

000474

МИНОБРНАУКИ РОССИИ  
Федеральное государственное  
бюджетное учреждение науки  
Институт биохимической физики  
им. Н.М. Эмануэля  
Российской академии наук  
(ИБХФ РАН)

Косыгина ул., д. 4, Москва, 119334,  
Тел.: (499) 137-64-20, факс: (499) 137-41-01  
E-mail: ibcp@sky.chph.ras.ru

ОКПО 40241274, ОГРН 1037739274308

ИНН/КПП 7736043895/773601001

30.09.2026 № 12113-6301/434

на № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

УТВЕРЖДАЮ

И.о. директора  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института биохимической физики  
им. Н. М. Эмануэля  
Российской академии наук



д.х.н., проф.

И.Н. Курочкин

30 " сент. 2026 г

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН) на диссертационную работу **Дубовского Петра Викторовича** «Мембраноактивные полипептидные токсины: взаимосвязь структура-функция», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия»

#### Актуальность темы исследования

История открытия и исследования мембраноактивных пептидов, обнаруживаемых в разнообразных биоценотических системах, насчитывает, без малого, уже почти сто лет. Соединения этой природы привлекательны, потому что наличие биомембраны — одна из ключевых характеристик клеточных форм жизни. А понимание явлений, происходящих на её границе — ключ к пониманию многих жизненных процессов и созданию физиологически-активных соединений для контроля над ними. Именно это обуславливает рост интереса к этим соединениям в последнее время. Действительно, рост антибиотикорезистентности бактерий делает поиск новых антимикробных агентов критически важным. Именно мембраноактивные пептиды (включая антимикробные пептиды из ядов животных) демонстрируют активность против устойчивых штаммов, где классические антибиотики всё более теряют свой потенциал. Их использование открывает пути не только для антимикробной терапии, но и для доставки других лекарств (например, нуклеиновых кислот через гематоэнцефалический барьер). Помимо антимикробного действия, мембраноактивные

пептиды способны влиять на иммунные реакции организма, обладать противовоспалительным, ранозаживляющим или противоопухолевым потенциалом.

Двумя архетипами различной структурной организации мембраноактивных пептидов являются линейный, без дисульфидных связей, пептид из яда пчелы, мелитин и дисульфид-богатые бета-структурные кардиотоксины из яда кобр. С момента своего выделения и идентификации в яде пчелы (1939 г) мелитин стал одним из самых исследуемых мембраноактивных пептидов и создания биоактивных аналогов на основе его аминокислотной последовательности. Не меньшей популярностью сейчас обладают и латарцины, линейные пептиды из яда паука, охарактеризованные академиком Е.В. Гришиным с сотрудниками в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова в 2006 году. В современной литературе описано уже много их производных с антимикробным, антираковым, противовирусным и проникающим в клетку действием. В этом же институте выделены и охарактеризованы первые представители цитотоксинов (кардиотоксинов) яда кобр. Они известны своей противораковой активностью. Причём, в некоторых случаях, цитотоксическая активность кардиотоксинов значительно превышает таковую цисплатины (цис-диамминдихлорплатина), традиционно-используемую для этих целей.

Комплексный анализ латарцинов и кардиотоксинов в рамках единого исследования в диссертационной работе Дубовского П.В. представляет собой методологически значимый подход. Интегративный характер исследования открывает новые перспективы для разработки инновационных терапевтических стратегий на основе комбинированного использования структурных мотивов различных классов пептидов. Работа также отражает современный тренд на мультидисциплинарные исследования в области биомедицины, что существенно повышает практическую значимость полученных результатов.

### **Цель и задачи исследований**

Диссертационная работа Дубовского П.В. состоит из трёх частей: 1) исследование структуры кардиотоксинов в водном растворе и их взаимодействия с модельными липидными мембранами и клетками; 2) то же для латарцинов и оксиопинина из яда паука *O. takobius*; 3) дизайн антимикробных пептидов, активных в отношении золотистого стафилококка, включая антибиотико-резистентные формы, на базе аминокислотных последовательностей кардиотоксинов и линейных пептидов из яда паука.

