

## СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 720.001.06  
в Международной межправительственной организации  
Объединенный институт ядерных исследований

№250 от 28 января 2019 года

### Присутствовали:

Зам. председателя совета: Аксенов В.Л. доктор физ-мат. наук 01.04.07  
Ученый секретарь совета: Попеко А.Г. кандидат физ-мат. наук 01.04.16

### Члены совета:

Авдеев М.В.	доктор физ-мат. наук	01.04.07
Алексеев П.А.	доктор физ-мат. наук	01.04.07
Апель П.Ю.	доктор физ-мат. наук	01.04.01
Балагуров А.М.	доктор физ-мат. наук	01.04.07
Белушкин А.В.	доктор физ.-мат. наук	01.04.07
Гикал Б.Н.	доктор тех. наук	01.04.01
Гледенов Ю.М.	доктор физ-мат. наук	01.04.16
Голвков М.С.	доктор физ-мат. наук	01.04.16
Джолос Р.В.	доктор физ-мат. наук	01.04.16
Изосимов И.Н.	доктор физ-мат. наук	01.04.01
Пенионжкевич Ю.Э.	доктор физ-мат. наук	01.04.16
Плакида Н.М.	доктор физ.-мат. наук	01.04.07
Скуратов В.А.	доктор физ-мат. наук	01.04.01
Тер-Акопьян Г.М.	доктор физ-мат. наук	01.04.16
Утенков В.К.	доктор физ-мат. наук	01.04.16
Шабалин Е.П.	доктор физ.-мат. наук	01.04.01

**Аксенов В.Л.:** Рассматриваем защиту диссертации Горшковой Юлией Евгеньевной «Структура и взаимодействие липидных мембран в присутствии ионов кальция и полярных молекул по данным малоуглового рассеяния» на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.07

– Физика конденсированного состояния.

На заседании присутствуют 18 из 23 членов совета, в том числе 6 докторов наук по профилю диссертации.

Научный руководитель – Горделий Валентин Иванович, кандидат физико-математических наук, консультант Лаборатории нейтронной физики имени И.М. Франка Объединенного института ядерных исследований. Официальные оппоненты: Чупин Владимир Викторович, доктор химических наук, заведующий кафедрой биофизики, заведующий лабораторией химии и физики липидов Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)» и Петухов Максим Владимирович, и.о. старшего научного сотрудника Федерального государственного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской Академии Наук – присутствуют на заседании.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского Центра «Курчатовский Институт».

Предоставляю слово ученому секретарю для оглашения личного дела соискателя.

**Попеко А.Г.:** Соискатель Горшкова Юлия Евгеньевна Горшкова Ю.Е. начала свою работу в Лаборатории нейтронной физики имени И.М. Франка Объединенного института ядерных исследований (ЛНФ ОИЯИ) в качестве студентки в группе ЮМО с 1996 года. Выполненная в ЛНФ ОИЯИ дипломная работа была успешно защищена в Тульском Государственном Педагогическом Университете им. Л.Н.Толстого (ТулГПУ) в 1997 году. С 1997 г. по 2000 г. она обучалась в аспирантуре при ТулГПУ, одновременно была командирована в ЛНФ ОИЯИ, где работала в качестве прикомандированного сотрудника. В ЛНФ ОИЯИ Ю.Е. Горшкова работала на должности младшего научного сотрудника с 2000 г. по 2011 г., в 2011 г. переведена на должность научного сотрудника НЭО НИКС. В период с 06.08.2013 г. по 05.08.2016 г. являлась соискателем ОИЯИ по специальности 01.04.07 - физика конденсированного состояния.

**Аксенов В.Л.:** Слово предоставляется соискателю.

**Горшкова Ю.Е.:** Уважаемые члены диссертационного совета, тема моего доклада по материалам диссертации «Структура и взаимодействие липидных мембран в присутствии ионов кальция и полярных молекул по данным малоуглового рассеяния».

Биологическая мембрана – сложная, комплексная система, структурной основой которой является фосфолипидный бислой, который в свою очередь выполняет значимую роль в важнейших физиологических процессах, представленных на слайде. Несмотря на многочисленные исследования структуры, межмембранные взаимодействия, до сих пор остается нерешенным ряд фундаментальных вопросов, а в частности локализация воды и/или органических растворителей в мембране, распределение ионов на ее поверхности, изменение структурных параметров самих мембран, а так же межмембранных взаимодействий. Молекула фосфатидилхолина, из которых формируется данный бислой, является амфифильной, то есть имеет гидрофильную голову и гидрофобный хвост.

