

«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. Директора по научной работе
Федерального государственного
бюджетного учреждения

«Петербургский институт ядерной
физики им. Б.П. Константинова

Национального исследовательского
центра «Курчатовский институт»



С.В. Саранцева

«20» мая 2018 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт» на диссертацию Горшковой Юлии Евгеньевны «Структура и взаимодействие липидных мембран в присутствии ионов кальция и полярных молекул по данным малоуглового рассеяния», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.07 – физика конденсированного состояния

Диссертация посвящена ключевым проблемам физики конденсированного состояния в области, где особенно эффективны ядерно-физические методы, чтобы изучить сложные молекулярные структуры – биологические мембраны. Детальный анализ строения важен для понимания биологических функций мембран, развития наук о живой природе в целом. В этой связи **актуальность** темы диссертации очевидна.

Постановка работы связана с рядом **актуальных** научных вопросов: определением локализации воды и органических растворителей в мембранах, распределения ионов на их поверхностях и вызванных этим изменений структуры мембран и межмембранных взаимодействий. Указанные факторы видоизменяют молекулярный транспорт через мембраны, что влияет не только на их биологические функции. Это имеет практическое медицинское значение, в частности, для доставки лекарств внутрь клетки, но чтобы управлять структурой и транспортными свойствами мембран, требуется поиск способов их модификации. Автором были найдены вещества с комплексом необходимых физико-химических свойств (сульфоксиды), которые удалось внедрить в мембраны. Другие

достигнутые и не менее значимые результаты это регулирование взаимодействий мембран, выявленные условия и стадии их слияния, в чем главную роль играют катионы и органические молекулы в составе мембран. Диссертация посвящена решению этих проблем на примере фосфатидилхолиновых (ФХ) мембран.

Целью работы было изучение влияния катионов (Ca^{2+}) и сульфоксидов на структуру и свойства мембран в связи с их взаимодействиями, когда важную роль играют ионы и баланс гидрофобных и гидрофильных свойств внедренных в мембраны полярных молекул.

Этим определялся круг **задач**, включавший

- изучение фазовых переходов ФХ-мембран в присутствии ионов Ca^{2+} и сульфоксидов;
- анализ образования мультислойных систем, их переходов в «несвязное» состояние при увеличении концентрации ионов Ca^{2+} ;
- анализ влияния сульфоксидов на структуру мембран при варьировании их концентраций;
- исследование процессов слияния ФХ мембран в присутствии ионов Ca^{2+} и сульфоксидов.

В итоге были выработаны положения, выносимые на защиту. Они отражают обнаруженные закономерности фазовых переходов, факторы влияния ионов кальция на температуру основного фазового перехода, зависимость критических концентраций ионов от массовой доли липида в смеси и условий экспериментов, роль гидрофобного эффекта, ведущего к изменению структуры мембран при введении сульфоксидов, изученные процессы слияния ФХ-мембран.

Из содержания диссертации ясно, что результаты обладают **новизной**. Впервые систематически изучены переходы мультислойных везикул из «связанного» состояния в «несвязанное». Показано, что переходы носят непрерывный характер, найдены критические параметры - концентрации ионов кальция в зависимости от температурного режима опытов, плотности поверхностного заряда, изменения энергии Гиббса. Установлено, что процесс связывания ионов кальция с мембраной является экзотермическим. Определена роль гидрофобных взаимодействий в образовании комплекса сульфоксид-липид. Впечатляют результаты нейтронных опытов в реальном времени по кинетике слияния мембран под влиянием сульфоксидов. В итоге автором предложена физическая модель слияния многослойных мембран.

