

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения науки Институт
«Международный томографический центр» Сибирского
отделения Российской академии наук

Профессор РАН, д.ф.-м.н. Федин М.В.



9 апреля 2025

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук на диссертационную работу Кашник Анны Станиславовны «**Взаимодействие молекул лекарственных препаратов с модельными липидными мембранами по данным двойного электрон-электронного резонанса спиновых меток**», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.17 - химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества.

Актуальность темы диссертации определяется необходимостью глубокого понимания молекулярных механизмов взаимодействия лекарственных препаратов с биологическими мембранами. Такие взаимодействия играют ключевую роль в обеспечении терапевтической эффективности и безопасности лекарств, а также в развитии механизмов устойчивости у патогенных микроорганизмов. В этой связи, особое значение приобретают исследования антимикробных пептидов, как потенциальной альтернативы традиционным антибиотикам, и нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), известных своим влиянием на мембранные процессы. Кроме того, структура и свойства липидных рафтов, участвующих в регуляции клеточной активности, остаются предметом активных научных дискуссий и требуют выполнения дополнительных исследований с применением современных физико-химических методов. **Теоретическая значимость** диссертационной работы заключается в расширении фундаментальных представлений о механизмах взаимодействия малых молекул с липидными бислоями и роли мембранных структур в биологических эффектах лекарственных препаратов. Полученные автором данные позволяют более глубоко понять влияние антимикробных пептидов и нестероидных противовоспалительных препаратов на структурно-функциональные свойства мембран. Выявленные механизмы кластеризации, локализации и распределения молекул в мембране имеют большое значение для физико-химической теории мембранных взаимодействий и спин-зондовых методов их исследования. **Практическая значимость** диссертации заключается в разработке и применении экспериментальных подходов для количественного анализа распределения и поведения молекул лекарственных препаратов в липидных мембранах. Полученные результаты могут быть использованы для оценки влияния мембранных эффектов на фармакологические свойства препаратов, а также при разработке новых лекарственных средств с улучшенными профилями доставки и сниженной токсичностью. Кроме того, демонстрация

применимости метода двойного электрон-электронного резонанса (ДЭЭР) к мономеченым молекулам расширяет инструментарий биофизических исследований мембранных систем. **Научная новизна** диссертации заключается в получении новых экспериментальных данных о механизмах действия антимикробных пептидов и нестероидных противовоспалительных препаратов на липидные мембраны с использованием оригинального подхода, основанного на применении спин-меченых лекарств. Впервые применено сочетание методов ДЭЭР, ESEEM и усиления парамагнитной релаксации в ЯМР для количественного анализа распределения и локализации спин-меченых молекул в мембране. Получены данные, свидетельствующие о перераспределении стеариновых кислот под действием хальципорина, выявлена модель кластеризации лекарственных молекул по типу «шахматной шкатулки», показано влияние холестерина на локализацию ибупрофена, а также обнаружены признаки квазирегулярности внутренней структуры липидных рафтов. Эти результаты представляют собой существенный вклад в развитие молекулярной биофизики мембран. **Достоверность результатов**, представленных в диссертационной работе, основывается на использовании современных экспериментальных подходов, согласованности данных, полученных разными методами, их воспроизводимости и соответствии с имеющимися данными других исследований о взаимодействии лекарств с мембранами. Значимость работы признана мировым научным сообществом, что подтверждается публикациями в рецензируемых профильных международных журналах (8 публикаций), входящих в списки индексируемых базами данных Web of Science, Scopus и РИНЦ. Основные результаты работы докладывались на следующих международных и российских конференциях: VI Съезд биофизиков России 2019 (Сочи, Россия), Modern Development of Magnetic Resonance 2019, 2022 (Казань, Россия), Международная научная студенческая конференция 2020, 2021 (Новосибирск, Россия), XVIII Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии 2021, 2023 (Владивосток, Россия), Международная научная конференция «СОВРЕМЕННАЯ ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА - НА СТЫКЕ ФИЗИКИ, ХИМИИ И БИОЛОГИИ» 2021 (Черноголовка, Россия), X International Voevodsky Conference Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes 2022 (Новосибирск, Россия), SymBioSE 2023 (Копер, Словения). **Методология исследования** основана на использовании модельных липидных мембран, имитирующих ключевые структурные свойства биологических мембран. В качестве объектов использовались мембраны, сформированные из липидов POPC, DPPC, DOPC, DHPC и DMPC. Основным методом исследования является спектроскопия двойного электрон-электронного резонанса, позволяющая получать информацию о межспиновых расстояниях в нанометровом диапазоне. Дополнительно использовались методы стационарного ЭПР, ESEEM и ЯМР-спектроскопия с усилением парамагнитной релаксации. Комплексное применение методов ESEEM и ЯМР с использованием спиновых меток позволило локализовать исследуемые молекулы в мембране с высоким пространственным разрешением. Применение высокочувствительных методик позволило работать с крайне низкими концентрациями веществ (~0,2 мол%), что приближает условия эксперимента к физиологическим и повышает релевантность полученных данных.