Обладая такой природой, при попадании в воду молекулы самоорганизуются таким образом, что формируются замкнутые мультислойные структуры, где бислои разделены водной прослойкой. Используя ультразвук или экструдирование, например, можно получить однослойные везикулы, где уже один липидный бислой разделяет внутривезикулярное пространство от внешней среды. Нужно сказать, что в зависимости от температуры или каких-либо других факторов этот бислой может иметь различную структуру, которая определяется прежде всего положением углеводородных «хвостов» относительно плоскости мембраны. В зависимости от температуры выделяют кристаллическую, гелевую и жидкокристаллическую фазы. В присутствии в системе ионов или органических молекул структура этих слоев так же может изменяться.

Отсюда были сформулированы цели работы. Это исследование влияния полярных молекул (сульфоксидов) и катионов на структуру и свойства мембран; определение роли электростатического отталкивания в случае ионов кальция или гидрофобного взаимодействия в случае сульфоксидов ДМСО и ДЭСО в балансе сил межмембранного взаимодействия. Для решения поставленных целей были

сформулированы следующие задачи: первое - определение температуры основного фазового перехода мембран в присутствии ионов кальция и сульфоксидов; второе – изучение перехода мультислойных мембран в, так называемое, «несвязное» состояние, индуцируемое увеличением концентрации ионов кальция и определение ряда физико-химических параметров в области этого перехода. Кроме того, была поставлена задача проведения сравнительного анализа влияния сульфоксидов на структуру мембран; исследование процесса слияния мембран в присутствии ионов кальция и сульфоксидов.

Структура работы представляет собой список основных сокращений и обозначений, введение, четыре главы, заключение и список цитируемой литературы. Первая глава посвящена литературному обзору, где описан предмет исследования, связанный с темой диссертации. В частности рассмотрены межмембранные взаимодействия, которые изначально описывались теорией устойчивости дисперсных систем, известной как теория ДЛФО, которая включает в рассмотрение две силы: дальнедействующие силы притяжения Ван-дер-Ваальса и силы электростатического отталкивания. Однако оказалось, что для мембран при сближении, то есть уменьшении водной прослойки между ними, теория ДЛФО межмембранные взаимодействия не описывает и для этого были предложены, так называемые, структурные силы отталкивания: дальнедействующая ондуляционная, вызванная флуктуациями мембран; короткодействующая гидратационная, вызванная сольватацией головной группы водой; и короткодействующая стерическая, возникающая в результате выступа отдельных молекул или изменения конформации головных групп липидных молекул.

Глава два освещает материалы и методы, используемые в диссертационной работе.

Нужно сказать, что основные результаты, представленные в диссертации, получены с помощью метода малоуглового рассеяния нейтронов. Эксперименты проводились на спектрометре малоуглового рассеяния нейтронов ЮМО, расположенном на четвертом канале реактора ИБР-2. Эксперименты проводились в двух-детекторной конфигурации, что позволило существенно расширить диапазон по переданному импульсу. Поток на образце в случае тепловых нейтронов составлял

от  $5 \times 10^6$  до  $2.6 \times 10^7$  н/(см<sup>2</sup>сек). Еще одним важным параметром малоугловых спектрометров является разрешение по переданному импульсу. На установке ЮМО этот параметр составляет от 5 до 20 процентов.

В работе так же представлены результаты, полученные с помощью дифракции рентгеновского излучения. Эксперименты проводились на дифрактометре ДРОН-4 в конфигурации для исследования мембран. Сканирование проводилось в геометрии тета-2-тета в горизонтальной плоскости. Купрум-анодная трубка с длиной волны 1.54 ангстрем использовалась в качестве источника рентгеновских лучей. Здесь показана типичная картина, получаемая на дифрактометре.

Далее в этой главе так же представлен анализ данных МУРН. Как известно, рассеяние от монодисперсных centrosymmetric частиц включает в себя как квадрат форм-фактора, так и структурный фактор. Для наших систем, которые состоят только из однослойных везикул, которые являются сильно разбавленными и слабо взаимодействующими частицами, мы работаем в условии избытка воды, структурный фактор можно принять равным единице. Тогда из приближения Кратки-Порода можно определить радиус гирации и его пересчитать в толщину липидного бислоя. Но, к сожалению, не всегда удастся получить систему, которая состоит только из однослойных везикул, могут быть включены и многослойные везикулы. Поэтому для описания такой системы, которая является комплексной, состоит из однослойных и многослойных везикул, предложена была следующая модель, которая включает в себя функцию для описания рассеяния от однослойных везикул и так же сделан учет рассеяния от многослойных везикул.

Третья глава посвящена изучению влияния ионов кальция на структуру и взаимодействия липидных бислоев.

В частности, было показано, что в избытке растворителя даже незначительное содержание ионов кальция 0.1 мМ приводит к увеличению температуры основного фазового перехода на один градус Цельсия. Данные получены с помощью аппроксимации функцией Больцмана экспериментальных данных малоуглового рассеяния, а в частности по зависимости периода повторяемости от температуры.