Таким образом, работа сочетает фундаментальные исследования (п.п. 1, 2 выше) и, в то же время, имеет практическую направленность (п. 3 выше).

### **Научная новизна полученных результатов**

При исследовании структуры и взаимодействия с модельными липидными мембранами кардиотоксинов и линейных пептидов Дубовский П.В. использовал довольно широкий арсенал биофизических подходов, включая теоретические (компьютерное моделирование) и экспериментальные методы, включая рентгеновскую дифракцию, радиоспектроскопию (ЭПР и ЯМР) и оптические методы (флуоресцентную и спектроскопию кругового дихроизма, КД). Однако необходимо отметить, что наиболее важным в его подходе, позволившем связать воедино результаты всех исследований и предложить им интересную интерпретацию на молекулярном уровне, является комбинация методов ЯМР высокого разрешения и широких линий (wide-line NMR spectroscopy). Последняя является разновидностью твердотельного ЯМР (solid-state NMR), задачи которого решаются с использованием обычных спектрометров высокого разрешения с входящими в их комплект широкополосными датчиками. В этом случае задача сужается до детектирования спектров на ядрах  $^{31}\text{P}$ , что не требует необходимости использования специально-разработанных и усовершенствованных датчиков, как в твердотельном ЯМР. Судя по ранним публикациям Дубовского П.В., эту методику он начал применять ещё в годы работы над своей кандидатской диссертацией, где использовался именно твердотельный ЯМР-спектрометр. Поэтому несомненной его заслугой и инновацией его подхода является адаптация методики приготовления водных дисперсий фосфолипидов и их смесей, и съёмки  $^{31}\text{P}$ -ЯМР спектров этих модельных мембран на имеющихся в ИБХ спектрометрах высокого разрешения. Более того, ещё одной инновацией стала разработка программы анализа формы линии спектров  $^{31}\text{P}$ -ЯМР водных дисперсий фосфолипидов Дубовским П.В. и сотрудниками лаборатории биомолекулярной спектроскопии ИБХ (P-Fit). Эта программа учитывает деформацию липосом в магнитном поле спектрометра, которая связана с модулем вязкоэластической упругости мембраны и радиусом липосомальной мембраны. Программа позволяет аппроксимировать экспериментальный  $^{31}\text{P}$ -ЯМР спектр фосфолипидной дисперсии в воде теоретическим спектром с известными значениями тензора анизотропии химического сдвига на ядре  $^{31}\text{P}$  и деформацию липосомы в магнитном поле спектрометра (а именно, соотношение осей эллипсоида – такую форму приобретает сферическая фосфолипидная липосома в магнитном поле).

С использованием этого подхода охарактеризовано взаимодействие кардиотоксинов и латарцинов с фосфолипидными мембранами различного состава. Это позволило показать, но уже с использованием спектроскопии ЯМР высокого разрешения, за счёт какого структурного мотива реализуется специфичность взаимодействия линейных пептидов из яда паука с фосфолипидами. Следует отметить, что аналогов использования такой комбинации методов и соответствующего программного обеспечения в современных работах, адресованных изучению взаимодействия мембраноактивных пептидов с модельными липидными мембранами, нет.

### **Структура и содержание диссертационной работы**

Диссертационное исследование Дубовского П.В. изложено на 367 страницах и имеет следующую структурную организацию, включающую следующие основные разделы:

вступительная часть с постановкой проблемы; обзор современной литературы (глава 1); экспериментальные результаты и их интерпретация (глава 2); методологический раздел с описанием использованных материалов и методик (глава 3); в заключительной части представлены обобщающие материалы: выводы исследования, глоссарий используемых сокращений и библиографический список. Работа проиллюстрирована 47-ю таблицами, 109-ю рисунками. Список цитированной литературы включает 595 наименований.

