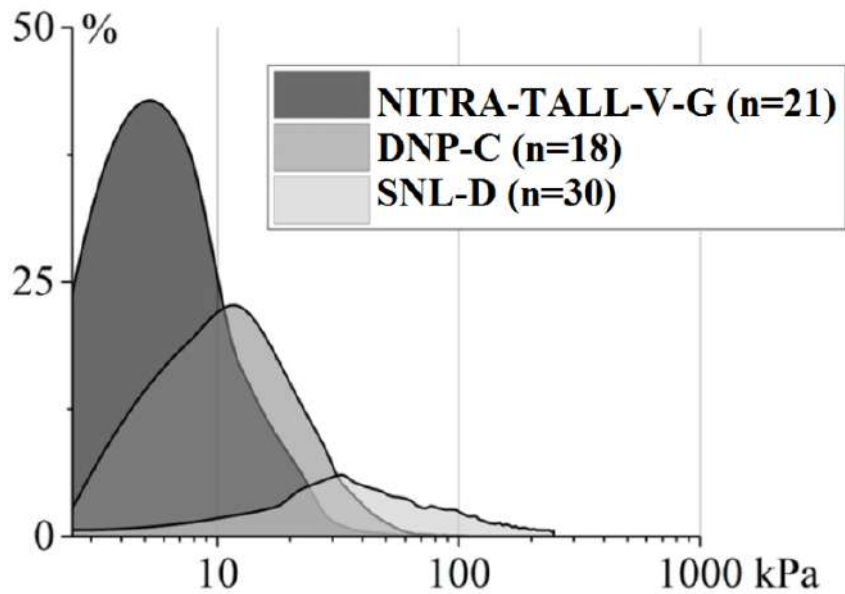


Рисунок 1 – Распределение средних значений измеренного модуля Юнга по сомат клеткам нативных нейронов при использовании кантилеверов NITRA-TALL-V-G-(A), DNP-(C) и SNL-(D). В каждом случае исследовано $n = 21, 18$ и 30 нейронов соответственно.

Данное наблюдение объясняется с помощью рисунка 2 и уравнения (2), выведенного автором работы на основе результатов, представленных в [6].

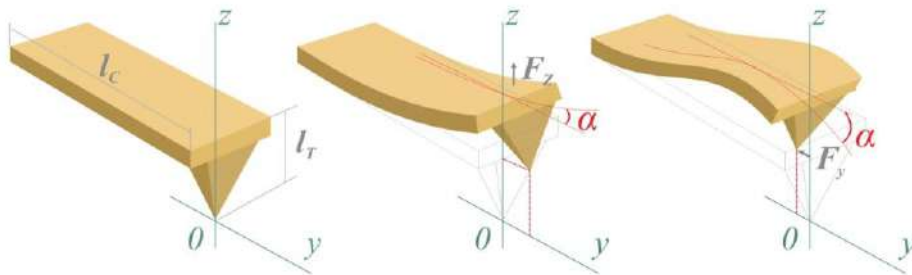


Рисунок 2 – Распределение нормальных и латеральных сил, воздействующих на АСМ-кантилевер при его изгибе.

$$\alpha = \frac{3}{2l_c k_c} (F_z + 2\lambda F_y) = \frac{3F_z}{2l_c k_c} (1 - 2\mu\lambda), \quad (2)$$

где α – угол отклонения конца консоли кантилевера, l_c – длина консоли кантилевера, k_c – коэффициент жесткости консоли кантилевера, F_y и F_z – силы действующие в направлении соответствующих координатных осей, λ – отношение высоты зонда l_T к l_c , μ – коэффициент трения.

В частности, наблюдаемая зависимость величины измеренного модуля Юнга от λ вызвана тем, что зонд не скользит по поверхности образца ($\mu >$

0), и поэтому с ростом λ падает α . Это приводит к падению кажущейся контактной жесткости и модуля Юнга образца. Как следует из выражения (2), вклад латеральной силы (трения) становится заметным, когда $F_z \sim \lambda F_y$, т.е. она существенно превышает нормальную силу, так как у обычных кантилеверов параметр λ много меньше единицы. В свете вышесказанного, детектируемое кажущееся упрочнение нативных нейронов как реакция на возмущающие факторы можно интерпретировать как существенное уменьшение трения в контакте системы АСМ-зонд–образец.

В четвертой главе описывается предложенная автором работы методика количественных АСМ-измерений механических параметров мягких объектов на примере исследования нативных фибробластов [4]. 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 последовательно устанавливается, что, во-первых, в среднем измеренный модуль Юнга нативных фибробластов не зависит или зависит не существенно от времени АСМ-сканирования, и не изменяется или изменяется несущественно 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.