Известно, что добавление ионов кальция вызывает, так называемое, разбегание мультислоев на достаточно большие расстояния. Установлено, что уже 1 мМ ионов

кальция приводит к существенному разбеганию этих мультислоев как в гелевой, так и в жидкокристаллической фазах. Причем, было обнаружено, что вместе с этим переходом образуются однослойные везикулы с толщинами чуть больше, чем толщины приготовленных однослойных везикул с использованием метода экструдирования при тех же самых условиях. Таким образом, мы видим, что уже при добавлении 0.1 мМ кальция происходит переход из мультислойной системы в однослойную. Так же это хорошо видно и по малоугловым кривым рассеяния.

В частности, для определения концентрации этого перехода была проанализирована зависимость интегральной интенсивности дифракционного пика от концентрации ионов кальция. Так для образцов серии А-1, которые претерпевали фазовый переход из гелевой в жидкокристаллическую фазу определено, что критическая концентрация ионов кальция зависит как от фазового состояния, так и от концентрации липида. Установлена концентрация ионов кальция вблизи мембранной поверхности. Для образцов серии А-2, которые претерпевали фазовый переход из жидкокристаллической фазы в гелевую, такой зависимости обнаружено не было, то есть критическая концентрация не зависела от фазового состояния.

Используя концентрацию, которую мы вычислили для ионов, связанных с мембранной поверхностью, и изотерму адсорбции Ленгмюра были определены константы связывания ионов кальция с липидными молекулами в гелевой фазе и жидкокристаллической фазе. Используя уравнение Вант-Гоффа были определены изменение энтальпии и изменение энтропии этого перехода, что показывает, что связывание ионов кальция с мембраной является экзотермическим. Используя выражение для изменения энергии Гибса, мы показали, что связывание ионов кальция с мембраной – это самопроизвольная (экзергоническая) реакция.

По анализу толщин липидных мембран при увеличении концентрации кальция показано что, кальций связывается с кислородом, находящимся в фосфатной группе  $PO_4$ , происходит переориентация головной части липида от практически параллельного относительно плоскости мембраны в сторону межмембранного пространства как для одной серии образцов, так и для другой.

Кроме того, было изучено слияние фосфатидилхолиновых мембран, приготовленных в воде, с добавлением кальция. Из зависимости интегральной площади

от концентрации мы видим, что эти мультислойные структуры так же переходят в однослойные структуры при той же самой концентрации, как и наблюдалось для предыдущей системы, когда концентрация кальция была одинаковой и внутри, и вне мембраны. Кроме того, используя зависимость ширины дифракционного пика и периода повторяемости было определено, что при добавлении ионов кальция количество таких слоев уменьшается практически в два раза.

В четвертой главе освещены изменение структуры, свойств и взаимодействий липидных мембран в присутствии неводных полярных растворителей.

Одним из таких наиболее используемых растворителей является диметилсульфоксид, формула которого представлена здесь. Определено, что во всем диапазоне мольных долей диметилсульфоксида резко уменьшается период повторяемости мультислойных структур и, кроме того, в гелевой фазе наблюдается переход в фазу с взаимным проникновением хвостов при мольных долях более 0.9. При незначительном влиянии на толщину мембран уменьшается межмембранное расстояние и при 0.4 мембраны находятся в стерическом контакте, а это означает, что диметилсульфоксид вызывает уменьшение всех трех компонент структурных сил отталкивания. При дальнейшем увеличении мольной доли диметилсульфоксида было определено, что однослойные везикулы переходят в мультислойные структуры. Используя малоугловое рассеяние, в частности метод вариации контраста, было показано, что сульфоксид существенным образом дегидратирует мембранную поверхность. Было впервые определено, что на одну молекулу липида приходится 4 молекулы сульфоксида, а используя литературные данные для систем в воде без сульфоксида, можно заключить, что диметилсульфоксид приводит к разрушению сольватационной оболочки.

Однако следует заметить, что, несмотря на всю уникальность диметилсульфоксида, при больших концентрациях он является токсичным для многих клеток и поэтому было бы актуально найти какой-то другой растворитель, который обладал бы такими же замечательными свойствами, но проявлял их при меньших концентрациях. И одним из таких растворителей является диэтилсульфоксид, у которого на две  $\text{CH}_2$  группы больше, чем у исследованного ранее диметилсульфоксида, а это означает, что в этом случае гидрофобные взаимодействия могут вносить более су-

ществительный вклад в межмембранные взаимодействия.

Так, используя рентгеновскую дифракцию, было показано, что при мольной доли 0.2 исчезает предпереход, который характерен для мембран в воде, а это означает, что стабилизируется гелевая фаза. Так же определено, что основной фазовый переход происходит в более узком диапазоне, то есть более сильное взаимодействие сульфоксида с липидом наблюдается, а сам характер зависимости температуры фазового перехода от мольной доли носит экспоненциальный характер. С помощью метода малоуглового рассеяния нейтронов было обнаружено существенное уменьшение толщины липидного бислоя в обеих фазах и слияние мембран происходит при меньших мольных долях, чем это наблюдалось для диметилсульфоксида.