Практическая значимость результатов подтверждена тем, что обнаруженные и изученные закономерности фазовых превращений мембран прямо связаны с изменениями их проницаемости, скорости ионного (молекулярного) транспорта в зависимости от

присутствия ионов, полярных молекул в окружающей среде и внутри мембран. Исходя из этого, могут быть выработаны рекомендации по использованию действующих и новых фармацевтических средств в медицине для решения ряда задач (доставки лекарств, генной терапии, криосохранения биоматериалов, достижения анестетического и противовоспалительного эффектов при лечении). Весьма важны в практическом плане результаты изучения взаимодействий мембран, что необходимо для понимания причин клеточных патологий.

Содержание диссертации отражено в 6 публикациях в рецензируемых российских и зарубежных журналах из списка ВАК, в трудах 24 конференций. **Диссертация** состоит из введения, 4 глав, заключения и списка литературы (всего 139 страниц, 57 рисунков, литература - 178 наименований). **Во введении** обоснована актуальность исследований, цели работы, положения, выносимые на защиту, отражена новизна и практическая значимость результатов. **В первой обзорной главе** обобщаются представления о структуре и физико-химических свойствах биологических и искусственных мембран, природе их взаимодействий. Главное внимание уделено фазовым переходам в липидных мембранах, роли катионов и полярных молекул, влияющих на механизмы и физические параметры превращений. Проведен анализ работ о взаимодействиях ионов с мембранами, процессах их слияния, индуцированного присутствием полярных молекул. Рассмотрены возможности физических методов изучения мембран, преимущества использования рассеяния нейтронов и рентгеновских лучей в биофизике. Обзор достаточно полный и показывает, что соискатель глубоко изучил тематику, предмет исследований и методологию экспериментов. **Вторая глава** - описание материалов и методов приготовления модельных однослойных (многослойных) мембран в водных растворах. Дана информация о характеристиках основного инструмента – нейтронного спектрометра «ЮМО», методах обработки данных, моделях для описания рассеяния от однослойных и многослойных везикул. **Третья глава** суммирует результаты изучения влияния ионов Ca^{2+} на структуру и фазовые переходы в мембранах в зависимости от способов приготовления, температурных режимов. Автором показано, что температура основного фазового перехода увеличивается в присутствии ионов кальция. С ростом их содержания происходит переход в «несвязанное» состояние, а период повторяемости мультислойных мембран возрастает. Автор анализирует процессы слияния приготовленных в D_2O многослойных везикул, что вызвано ионами кальция. Установлено, что с увеличением количества ионов Ca^{2+} силы электростатического отталкивания вносят растущий вклад в межмембранные взаимодействия, вызывая разбегание бислоев на значительные расстояния. При небольшом содержании ионов электростатическое отталкивание

преодолимо, и мембраны способны быть на близком расстоянии друг от друга (стерический контакт). **Четвертая глава** описывает влияние сульфоксидов на структуру и фазовые переходы в мембранах в зависимости от соотношения компонент в растворе сульфоксид/вода. Из данных рассеяния нейтронов показано, что период свежеприготовленных мультислойных мембран снижается с ростом доли диметилсульфоксида, т.к. формируется фаза с взаимным проникновением углеводородных хвостов, чего не наблюдается в системах с диэтилсульфоксидом. Причина - усиление гидрофобных взаимодействий в случае диэтилсульфоксида. **Заключение** (7 положений) отражает основные результаты, их фундаментальное значение и новизну, достижения в развитии методологии исследований мембран.

К достижениям работы следует отнести реализованный системный анализ структурных превращений мембран под влиянием ионов и малых полярных молекул в окружающей среде с помощью рассеяния нейтронов. Выполнено детальное моделирование мембранных структур, получены структурные параметры, найдены их зависимости от условий приготовления мембран, присутствия ионов и молекул сульфоксидов. Автор связал найденные структурные характеристики мембран в различных состояниях и термодинамические параметры мембранных систем (изменения энтальпии, энтропии, температур переходов), показал, что процесс связывания ионов кальция с многослойными везикулами - самопроизвольная (экзергоническая) реакция.