Глава 1 начинается с описания семейства трёх-петельных токсинов (ТПТ), рассматриваются структурные особенности нейротоксинов и, в сравнении с ними, кардиотоксинов. Здесь автор цитирует первые работы этого направления, датированные концом 80-ых годов прошлого века, а также недавние работы, из которых следует, что структурное изучение ТПТ является активной областью исследований, в которой автор обзора хорошо ориентируется. Приводящиеся рисунки оригинальны, а не заимствованы из работ других авторов. Интересен ряд выводов и замечаний, полученных диссертантом на основе не только литературных данных, но и на основе анализа баз данных (напр., UniProt). Так, оценив общее количество ТПТ в базе UniProt 900-ми единиц, автор делает заключение, что на долю кардиотоксинов и кардиотоксин-подобных полипептидов (CLBP) приходится около 11%. Рассматривая и анализируя структуру КТ, депонированных в банк данных белковых структур, PDB, автор делает вывод о принципиально важном различии структур КТ, получаемых с помощью ЯМР и Рентгено-Структурного Анализа (РСА): именно с помощью ЯМР удаётся наблюдать конформационное равновесие в водном растворе между двумя формами, объясняемое

цис-транс изомеризацией пептидной связи X-Pro в окончании петли-1 молекулы (для кардиотоксинов с единственным остатком Pro в этой петле). Далее автор констатирует, что значительно меньше известно о том, что происходит со структурой кардиотоксина при встраивании в липидную мембрану. Здесь же рассматриваются данные об антибактериальной и цитотоксической активности кардиотоксинов и предпринимается попытка объяснения варьирования этих активностей в рамках существующей до недавнего времени парадигмы деления кардиотоксинов на два типа, согласно их мембранной активности: P и S. Убедительно доказывается, что деление только на 2 типа не объясняет приведённые данные о биологической активности кардиотоксинов.

Далее в обзоре рассмотрены данные о взаимосвязи структура-активность для линейных пептидов из яда пауков. В разделе 1.2.2. (Структурные предпочтения линейных пептидов (ЛП)) на Рис. 8 и 9 приводятся структуры пептидов, полученные с использованием различных программ предсказания. Есть структуры, полученные с помощью программы ESMfold (языковая модель для белков с 15 миллиардами параметров), которая в последнее время выступает как значительно более быстросействующая альтернатива программы AlphaFold. Приведение таких структур и их обсуждение делает звучание обзора очень современным. То же можно сказать о разделе 1.3. (Дизайн биоактивных пептидов). В одном из подразделов (1.3.3.3.) обсуждается использование нейронных сетей для этого. Хотя этот раздел довольно краток, приводимой информации достаточно для понимания использования соответствующих подходов в Главе 2 (Результаты и обсуждение).

В Главе 2 акцент сделан на использовании рекомбинантного изотопно-меченого цитотоксина-1 для детализации конформационного равновесия в водном растворе, наблюдаемого для цитотоксинов с одним остатком Pro в окончании петли-1. Получена детальная пространственная структура мажорной и минорной форм. Сравнение химических сдвигов природного и рекомбинантного цитотоксина-1 позволяет уточнить отнесения химических сдвигов природного токсина, полученных на естественном содержании изотопов  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ . Далее методология расчёта пространственной структуры цитотоксинов с использованием химических сдвигов на естественном содержании опробована для кардиотоксинов, выделенных из яда *N. kaouthia*.

Но кардиотоксины мембраноактивны. Для классификации их, согласно мембранной активности, необходимо знание того, что происходит с их структурой при взаимодействии с липидными мембранами. Для этого изучена пространственная структура двух кардиотоксинов из яда *N. oxiana* в мембрано-моделирующей среде, мицеллах додецилфосфохолина. Показано, что более мембраноактивный кардиотоксин

(Р-типа) практически не изменяет своей структуры при встраивании в мицеллу окончаниями трёх петель молекулы, тогда как встраивание менее активного (S-типа) требует изменения конфигурации окончания петли-2, т.е. адаптации этой петли к мембранному окружению.