Предложена, по данным малоуглового рассеяния, модель слияния однослойных везикул. Эксперимент был достаточно простой. Бралась однослойные везикулы в воде и к ним добавлялся тот или иной сульфоксид с мольными долями 0.1 или 0.2. Показано, что в случае добавления ДМСО образуется комплексная структура, состоящая как из однослойных, так и из многослойных структур, при добавлении ДЭСО (0.2) везикулы полностью слипаются, а при концентрации 0.1 образуются и мультислои.

Однако температурные исследования показали, что эти структуры являются нестабильными. При увеличении периода повторяемости, толщины липидного бислоя было обнаружено уменьшение межмембранного расстояния и разрушение мультислойной структуры. Система при температуре фазового перехода превращалась полностью в однослойные везикулы и при увеличении температуры однослойные везикулы оставались стабильными.

В заключении сформулированы и представлены основные результаты и выводы работы.

Первое: ионы кальция и неводные полярные растворители увеличивают температуру основного фазового перехода ФХ мембран. В частности, установлено, что ДЭСО стабилизирует гелевую фазу, как и ДМСО, при концентрациях, определенных в работе.

Вторым выводом работы является то, что увеличение концентрации ионов



кальция приводит к непрерывному переходу мультислойных мембран из «связанного» состояния в «несвязанное» как гелевой, так и в жидкокристаллической фазе. Впервые из данных МУРН определены значения критических концентраций ионов кальция рассматриваемого перехода. Так же по данным МУРН предложен способ определения константы связывания ионов кальция с липидными молекулами и определен ряд физико-химических параметров в области перехода мультислойных везикул из «связанного» состояния в «несвязанное».

Третьим выводом работы является тот факт, что взаимодействие сульфоксид-липид вызывает дегидратацию липидного бислоя. Гидрофобный эффект наиболее выражен в случае ДЭСО. Различие этих двух растворителей состоит в том, что ДЭСО, в отличие от ДМСО, существенно уменьшает толщину липидного бислоя ФХ мембран. Так же впервые определено количество молекул ДМСО, сильно связанных с мембраной, а общий объем таких молекул 430 кубических ангстрем и объясняет ранее наблюдавшийся фазовый переход липидной мембраны в фазу с взаимным проникновением цепей.

Изучены спонтанные процессы. Установлено, что переход мультислойных везикул в однослойные в присутствии ионов кальция и однослойных везикул в многослойные в присутствии сульфоксидов происходят путем слияния ФХ мембран. В работе предложена модель, описывающая эти процессы, определены наиболее стабильные сформированные системы, а так же определены концентрации, при которых они образуются как для ионов кальция, так и для сульфоксидов.

Основные результаты работы были представлены в 24 докладах на российских и международных конференциях и совещаниях. По материалам диссертации опубликовано 6 статей в российских и международных рецензируемых научных журналах, индексируемых в системах Web of Science и SCOPUS и рекомендованных ВАК.

Благодарю Вас за внимание!

**Аксенов В.Л.:** Спасибо, прекрасный доклад, все четко и ясно. Пожалуйста, вопросы, замечания.

**Балагуров А.М.:** Вы могли бы пояснить что такое «связанные» и «несвязанные»

состояния?

**Горшкова Ю.Е.:** Вернемся к слайду, где это представлено. Известно, что для этих систем, когда они находятся в воде, мультислои находятся на определенном расстоянии друга от друга, приблизительно 60 ангстрем, таких слоев много и на кривых МУРН наблюдается дифракционный пик, а при увеличении концентрации ионов кальция межмембранное расстояние значительно увеличивается и такое состояние было названо «несвязанным» состоянием.

**Джолос Р.В.:** Расскажите подробнее, что такое гидрофобные взаимодействия.

**Горшкова Ю.Е.:** Взаимодействия между гидрофильной и гидрофобной поверхностями хорошо описываются теорией ДЛФО. В данной теории для описания межмембранных взаимодействий Дерягин ввел такое понятие как расклинивающее давление, которое равно разнице давлений на стенки мембраны и внутри межмембранного пространства. Если обе взаимодействующие между собой поверхности гидрофобные, то плотность воды вблизи поверхности меньше, чем в середине. В воде к тому же невыгодно взаимодействовать с не смачиваемой поверхностью, и она уходит из этого пространства. В результате чего расклинивающее давление будет отрицательным, две поверхности слипаются. Этот эффект был назван гидрофобным эффектом, а взаимодействия на макроуровне получило название гидрофобных взаимодействий. В случае взаимодействия двух гидрофильных поверхностей эффект противоположный. Уменьшение водной прослойки: резкое возрастание структурных сил отталкивания препятствует слипанию гидрофильных поверхностей. Я напомню, что в нашем случае молекула фосфатидилхолина имеет гидрофильную голову и гидрофобный хвост.