При работе с выбранными сложными молекулярными объектами особенно важным было отработать методы их приготовления, обеспечить полностью контролируемое получение (воспроизведение) таких структур. Автор успешно справился с этими задачами. Вместе с хорошо продуманной методологией экспериментов это гарантировало надежность и **достоверность** полученных результатов.

В целом работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, полученные данные прошли тщательную обработку, первичный анализ и моделирование, сопоставление с теорией, обобщение и представление в виде публикаций. На всех этапах работы преобладающий личный вклад автора является несомненным.

Результаты диссертации широко представлены на российских и международных конференциях, полностью опубликованы в научных журналах. Диссертация написана ясным физическим языком, хорошо иллюстрирована, содержит всё необходимое, чтобы считаться законченной квалификационной работой по заявленной теме. Автореферат вполне отражает основное содержание диссертации.

Данное крупное исследование содержит некоторые недостатки:

1. В гл. 2 предложена функция рассеяния для описания данных (форм. 2.23). В неё входит радиус инерции R_t для слоя липидов в поперечном направлении, толщина слоя $d_b = \sqrt{12} R_t$ рассчитывается в приближении постоянной плотности длины рассеяния в слое. Однако, длины рассеяния для полярной головки и хвостов различаются. Кроме того, внутри мембран в той или иной мере проникает вода, что нарушает условие однородности. Оценивались ли эти факторы, как они влияют на результаты определения толщины мембран?
2. В Гл. 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 «связного» в «несвязное» состояние, когда увеличивается общее число ионов с ростом доли липидов. Насколько оправдано предположение, была ли возможна экспериментальная проверка?
3. В Гл.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 проведении экспериментов?

Замеченные стилистические недостатки и опечатки:

С.18. Фраза перед форм. 1.2 не закончена; С.19, предложение «Молекулы в бислое ... временные значения», последние слова лучше заменить на «временные масштабы», там же – не оценено время выхода молекулы из бислоя; С.30, опечатка: не Александр, а Поль де Жен; С.54, опечатка в форм. 2.2., там же опечатка «плотностью рассеяния»; С.55, опечатка в форм. 2.6, 2.7; С.57, в табл. должно быть «плотность потока на образце»; С.59, форм. 2.15 и 2.16 перепутаны местами, С.60, в форм. 2.18 должна быть интенсивность $I(q)$.

Замечания не снижают высокий уровень диссертации в целом и не влияют на общую положительную оценку работы.

Научные положения, результаты и выводы диссертации надежно аргументированы и обоснованы, хорошо известны специалистам, многократно докладывались на конференциях. 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.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

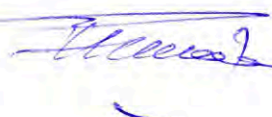
Результаты работы могут быть рекомендованы к использованию в МГУ, СПбГУ, НИЦ «Курчатовский институт», МФТИ, ИК РАН, ИФТТ РАН, Институте Молекулярной Генетики РАН, Институте цитологии РАН, Институте цитологии и генетики СО РАН, Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институте фундаментальных проблем биологии, медицинских учреждениях РФ.

Диссертация «Структура и взаимодействие липидных мембран в присутствии ионов кальция и полярных молекул по данным малоуглового рассеяния», полностью удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям, Положению о присуждении ученых степеней» (п.9-14), утвержденному постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, а её автор, Горшкова Юлия Евгеньевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.07 – «физика конденсированного состояния».

Диссертация Горшковой Ю. Е. заслушана и обсуждена на научном семинаре по физике конденсированного состояния в Лаборатории нейтронных физико-химических исследований НИЦ КИ - ПИЯФ, 20 марта 2018.

Основные положения и выводы отзыва одобрены в ходе обсуждения.

Старший научный сотрудник
НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ
кандидат физ.-мат. наук

 Шилин В.А.

Зав. Лабораторией нейтронных,
физико-химических исследований
ведущий научный сотрудник
НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ
доктор физ.-мат. наук

 Лебедев В.Т.