Диссертация имеет традиционную структуру, состоящую из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения результатов (4 главы), основных результатов и выводов, списка сокращений, списка литературы и приложения. Полный объем диссертации составляет 143 страницы с 83 рисунками. Список литературы включает 217 наименований.

Введение диссертационной работы содержит обоснование актуальности темы, формулировку цели и задач исследования, описание научной новизны, теоретической и практической значимости полученных результатов. Во введении отражены положения, выносимые на защиту, структура и объем работы, апробация результатов и личный вклад автора. Также введение содержит оценку достоверности полученных данных и их соответствие современному уровню научных исследований.

Целью диссертационной работы является изучение методом ДЭЭР и некоторыми другими методами (другие варианты ЭПР, метод ЯМР) процессов связывания и взаимодействия МАП и НПВП с модельными биологическими мембранами, а также установление влияния липидных рафтов на это взаимодействие.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Исследование наноразмерного пространственного распределения спин-меченых стеариновых кислот в модельных мембранах разного типа с использованием метода двойного электрон-электронного резонанса.
2. Получение данных об изменении наноразмерного пространственного распределения спин-меченых стеариновых кислот в присутствии МАП хальципорина методом ДЭЭР, обсуждение возможных молекулярных механизмов действия хальципорина на мембраны бактерий.
3. Определение локализации спин-меченых молекул ибупрофена и диклофенака в модельной биологической мембране с помощью метода модуляции огибающей сигналов электронного спинового эха (ESEEM).
4. Определение расположения спин-меченых и немеченых молекул ибупрофена и диклофенака в модельных биологических мембранах с помощью метода усиления парамагнитной релаксации в ядерном магнитном резонансе, сравнение с данными, полученными методом ESEEM.
5. Получение данных о взаимном пространственном расположении молекул спин-меченых НПВП модельных биологических мембранах методом ДЭЭР, обсуждение возможных моделей пространственного распределения.
6. Изучение влияния липидных рафтов на кластеризацию и локализацию НПВП в модельных мембранах.

Глава 1 посвящена литературному обзору. В ней рассмотрены фундаментальные сведения о строении, свойствах и функциях биологических мембран, приведены характеристики антимикробных пептидов, в том числе мембраноактивных, а также таких нестероидных противовоспалительных препаратов, как ибупрофен и диклофенак. Обсуждается роль холестерина и липидных рафтов в структурной организации мембран и их участии во взаимодействии с лекарственными молекулами. Значительное внимание уделено современным спектроскопическим методам, применяемым в работе: стационарный ЭПР, ДЭЭР, ESEEM и ЯМР с усилением парамагнитной релаксации.

В **Главе 2** изложены сведения об объектах исследования, методах приготовления модельных мембран и условиях проведения экспериментов. Приведены данные по составу липидных смесей и концентрациям спин-меченых добавок, используемых в экспериментах. Описаны подходы к подготовке образцов для ЭПР- и ЯМР-измерений, включая параметры заморозки, условия гидратации и температуры измерений. Также подробно представлена информация об используемом оборудовании: спектрометре электронного парамагнитного

резонанса Bruker Elexsys E580 и ЯМР-спектрометре Avance III HD 500. Указаны параметры работы приборов и режимы регистрации данных для разных методов. Раздел содержит необходимые сведения для воспроизведения экспериментов и оценки корректности полученных данных.

Глава 3 посвящена исследованию влияния антимикробного пептида хальципорина на пространственное распределение спин-меченых стеариновых кислот в липидных бислоях. С помощью метода ДЭЭР автору удалось обнаружить, что даже при крайне низких концентрациях (~0,01 мол%) хальципорин индуцирует латеральную перегруппировку жирных кислот, встроенных в мембрану. Было сделано предположение, что это перераспределение может служить одним из возможных механизмов антимикробного действия пептида. Полученные результаты указывают на высокую чувствительность мембран к присутствию пептида, что может иметь важное значение при разработке новых терапевтических подходов с использованием антимикробных пептидов.

Глава 4 посвящена исследованию локализации спин-меченых молекул ибупрофена и диклофенака в липидных бислоях различного состава. Для этого автор использует комбинацию методов ESEEM и усиления парамагнитной релаксации в ЯМР, что позволило получить полную картину пространственного размещения спиновых меток в мембране. Было показано, что в отсутствие холестерина ибупрофен преимущественно локализуется в гидрофобной части бислоя, тогда как при добавлении холестерина он смещается в область, близкую к полярным головкам липидов. Такой сдвиг указывает на важную роль мембранного микроокружения в определении поведения лекарственных молекул и может быть критически значимым для понимания их механизма действия и побочных эффектов.