**Гледенов Ю.М.:** Скажите, пожалуйста, почему вы исследуете влияние кальция, а не какого-то другого элемента.

**Горшкова Ю.Е.:** Во-первых, кальций, как известно, представлен у нас в организме. Кроме того, он участвует в ключевых физиологических и биохимических процессах клетки и выполняет регуляторную и структурную функции. Среди регуляторной функции выделяют сигнальную, ферментативную и нейромышечную функции. Именно поэтому наиболее интересным является изучение ионов кальция. Вторым моментом является то, что ионы кальция были интересны с точки зрения

исследования непрерывного перехода мультислойных мембран в «несвязанное» состояние. Кроме ионов кальция таким же эффектом, но при больших концентрациях, 8 мМ, обладают двухвалентные катионы магния. Важно заметить, что в отличие от ранних работ здесь представлены данные в условиях избытка воды как в гелевой, так и в жидкокристаллической фазе, что интересно с физиологической точки зрения, поскольку все природные мембраны находятся именно в жидкокристаллической фазе.

**Пенионжкевич Ю.Э.:** Что такое монодисперсные centrosymmetric частицы? Это сферические частицы?

**Горшкова Ю.Е.:** Да, в первом приближении мы принимаем, что частицы являются сферическими.

**Пенионжкевич Ю.Э.:** Вы берете двухвалентный ион кальция  $\text{Ca}^{2+}$ ? Почему? Откуда известно, что ион кальция двухвалентный? А  $\text{Ca}^{3+}$  это плохо? Вы написали, чем больше заряд, тем больше адсорбция.

**Горшкова Ю.Е.:** Да, действительно Вы правильно заметили, чем больше заряд, тем больше адсорбция. Трехвалентные катионы будут сильнее адсорбироваться на поверхности. Одновалентные катионы, например калий, имеют меньшую на порядок константу связывания, слабее взаимодействуют с мембраной. Это было показано экспериментально методом изотермической калориметрией титрования – наиболее распространенный способ определения константы связывания.

**Пенионжкевич Ю.Э.:** Ваша работа больше расчетная или экспериментальная? Экспериментальная часть работы основана на применении малоуглового рассеяния нейтронов. Зачем использовалось рассеяние рентгеновских лучей?

**Горшкова Ю.Е.:** Нейтронное рассеяние – дорогостоящий метод, поэтому то, что можно получить из других методов мы применяем в исследованиях и это не только рассеяние рентгеновских лучей, но и другие методы.

**Шабалин Е.П.:** Как влияют фазовые переходы в мембране на клетки?

**Горшкова Ю.Е.:** Мы исследуем модельные системы, и все что нам известно из литературы по этому вопросу я представила в докладе. Нативная мембрана очень сложная система и не случайно свой доклад я начала с того, что биологическая мембрана – комплексная структура, состоящая из фосфолипидного бислоя, в кото-

рый встроены белки, холестерин, гликолипиды. Такие нативные мембраны с помощью метода малоуглового рассеяния нейтронов мы пока изучать не можем.

**Аксенов В.Л.:** Ответ более-менее очевидный – конечно, влияет. Другой вопрос, что это отдельная и большая тема для исследований. Еще вопросы?

**Белушкин А.В.:** Вы использовали в законе рассеяния формулу для сильно разбавленных систем без взаимодействия частиц. Поскольку у Вас все-таки не бесконечно разбавленная концентрация, то оценивали ли влияние взаимодействия частиц на полученные результаты?

**Горшкова Ю.Е.:** В данной работе влияние взаимодействия частиц не оценивалось.

**Апель П.Ю.:** Раз уж мы заговорили о двухвалентных ионах типа  $\text{Ca}^{2+}$ , то какой эффект ожидается от ионов  $\text{Mg}^{2+}$ ?

**Горшкова Ю.Е.:** Да, действительно, ионы магния оказывают такое же влияние на мембраны, переход в «несвязанное» состояние происходит при больших концентрациях. Адсорбционная сила зависит от кристаллического радиуса катионов. Имея разные размеры положение двухвалентных катионов в гидрофильной области мембраны будет различным.

**Аксенов В.Л.:** Хочу обратить ваше внимание, что диссертация посвящена исследованию данных систем с помощью малоуглового рассеяния нейтронов. То есть данная тема – использование ядерно-физических методов для исследования конденсированного состояния вещества - находится полностью в компетенции нашего совета. Возможно, у кого-то есть вопросы по самому методу МУРН и методам обработки данных? Если вопросов нет и все понятно, то давайте перейдем к отзыву научного руководителя. Пожалуйста, Валентин Иванович.