При проведении описываемых в данной главе АСМ-экспериментов и АСМ-экспериментов, ранее описанных в других работах автора, был обнаружен особый вид артефактов АСМ-изображений, имеющий системный характер, пример которого представлен на рисунке 3.

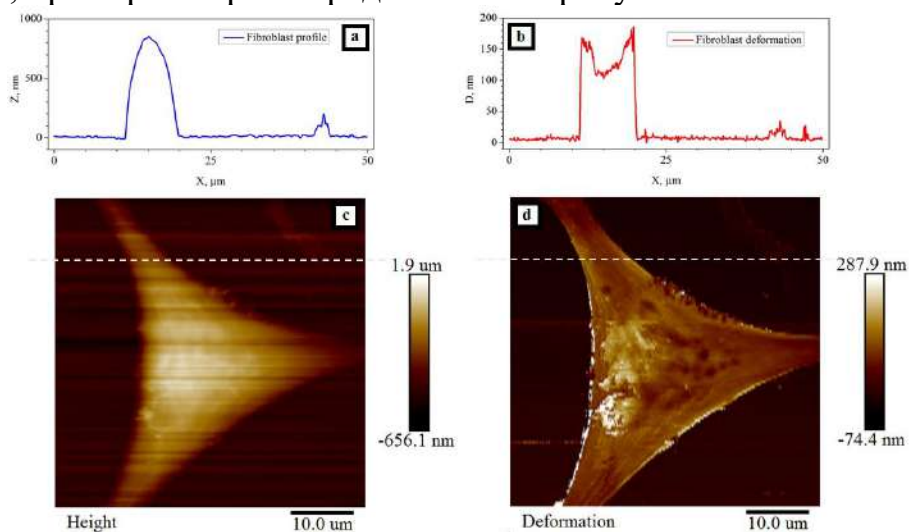


Рисунок 3 – АСМ-данные изучения интактного нативного фибробласта: а) поперечное сечение АСМ-карты распределения высоты, б) поперечное сечение АСМ-карты распределения деформации, в) АСМ-карта распределения высоты, д) АСМ-карта распределения деформации.

Описываемый артефакт характеризуется скачкообразным увеличением сигнала деформации на склонах интактного нативного фибробласта и связан с эффектом проскальзывания АСМ-зонда по поверхности изучаемого объекта в соответствии с теорией, изложенной в третьей главе. Важно отметить, что аналогичные артефакты присутствуют на АСМ-изображениях, опубликованных, например, авторами [7–9], однако, в этих работах не акцентировалось внимание ни на самих артефактах, ни на их значении.

В пятой главе представлены результаты исследования действия колхицина – вещества, являющегося алкалоидом трополонового ряда и способствующего деполимеризации тубулиновых микрофиламентов [10] – на нативные фибробласты. АСМ-исследование велось с помощью разработанных автором работы и описанных в третьей и четвертой главе методик интерпретации результатов АСМ-измерений. Также для дополнительной верификации полученных результатов был применен комплементарный АСМ метод конфокальной микроскопии.

Всего методом АСМ было исследовано 118 нативных фибробластов, 55 из которых были интактными контрольными, а 63 были культивированы в присутствии колхицина. В результате сортировки нативных фибробластов по принципу "скользящий-липкий" по отношению к материалу АСМ-зонда в соответствии с методиками, разработанными автором работы, и описанными в предыдущих главах, удалось установить, что 35 интактных контрольных нативных фибробластов и 36 нативных фибробластов, выращенных в присутствии колхицина, оказались скользкими по отношению к материалу АСМ-зонда; а 20 интактных контрольных нативных фибробластов и 27 нативных фибробластов, выращенных в присутствии колхицина, в свою очередь, оказались липкими по отношению к материалу АСМ-зонда. Среднее значение отношения эффективного модуля Юнга нативных фибробластов, выращенных в присутствии колхицина, к эффективному модулю Юнга интактных контрольных нативных фибробластов у нативных фибробластов, являющихся липкими по отношению к материалу АСМ-зонда, оказалось приблизительно на 7% больше, чем у нативных фибробластов, являющихся скользкими по отношению к материалу АСМ-зонда. Проведенный тест Манна-Уитни показал вероятность совпадения распределений $> 0,95$, что говорит об отсутствии статистической значимости отличия, но важно то, что это отличие может с равной долей вероятности быть вызвано как бóльшим упрочнением нативных фибробластов, выращенных в присутствии колхицина, и являющихся липкими по отношению к материалу АСМ-зонда, так и уменьшением коэффициента трения между их поверхностью и зондовым датчиком.