Глава 5 посвящена анализу наноразмерного пространственного распределения и кластеризации спин-меченых молекул ибупрофена и диклофенака в модельных липидных мембранах. С помощью метода ДЭЭР автор получила количественные зависимости кластеризации от концентрации лекарственных молекул. Было установлено, что распределение спин-меченых молекул в мембране можно описать моделью «шахматной шкатулки», предполагающей попеременное чередование кластеров в противоположных слоях бислоя. Этот результат демонстрирует способность лекарственных молекул к самоорганизации в мембране и подчеркивает важность учета кластеризации при интерпретации мембранных эффектов препаратов.

Глава 6 посвящена изучению влияния липидных рафтов на пространственное распределение и кластеризацию спин-меченых молекул ибупрофена и диклофенака в модельных мембранах. Используя метод ДЭЭР, автор продемонстрировала, что в присутствии холестерина в определенных концентрациях происходит образование квазирегулярных супрамолекулярных структур с параметром порядка 3 нм. Эти структуры формируются за счет захвата спин-меченых молекул липидными рафтами. Полученные данные подтверждают не только существование липидных рафтов, но и наличие их внутренней подструктурной организации. Результаты имеют фундаментальное значение для понимания физико-химических основ формирования наноструктур в мембранах и их возможного участия в регуляции мембранных процессов.

Текст диссертационной работы завершается основными результатами и выводами, списком сокращений и условных обозначений, списком цитируемой литературы. Материалы работы представлены достаточно подробно; приведение данных в виде разнообразных таблиц и рисунков помогает восприятию полученных результатов. Материал диссертации изложен

хорошим, понятным языком. Личный вклад автора не вызывает сомнений. Автореферат в достаточной степени передает содержание диссертационной работы.

При прочтении текста диссертационной работы возникли следующие вопросы:

1) Ярким результатом работы является экспериментальное наблюдение переориентации подкластеров стеариновых кислот, индуцированной добавлением хальципорина в липидных бислоях в очень малых концентрациях (соотношение пептида к липиду, при котором проявляется эффект, составляет П/Л $\sim 1:10000$). При этом, в работе Сыряминой В.Н. с соавторами (*V. N. Syryamina, N. E. Sannikova, M. De Zotti, M. Gobbo, F. Formaggio, S. A. Dzuba, Tylopeptin B peptide antibiotic in lipid membranes at low concentrations: Self-assembling, mutual repulsion and localization // Biochim. Biophys. Acta. Biomembr. – 2021. – V. 1863, No. 9. – P. 183585*) аналогичный эффект на схожем пептиде тилопептин В наблюдался при концентрациях П/Л $\sim 1:1000$, что в 10 раз больше, чем в настоящей работе. Можно ли как-то объяснить полученные различия в требуемых концентрациях исходя из структурных особенностей хальципорина и тилопептина?

2) На временных зависимостях сигнала спада ДЭЭР при различном содержании хальципорина в бислое ПОРС (например, рисунок 40, рисунок 8П) можно заметить, что укол наклона кривой отличается на начальных временах спада (до 50 нс) и далее. Связанно ли это с какими-то инструментальными особенностями эксперимента? Или наблюдаемая разница в наклонах кривой отражает свойства исследуемого объекта и может быть интерпретирована как признак неоднородного распределения по расстояниям спин-меченных стеариновых кислот в бислое ПОРС?

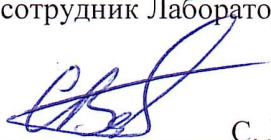
Содержание диссертации и автореферата соответствуют паспорту специальности 1.3.17. «Химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества» в части пункта 1 «химическая и спиновая динамика элементарных процессов, экспериментальные методы исследования структуры и динамики химических превращений» и в части пункта 5 «химические механизмы реакций и управление реакционной способностью, спиновая динамика и спиновая химия, экспериментальные методы исследования химической, энергетической и спиновой динамики».

Отзыв на диссертационную работу Кашник Анны Станиславовны «Взаимодействие молекул лекарственных препаратов с модельными липидными мембранами по данным двойного электрон-электронного резонанса спиновых меток» заслушан и утвержден на общеинститутском научном семинаре МТЦ СО РАН 8 апреля 2025 (Протокол № 3, от 8 апреля 2025г.)

Диссертационная работа Кашник Анны Станиславовны на тему «Взаимодействие молекул лекарственных препаратов с модельными липидными мембранами по данным двойного электрон-электронного резонанса спиновых меток» является цельным законченным исследованием, содержит достоверные новые результаты, по своей новизне, актуальности, практической и теоретической значимости соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук, а ее автор, А.С. Кашник, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.17 — химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества.

Отзыв подготовил:

Доктор физико-математических наук по специальности 1.4.4 — физическая химия, ведущий научный сотрудник Лаборатории ЭПР спектроскопии МТЦ СО РАН



С. Л. Вебер

Контактные данные

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Институтская, 3а

Сайт: <https://www.tomo.nsc.ru/>

Телефон: +7 (383) 333-14-48

Адрес электронной почты: itc@tomo.nsc.ru

*Юрий С. Л. Вебера
заверяю*



*Ученый секретарь МТЦ СО РАН
А. К. Н. З. В. Романенко*

9.25 