**Горделий В.И.:** Оглашает отзыв. Текст прилагается.

**Аксенов В.Л.:** Спасибо, Валентин Иванович. Сейчас мы переходим к обсуждению отзывов - организации, в которой выполнялась работа, и ведущей организации.

**Попеко А.Г.:** Имеется заключение Лаборатории нейтронной физики, в которой выполнялась работа. Это выписка из решения научно-технического совета Научно-экспериментального отдела нейтронных исследований конденсированных сред (НЭОНИКС) Лаборатории нейтронной физики, утверждённая директором ЛНФ Швецовым Валерием Николаевичем. Заключение положительное и замечаний не

содержит.

Имеется отзыв ведущей организации – ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского Центра «Курчатовский Институт», утвержденный заместителем директора по научной работе Саранцевой С.В. Отзыв положительный. Диссертация была обсуждена на семинаре по физике конденсированного состояния в Лаборатории нейтронных физико-химических исследований. Делается вывод, что диссертация выполнена на высоком научном уровне и полностью удовлетворяет всем требованиям ВАК РФ. Работа вносит значимый вклад в развитие физики конденсированного состояния в области молекулярных и жидкокристаллических систем, биофизику мембран с приложениями в медицину и фармацевтику в связи с задачами доставки лекарственных препаратов в клетки и другими применениями. Автор работы заслуживает присвоения учёной степени – кандидат физико-математических наук.

По тексту диссертации имеется ряд замечаний, которые не снижают высокий уровень диссертации в целом и не влияют на общую положительную оценку работы.

Замечание 1. В главе 2 предложена функция рассеяния для описания данных (формула 2.23). В нее входит радиус инерции для слоя липидов в поперечном направлении, толщина слоя рассчитывается в приближении постоянной плотности длины рассеяния в слое. Однако, длины рассеяния для полярной головки и хвостов различаются. Кроме того внутрь мембраны в той или иной мере проникает вода, что нарушает условие однородности. Оценивались ли эти факторы, как они влияют на результаты определения толщины мембран?

Замечание 2. В главе 3 определена константа связывания ионов кальция с липидами в предположении, что количество ионов, не связанных с липидными молекулами, остается постоянным в области перехода мембран из «связанного» в «несвязанное» состояние, когда увеличивается общее число ионов с ростом доли липидов. Насколько оправдано предположение, была ли возможна экспериментальная проверка?

Замечание 3. В главе 4 обсуждаются эффекты слияния мембран вследствие введения в водный раствор сульфоксидов, менее полярных, чем вода. Известно, что

при растворении поверхностно-активных веществ в диметилсульфоксиде и его смесях с водой образуются обращенные мицеллы. Такого рода явления не исключены и в случае липидов, что может сказаться на процессах слияния везикул. В какой мере это контролировалось в ходе приготовления образцов и проведения экспериментов?

Перечислен ряд стилистических недостатков и опечаток.

**Аксенов В.Л.:** Спасибо большое. Юлия Евгеньевна, Вам предоставляется возможность ответить на замечания ведущей организации.

**Горшкова Ю.Е.:** По замеченным стилистическим недостаткам и опечаткам согласна.

По замечанию 1: Действительно, плотности длины рассеяния для голов и хвостов разные. Можно построить распределения плотности длины рассеяния по отдельным компонентам молекулы фосфатидилхолина и для всей молекулы фосфатидилхолина. Из нейтронных экспериментов была определена именно величина  $D_{HH}$  – расстояние голова-голова, при этом не учитывалось проникновение воды в гидрофильную область бислоя. При учете проникновения воды толщина бислоя увеличится примерно на 5 ангстрем по обе стороны от центра бислоя. В журнале *Physic Review E* в 2005 году Горделий с коллегами опубликовали работу, где показано, каким образом можно получить, зная при определенных температурных условиях полный объем молекул воды, связанных с липидными молекулами, и объем липидной молекулы, реальную толщину мембраны, которая уже учитывает и связанную воду.

По замечанию 2: Наши результаты находятся в хорошем соответствии с литературными данными для подобных систем. В гелевой фазе приводятся значения константы связывания  $21 \text{ M}^{-1}$ , полученное из рентгеновской дифракции и  $37 \text{ M}^{-1}$ , полученное с помощью метода изотермической калориметрии титрования. Поэтому наше предположение было полностью оправдано.

По замечанию 3: Да, действительно, известен такой процесс, когда при добавлении диметлсульфоксида мицеллы переходят в инвертированные. Но в нашем случае при слипании однослойных везикул это не так. С течением времени проведения эксперимента на кривых малоуглового рассеяния наблюдается формирование ди-

фракционного пика, положение которого соответствует положению пика для приготовленных мультислойных мембран, когда сульфоксид находился в равной концентрации как внутри, так и снаружи. Кроме того, для концентрации, при которой изучалось слияние (0.1) проводился рентгеноструктурный анализ для аналогичной системы за исключением того, что молекула липида содержала на  $\text{CH}_2$  группу больше в каждом из углеводородной цепи. Четко показано, что положения пиков соотносятся как 1:2:3:4, а это указывает на формирование ламиллярной фазы. По данным малоуглового рассеяния наличие мицелл не определено.