Результаты сравнения среднего измеренного модуля Юнга контрольных интактных нативных фибробластов и среднего измеренного модуля Юнга нативных фибробластов, культивированных в присутствии колхицина в концентрации 0,1 мкг/мл представлены в виде гистограммы на рисунке 4.

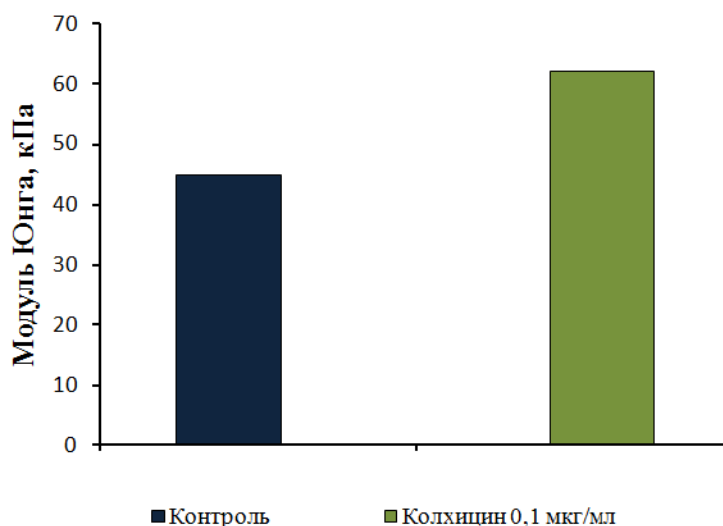


Рисунок 4 – Изменение среднего измеренного модуля Юнга нативных фибробластов после воздействия колхицина.

Однако, в работе [11], было продемонстрировано, что физиологическое состояние клеток предпочтительнее анализировать с помощью оценки величины измеренной деформации. Поскольку средние отношения измеренной деформации нативных фибробластов, выращенных в присутствии колхицина, к измеренной деформации интактных контрольных нативных фибробластов у нативных фибробластов, являющихся скользкими по отношению к материалу АСМ-зонда, и нативных фибробластов, являющихся липкими по отношению к материалу АСМ-зонда, приблизительно равны, то предполагается, что действие колхицина на нативные фибробласты заключается только в росте их ригидности.

В свою очередь, комплементарные исследования методом конфокальной микроскопии, в процессе проведения которых измерялась и сравнивалась интенсивность флуоресценции пятнадцати интактных контрольных нативных фибробластов и пятнадцати нативных фибробластов, выращенных в присутствии колхицина, в силу специфики технических особенностей данного метода прижизненно окрашенных стандартными красителями [12, 13], демонстрирует образование многочисленных актиновых микрофиламентов в нативных фибробластах после воздействия колхицина. Аналогичный результат наблюдался в работе [14], а схожее воздействие колхицина на другие клетки обсуждалось в [10].

Результаты сравнения интенсивности свечения контрольных интактных нативных фибробластов, нативных фибробластов, культивированных в присутствии колхицина в концентрации 0,1 мкг/мл, и нативных фибробластов, культивированных в присутствии колхицина в концентрации 1 мкг/мл, представлены в виде гистограммы на рисунке 5.

