

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

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

Диссертация А.С.Кашник посвящена разработке экспериментальных подходов к использованию современных методов импульсной спектроскопии ЭПР (с акцентом на метод двойного электрон-электронного резонанса - ДЭЭР) для получения информации о молекулярных механизмах взаимодействия ряда широко используемых в практической медицине лекарств с модельными липидными мембранами. Использование в работе спин-меченых реагентов позволило не только использовать метод ЭПР для решения этих задач, но и дало возможность проводить исследование при низких концентрациях лекарственных препаратов, сопоставимых с терапевтическими дозами. Основной целью диссертационной работы являлась разработка методических приемов к исследованию структурных превращений биомолекул в диапазоне коротких (~1 нм) расстояний, происходящих при взаимодействии нескольких классов популярных лекарственных препаратов (ибупрофен, диклофенак, хальципорин) с липидными мембранами. Можно согласиться с автором диссертационной работы в том, что изучение молекулярных механизмов взаимодействия лекарственных препаратов с биологическими мембранами – важное и актуальное направление современных исследований в областях биохимии и биофизики, связанных с медициной.

Общий объем диссертации Кашник А.С. составляет 142 страницы, работа включает 69 рисунков и состоит из следующих разделов: введение, шесть глав, основные результаты и выводы, список сокращений, благодарности, список литературы из 217 наименований и приложение. Структура диссертации соответствует требованиям ВАК России.

Во введении приведено обоснование актуальности работы, сформулированы цели и задачи исследования, отражена научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, описаны методология и методы исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту, обозначен личный вклад автора и приведены сведения об апробации результатов с обоснованием степени их достоверности. Приведены данные о публикациях по теме диссертации и обосновано ее соответствие специальности 1.3.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества. Представлены также сведения о структуре и объеме диссертационной работы.

Первая глава является литературным обзором, состоящим из двух существенно различных тематических разделов. В первом разделе приведены достаточно подробные сведения о функциях биологических мембран, их составе и строении. Рассмотрен состав и области практического использования двух классов лекарственных препаратов – антимикробных пептидов (АМП) и нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП). Обоснован выбор хальципорина А (АМП) и ибупрофена и диклофенака (НПВП) в качестве основных объектов исследования при выполнении диссертационной работы – именно изучение поведения этих спин-меченых соединений в процессах взаимодействия их с модельной липидной мембраной являлось одной из основных целей настоящей работы. В этом же блоке дано описание состава и строения входящего в состав клеточных мембран холестерина, рассмотрена его роль в поддержании структуры мембран и достаточно подробно рассмотрено возможное строение так называемых липидных рафтов, участвующих в формировании доменной структуры липидного монослоя, и их функции в клетке. Во втором разделе литературного обзора рассмотрены физические основы как стационарного метода ЭПР, так и реализации целого ряда импульсных его методик. Обсуждаются возможности ДЭЭР для получения информации о взаимном расположении исследуемых спин-меченых объектов в нанометровом диапазоне расстояний, важном для изучения биомолекул.

Вторая глава является описанием экспериментальной части работы, включающей подробное описание процедуры синтеза модельных липидных мембран, описание структур использованных в работе реагентов и их спин-меченых аналогов. Описано использованное для измерений методом ЭПР оборудование и условия проведения таких экспериментов. Подробно описаны параметры трехимпульсных последовательностей, использованных для проведения измерений с использованием ДЭЭР и ESEEM.

Третья глава посвящена описанию экспериментальных результатов полученных для процессов взаимодействия лекарственного препарата хальципорина А с модельными фосфолипидными мембранами, часть которых была модифицирована спин-мечеными стеариновыми кислотами. Целью этих экспериментов являлась оценка пространственного распределения спин-меченых стеариновых кислот в мембранах и влияния на эту характеристику введения АМП хальципорина А. Анализ кинетики спада сигнала ДЭЭР от спин-меченых стеариновых кислот для двух типов фосфолипидных бислоев (обозначаемых как POPC и DOPC/DPPC) позволили автору сделать вывод о причинах различий (более упорядоченное двумерное распределение в случае DOPC/DPPC и квазитрехмерное распределение в случае POPC) в межмолекулярной упаковке стеариновых кислот в этих системах. Интересные данные получены при оценке

локальных концентраций двух типов спин-меченых стеариновых кислот в исследованных системах, свидетельствующие о различиях в их кластерировании в исследованных мембранах. Существенным полученным в этой главе результатом можно считать выявленные особенности пространственного распределения нанокластеров стеариновых кислот при введении в исследуемую систему АМП хальципорина А.

Четвертая глава посвящена изучению локализации спин-меченых молекул НПВП (ибупрофена и диклофенака) в изучаемых модельных мембранах. В этой главе достаточно подробно описана подготовка образцов для проведения запланированных измерений методами ESEEM и ЯМР, обосновано использование спин-меченого аналога ибупрофена содержащего нитроксильную метку в третьем положении бензольного кольца. На основе полученных при комнатной температуре спектров стационарного ЭПР был сделан вывод о том, что для использованных в работе концентраций этого соединения независимо от способа приготовления происходит его встраивание в липидные мембраны, а из данных о сравнении интенсивности сигнала ESEEM от него с вводимыми в систему спин-мечеными соединениями с различным положением спиновой метки сделан логичный вывод о локализации ибупрофена в гидрофобной части мембраны. Аналогичные результаты были получены и при изучении особенностей локализации спин-меченых молекул диклофенака.