**Аксенов В.Л.:** Юлия Евгеньевна, а этот вопрос не связан с концентрациями, которые вы рассматриваете? Возможно, при больших концентрациях будут образовываться мицеллы?

**Горшкова Ю.Е.:** Возможно Вы и правы, Виктор Лазаревич, однако наш интерес уменьшать концентрацию липида, чтобы приблизиться к изучению нативных мембран.

**Аксенов В.Л.:** По отзыву ведущей организации и ответам на замечания есть еще вопросы? Спасибо, Юлия Евгеньевна. Переходим к отзывам оппонентов. Первый оппонент – Петухов Максим Владимирович, кандидат физико-математических наук, Федеральный научно-исследовательский центр "Кристаллография и Фотоника" Российской академии наук. Пожалуйста.

**Петухов М.В.:** Оглашает отзыв, текст прилагается.

**Аксенов В.Л.:** Спасибо, Максим Владимирович. Пожалуйста, Юлия Евгеньевна, вам предоставляется возможность ответить на замечания оппонента.

**Горшкова Ю.Е.:** По замечанию 1: Да, действительно, малоугловое нейтронное рассеяние обладает меньшим радиационным повреждением по сравнению с рентгеновским.

По замечанию 2: Я полностью согласна, в тексте были допущены опечатки.

По замечанию 3: Здесь хотелось бы пояснить. ДМСО является и анестетиком, а, как известно из литературы, в литературном обзоре приведена статья Хорокоза, анестетики понижают температуру основного фазового перехода. В работе 2004 года, опубликованной в *Biophysical Journal*, четко изложено, что увеличение подвижности мембран или разупорядоченности, здесь речь идет об углеводородных

хвостах, приводит к уменьшению температуры основного фазового перехода. Это общий принцип. По моему опыту все молекулы, с которыми мы работаем, могут взаимодействовать или встраиваться в липидный бислой тремя различными способами. Либо они встраиваются в полярную область, не проникая в область углеводородных хвостов, тогда углеводородные хвосты имеют большую свободу, то есть увеличивается разупорядоченность углеводородных хвостов, и температура основного фазового перехода должна понижаться.

Когда, как в случае холестерина, происходит встраивание молекул, в том числе и в углеводородную часть, молекулы упорядочиваются, и температура основного фазового перехода увеличивается. В нашем случае молекулы сульфоксидов, как и ионы кальция, взаимодействуют только с поверхностью мембраны. В 1998 году в журнале *Biophysical Journal* Горделий с коллегами сделали заключение из данных, полученных с помощью широко-угловой дифракции, о том, что «взаимодействие между ДМСО и полярной поверхностью мембраны вызывает более плотную упаковку углеводородных цепей липидных молекул».

Поэтому с увеличением концентрации сульфоксида наблюдается увеличение температуры основного фазового перехода в отличие от других анестетиков. Так, например, лидокаин – хорошо всем известный местный анестетик встраивается в полярную область бислоя, как следует из работы 2012 года, опубликованной в журнале *Biochimica et Biophysica Acta*. В работе, опубликованной в журнале *Biophysical Chemistry* в 2012 году, показано, что при увеличении лидокаина действительно температура основного фазового перехода уменьшается, что находится в соответствии с общей концепцией увеличения или уменьшения температуры основного фазового перехода, схематически представленной на предыдущем слайде.

**Аксенов В.Л.:** Максим Владимирович, Вы удовлетворены ответами?

**Петухов М.В.:** Да.

**Аксенов В.Л.:** Спасибо, Юлия Евгеньевна. Членам совета все понятно. Следующий оппонент - Чупин Владимир Викторович, заведующий кафедрой биофизики, заведующий лабораторией химии и физики липидов Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)», доктор хими-



ческих наук. Прошу Вас.

**Чупин В.В.:** Оглашает отзыв, текст прилагается.

**Аксенов В.Л.:** Спасибо, Владимир Викторович. Так, Юлия Евгеньевна, по-видимому, Вы согласны со всеми замечаниями оппонента? Пожалуйста, Вам слово.

**Горшкова Ю.Е.:** По всем замечаниям я согласна и благодарю Владимира Викторовича за замечания, сделанные с точки зрения химика. Это будет учтено в дальнейшей работе.

**Аксенов В.Л.:** Спасибо, Юлия Евгеньевна. Так, мы детально все рассмотрели. У нас еще есть возможность для дискуссии. Пожалуйста, если у кого-то остались вопросы или кто-то хочет сделать замечания по диссертации.