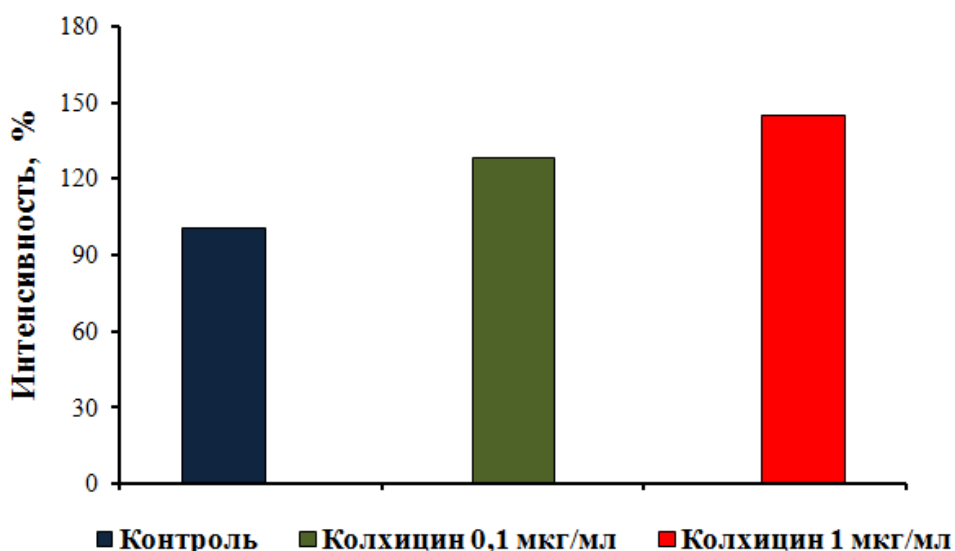


Рисунок 5 – Изменение интенсивности свечения актиновых волокон в фибробластах после воздействия колхицина. По оси ординат – средние значения интенсивности флуоресценции актина, %.

Полученный результат является свидетельством уплотнения актиновых волокон в нативных фибробластах в результате воздействия колхицина и объясняет наблюдаемый рост ригидности клеток и упрочнение их цитоскелета.

Серия проведенных экспериментов позволила установить, что применение колхицина неожиданно увеличивает модуль Юнга и уменьшает деформацию нативных фибробластов. Поскольку, основываясь на ранее продемонстрированных данных, можно считать фибробласты скользкими объектами, следовательно, наблюдаемое упрочнение является реальным, а не кажущимся, а результат – достоверным.

В заключении сформулированы основные результаты, выводы работы:

1. Разработаны и апробированы две новые методики атомно-силовой микроскопии, обеспечивающие адекватность измерений механических параметров мягких объектов (деформации, контактной жесткости, модуля Юнга): одна для среднестатистического анализа измеряемых параметров у группы однотипных объектов, вторая – для охарактеризации каждого отдельного объекта.

2. Показано, что АСМ-зонд залипает (защемляется) на среднестатистическом нативном нейроне и эритроците, а на большинстве фибробластов скользит. Как следствие, изменения сигнала эффективного модуля Юнга, E_A , могут отражать реальные вариации нормальной жесткости (твердости, ригидности) только в фибробластах. Для нейронов и эритроцитов такие изменения следует также связывать с увеличением (падением E_A) или уменьшением (рост E_A) трения в контакте. Результаты данного диссертационного исследования позволяют интерпретировать наблюдавшийся ранее рост E_A нейронов из-за воздействия убаина, ранее

связывавшийся с упрочнением клеток, уменьшением трения в контакте зонд-нейрон, вероятно связанного со снижением натяжения в нейронной сети как реакцией на убаин.

3. Выявлено уменьшение измеряемого в АСМ модуля Юнга E_A с ростом отношения высоты зонда к длине консоли при АСМ-исследовании Si- или Si₃N₄-зондами образцов нативных нейронов куриного эмбриона в жидкой питательной среде, что указывает на преобладание латеральных сил над нормальными в контакте зонд-образец. Таким образом, среднестатистический нативный нейрон оказывается липким объектом, что влечет за собой неоднозначность интерпретации результатов АСМ-измерений его механических параметров.

4. Установлено, что рост кажущейся деформации на наклонных участках однородного образца свидетельствует о проскальзывании на нем АСМ-зонда. Наблюдение данного эффекта при АСМ-исследовании нативных фибробластов позволяет не учитывать вклад латеральных сил в контакте зонд-образец по сравнению с нормальными и использовать значения контактной жесткости (либо деформации) для количественной охарактеризации образца. В частности, продемонстрировано уменьшение стандартного отклонения значений измеренного модуля Юнга у скользких нативных фибробластов по сравнению с липкими.

5. Опираясь на разработанные АСМ-методики для сортировки объектов исследования на липкие и скользкие (для среднестатистического и для индивидуального объекта) продемонстрировано побочное действие колхицина, ингибитора полимеризации тубулина в живых клетках, заключающееся в снижении податливости нативных фибробластов. Данный результат также был дополнительно подтвержден методом лазерной конфокальной микроскопии.

Цитируемая литература:

1. Kuznetsova T.G., Starodubtseva M.N., Yegorenkov N.I., Chizhik S.A., Zhdanov R.I. Atomic force microscopy probing of cell elasticity // *Micron*. 2007. V.38(8). P. 824–833.
2. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии. Учебное пособие для студентов старших курсов высших учебных заведений. Нижний Новгород: Российская академия наук, Институт физики микроструктур, 2004.
3. PeakForce QNM // Bruker [сайт] URL: <https://www.bruker.com/products/surface-and-dimensional-analysis/atomic-force-microscopes/modes/modes/imaging-modes/peakforce-qnm.html> (дата обращения: 25.04.2019).
4. В.Л. Быков. Цитология и общая гистология: Учебник – М.: Сотис, 2002. – 520С.