Пятая глава включает результаты исследования тех же спин-меченых молекул НПВП в липидных мембранах методом ДЭЭР с целью получения данных об их пространственном расположении при стабилизации в исследованных мембранах и возможном их кластерировании. Интересны полученные из анализа спада сигналов ДЭЭР данные о возможном двумерном пространственном их распределении в исследованной мембране и характере их кластеризации с попеременным чередованием кластеров в противоположных слоях бислоя.

Шестая глава посвящена исследованию поведения тех же спин-меченых молекул ибупрофена и диклофенака в модельных фосфолипидных мембранах состава DOPC/DPPC (расшифровка этих обозначений приведена в разделе Список сокращений) модифицированных холестерином. Целью таких экспериментов являлась возможность обнаружения в таких системах особенностей в пространственной организации ансамблей использованных спиновых меток, связанных (при достаточно высоких концентрациях холестерина в системе) с появлением известных из литературы и достаточно лабильных субструктур, называемых липидными рафтами. Важным и интересным результатом исследования методом ДЭЭР систем типа DOPC/DPPC-холестерин является обнаружение в них особенностей кластеризации спин-меченых молекул НПВП, связанных с

возможным появлением в исследуемых системах упорядоченной сверхрешетки с характерным параметром около 3 нм.

Наиболее важными и новыми результатами, полученными в диссертационной работе Кашник А.С. являются:

1. Методические подходы разработанные для использования методов спектроскопии ЭПР (стационарный ЭПР, импульсный ЭПР, ЯМР) к получению информации о взаимодействии нескольких классов лекарственных препаратов с липидными мембранами.

2. Обнаружение с использованием этих подходов диапазона условий, в которых даже низкие (фактически, терапевтические) дозы вводимых лекарственных соединений могут приводить к существенной их кластеризации в мембранах с образованием упорядоченных в нанометровом диапазоне структур.

3. Крайне интересно предполагаемое на основе анализа данных ДЭЭР образование в содержащих холестерин модельных мембранах упорядоченных сверхрешеток, связываемое с появлением достаточно лабильных субструктур, называемых липидными рафтами.

Особо следует подчеркнуть серьезное методическое значение работы связанное, в значительной степени, с развитием работ по использованию метода ДЭЭР для исследования важных для биомедицины и фармакологии классов объектов. Разработанные автором подходы достаточно универсальны и могут быть использованы для изучения процессов пространственного кластерирования в нанометровом диапазоне расстояний и в других типах биосистем.

При чтении диссертационной работы возникли следующие замечания:

1. Основной вывод о месте локализации спин-меченых молекул ибупрофена и диклофенака (Глава 4) сделан на основе различий в амплитуде сигнала ESEEM по сравнению с тестовыми образцами. Следовало обозначить возможный экспериментальный разброс в определении этого параметра и наличие факта его воспроизводимости в различных экспериментах.

2. Имело бы смысл более подробно разъяснить взаимосвязь полученных при 200 К в главе 6 результатов (на основе анализа данных ДЭЭР) о появлении в исследуемых системах сверхрешеток с возможным существованием при физиологических температурах так называемых липидных рафтов.

Указанные замечания не снижают общую высокую оценку диссертационной работы.

Название работы соответствует ее содержанию, автореферат и опубликованные статьи правильно и полно отражают содержание диссертации. Основные материалы

диссертации опубликованы в виде 8 статей в высокорейтинговых журналах. Результаты работы прошли апробацию в виде многочисленных докладов на международных и российских конференциях. Автор диссертационной работы продемонстрировал, что он является сформировавшимся исследователем, способным ставить и решать значимые научные задачи в областях химической физики и биофизики.

Считаю, что диссертационная работа «Взаимодействие молекул лекарственных препаратов с модельными липидными мембранами по данным двойного электрон-электронного резонанса спиновых меток» полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, в том числе отвечает критериям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года (в действующей редакции), а ее автор, Кашник Анна Станиславовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.17 – Химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества.

Официальный оппонент:

Володин Александр Михайлович

доктор химических наук, специальность

02.00.15 – химическая кинетика и катализ

доцент, ведущий научный сотрудник отдела

материаловедения и функциональных материалов

ФГБУН ФИЦ Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН

Адрес:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

«Федеральный исследовательский центр «Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук» (ИК СО РАН)

630090, г. Новосибирск, пр. Акад. Лаврентьева. 5

Тел. +7(383)3269-421

Электронная почта: volodin@catalysis.ru

07.04.2025 г.

Согласен на включение моих персональных данных в документы, связанные с работой диссертационного совета и их дальнейшую обработку.



Володин А.М.

07.04.2025

Подпись д.х.н. Володина А.М. удостоверяю

Ученый секретарь ИК СО РАН, д.х.н.



Дубинин Ю.В.