**Балагуров А.М.:** Мне кажется, что эта диссертация для нашего отдела событие не рядовое. Эта биологическая тематика у нас появилась в конце 1970х годов, когда начала готовится программа для строящегося реактора ИБР-2. Ее инициировал Илья Михайлович Франк, и было намечено несколько биологических тем. Надо признать, что из всех этих биологических тем именно мембранная тема по-настоящему выжила. Поначалу это были чисто дифракционные работы, которые инициировал Валентин Иванович Горделий, потом появились малоугловые работы. Был некий пик по этой теме, затем наступил некий провал. И то что Юлия Евгеньевна не бросила эти дела, несмотря на немалые организационные проблемы, это просто замечательно. И видно, что она стала очень профессионально владеть предметом. На очень высоком уровне и презентация сделана и автореферат. Так что с моей точки зрения эта защита отвечает всем требованиям на самом высоком уровне.

**Аксенов В.Л.:** Спасибо большое, Анатолий Михайлович. Я думаю, что это выступление Анатолия Михайловича можно считать завершающим, поскольку мы довольно детально все обсудили, было много вопросов. Таким образом, я считаю, что мы можем на этом нашу дискуссию завершить и приступить к голосованию по диссертации.

Предлагается такой состав счетной комиссии для проведения тайного голосования для решения вопроса о соответствии рассматриваемой работы требованиям Положения и о присуждении ученой степени кандидата физико-математических наук

Горшковой Юлии Евгеньевне: Скуратов В.А., Тер-Акопьян Г.М., Утенков В.К.

**ПОСТАНОВИЛИ:** Избрать счетную комиссию в составе: Скуратов В.А., Тер-Акопьян Г.М., Утенков В.К.

**СЛУШАЛИ:** Утверждение протокола счетной комиссии по проведению тайного голосования о присуждении ученой степени кандидата физико-математических наук Горшковой Ю.Е.: состав совета утвержден в количестве 23 человек, присутствовали на заседании 18 членов совета, в том числе 6 докторов наук по профилю диссертации. Роздано бюллетеней - 18, подано с отметкой "за" - 18, подано с отметкой "против" - нет, недействительных бюллетеней - нет.

**Аксенов В.Л.:** Прошу утвердить протокол счетной комиссии. Протокол счетной комиссии утвержден единогласно. На основании изложенного диссертационный совет Д 720.001.06 в Объединенном институте ядерных исследований принял решение о присуждении ученой степени кандидата физико-математических наук Горшковой Ю.Е. Юлия Евгеньевна, мы Вас поздравляем. Вам предоставляется заключительное слово.

**Горшкова Ю.Е.:** В заключение считаю своим приятным долгом выразить искреннюю благодарность своему научному руководителю В.И. Горделию за постановку задач и обсуждение основных результатов работы. Особую признательность выражаю своему первому научному наставнику, руководителю группы ЮМО отдела НЭОНИКС ЛНФ А.И. Куклину за всестороннюю помощь и поддержку в период моей работы в ЛНФ. Выражаю глубокую признательность А.Х. Исламову за бесценные научные дискуссии и критические замечания не только по предмету диссертации, но и другим направлениям исследования, что безусловно повысило мой научный уровень в целом. Благодарю М.В. Авдеева, В.Л. Аксенова, А.М. Балагурова, Г.Д. Бокучаву, Д.П. Козленко и Б.Н. Савенко за моральную поддержку. Их участие во многом определило успешное завершение исследований и их оформление в виде диссертационной работы. Благодарю оппонентов В.В. Чупина и М.В. Петухова за ценные замечания. Благодарю всех сотрудников и, в особенности, коллектив группы малоуглового рассеяния ЛНФ ОИЯИ за дружескую атмосферу и помощь, без которой выполнение данной работы было бы затруднительно. Выражаю благодарность руководству ЛНФ ОИЯИ за предоставленную возможность

проведения экспериментальных работ по теме диссертации.

**Аксенов В.Л.:** Переходим к обсуждению заключения совета по диссертации. Проект заключения есть у всех членов совета. Пожалуйста, у кого есть замечания?

**Белушкин А.В.:** У меня замечание к первому пункту, который предлагаю изложить в следующей редакции: «Впервые определена критическая концентрация ионов кальция, при которой мультислойные везикулы ДМФХ в избытке растворителя переходят из «связанного» состояния в «несвязанное».

**Аксенов В.Л.:** Хорошо, надо подкорректировать этот пункт. Если больше замечаний нет, тогда я ставлю вопрос на голосование. Кто за то, чтобы утвердить это заключение с учетом замечаний? Спасибо большое. Против - нет. Заключение единогласно утверждено. На этом обсуждение диссертации мы заканчиваем.

Заместитель председателя  
диссертационного совета,  
член-корреспондент РАН



В.Л. Аксенов

Ученый секретарь  
диссертационного совета

А.Г. Попеко

11 февраля 2019 г.