5. Sneddon I.N. The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile // Int. J. Eng. Sci. 1965. V. 3(1). P. 47–57.
6. ОСНОВЫ РАБОТЫ СКАНИРУЮЩЕГО ЗОНДОВОГО МИКРОСКОПА // НТ-МДТ СИ [сайт] URL: <https://www.ntmdt-si.ru/resources/spm-theory/theoretical-background-of-spm> (дата обращения: 28.04.2019).
7. Ефремов Ю.М. Исследование механических свойств клеток и структуры цитоскелета методами атомно-силовой микроскопии: дис. ... канд. биологич. наук. М. гос. университет им. М.В. Ломоносова, Биологический фак., Москва, 2014.
8. Quantitative Imaging of Living Biological Samples by PeakForce QNM Atomic Force Microscopy // Bruker Application Note #135. 2011. P. 1–10.
9. Drug-Induced Changes of Cytoskeletal Structure and Mechanics in Fibroblasts: An Atomic Force Microscopy Study // C. Rotsch, M. Radmacher - Biophysical Journal. 2000. V. 78. P. 520–535.
10. Liu L., Zhang W., Li L., Zhu X., Liu J., Wang X., Song Z., Xu H., Wang Z. // J. Biomech. 2018. V. 67. P. 84-90.
11. Халисов М.М., Анкудинов А.В., Пеннияйнен 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 // ПЖТФ. 2017. Т. 43. В. 4. С. 56-63.
12. Texas Red™-X Phalloidin // ThermoFisher SCIENTIFIC [сайт] URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/T7471> (дата обращения: 11.05.2019).
13. DAPI Solution (1 mg/mL) // ThermoFisher SCIENTIFIC [сайт] URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/62248> (дата обращения: 11.05.2019).
14. Jung H.I., Shin I., Park Y.M., Kang K.W., Ha K.S. // Mol. Cells. 1997. V. 7(3). P. 431–437.

Публикации автора по теме исследования:

Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК.

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.
2. Халисов М.М., Анкудинов А.В., Пеннияйнен 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.

3. Анкудинов А.В., Халисов М.М., Пенниайнен В.А., Подзорова С.А., Тимощук К.И., Крылов Б.В. Эффект длины зонда на кантилевере атомно-силового микроскопа в измерениях механических свойств нативных нейронов // Письма в Журнал технической физики - 2018. - Т. 44. - № 15. - С. 38-45.
4. Тимощук К.И., Халисов М.М., Пенниайнен 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.

Другие публикации.

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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 "Нанозифика и нанозлектроника" 13-16 марта 2017 г. - 2017. - Т. 1. - С. 337-338.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Халисов М.М., Тимощук К.И., Пенниайнен В.А. ОТВЕТ СЕНСОРНЫХ НЕЙРОНОВ НА ДЕЙСТВИЕ КОМЕНОВОЙ 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.

9. Тимошук 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, своб.

Благодарности

Автор работы искренне и глубоко благодарит своего научного руководителя д.ф.-м.н. Анкудинова Александра Витальевича за помощь в постановке задач, обсуждении результатов работы, совершенствовании формулировок текста диссертационной работы, плодотворное и интересное научное общение, ценные советы, способствовавшие профессиональному и личностному росту и развитию автора.

Также автор выражает благодарность Б.В. Крылову, С.А. Подзоровой, В.А. Пеннийнен, М.М. Халисову и другим сотрудникам и сотрудницам лаборатории физиологии возбудимых мембран Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, а также М.В. Самсонову и В.П. Ширинскому – сотрудникам Института экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса Министерства здравоохранения РФ.

Автор также благодарит А.О. Голубка, П.А. Белова, Я.Б. Музыченко и других сотрудников и сотрудниц кафедры нанофотоники и метаматериалов Университета ИТМО, а также Б.О. Щербина, И.А. Няпшаева, Г.И. Лобова, Т.Е. Тимошенко, К.А. Сысоева, А.А. Евстрапова, К.И. Белоусова, М.К. Ходзицкого, Д.А. Гомона, Н.С. Балбекина, А.А. Петрова, О.Н. Коршунову и А.А. Бобырь.

Тиражирование и брошюровка выполнены в учреждении
«Университетские телекоммуникации»
197101, Санкт-Петербург, Саблинская ул., 14
Тел. (812) 233 46 69.
Объем 1,0 у.п.л. Тираж 100 экз.