Далее изучено взаимодействие этой пары кардиотоксинов с мультислойными липосомами, сформированными из дипальмитоилфосфатидилглицерина и показано, что воздействие токсинов на упаковку и динамику молекул фосфолипидов более выражены для токсина Р-типа, по сравнению с S-типом. Для понимания того, что влияет на мембранную активность кардиотоксинов, расширен их ряд до 7-ми представителей, выделенных из яда разных кобр. Изучена утечка флуоресцентного красителя из липосом, сформированных из эквимольной смеси цвиттерионного и анионного фосфолипидов. Анализ этих данных привел к выводу о специальных остатках в окончаниях каждой из петель, которые препятствуют мембранной активности кардиотоксинов. Наличие таких остатков привело к делению всех кардиотоксинов на 8 типов, согласно их мембранной активности. В отличие от только 2-ух, известных ранее.

Заключительный раздел Главы 2 – дизайн антимикробных пептидов на основе аминокислотных последовательностей кардиотоксинов и линейных пептидов из яда пауков. Удалось получить ряд активных пептидов на основе только линейных пептидов. Изучена пространственная структура одного из активных аналогов в мицеллах лизопальмитоилфосфатидилглицерина. Показано, что в мицеллу пептид встраивается своим N-концевым гидрофобным якорем. При этом три гидрофобных аминокислотных остатка пептида контактируют с головкой молекулы детергента, формируя комплекс. С учётом данных  $^{31}\text{P}$ -ЯМР о воздействии активных и неактивных пептидов на мультислойные фосфолипидные липосомы, сформированные из диолеилфосфатидилглицерина, делается вывод о том, что только активные пептиды способны дестабилизировать анионные липосомы и эта дестабилизация связана с формированием комплекса липид/пептид. Низкая гемолитическая активность одного из пептидов (пептид 13) связана с его уменьшенной способностью к дестабилизации цвиттерионных мембран. Это объясняется аминокислотным составом N-концевой тройки аминокислотных остатков – один триптофан и пара фенилаланинов. Таким образом, делается вывод о том, что специфичность взаимодействия линейных пептидов с фосфолипидами обусловлена тройкой N-концевых аминокислот.

**Научная и практическая значимость работы**

В работе Дубовского П.В. связывается мембранная активность ряда пептидов в модельных мембранных системах с их биологической (цитотоксической, антибактериальной, гемолитической) активностью. Несмотря на то, что биомембрана живой клетки значительно сложнее обыкновенного липидного бислоя, следует признать, что для ряда клеток биологическая активность пептидов действительно определяется в значительной степени липидным составом биомембраны. Особенно ясно этот вывод звучит в третьей части работы, где осуществлён дизайн пептидов с активностью в отношении грам-положительных бактерий, золотистого стафилококка. Для целенаправленного дизайна пептидов в отношении таких бактерий важно получить структурную информацию об активных/неактивных пептидах именно в определённой мембрано-моделирующей среде с помощью ЯМР высокого разрешения. Адекватной средой для разработки пептидов против грам-положительных микроорганизмов, как продемонстрировано Дубовским П.В., являются мицеллы лизофосфатидилглицерина. Действительно, плазматическая мембрана этих микроорганизмов представлена, в основном, фосфатидилглицеринами и кардиолипином. При использовании обычно используемых для этих целей полностью дейтерированного и коммерчески доступного додецилфосфохолина приведёт к получению структуры без формирования комплекса с головкой молекулы фосфолипида. И это может привести к неверным выводам. Этот результат работы Дубовского П.В., в методическом отношении, чрезвычайно важен и его следует учитывать при планировании подобных экспериментов.

В связке с ЯМР высокого разрешения, для изучения взаимодействия пептидов с мультислойными фосфолипидными липосомами продуктивно использовать  $^{31}\text{P}$ -ЯМР спектроскопию. Хотя, в какой-то степени, эти эксперименты можно заменить на данные по утечке флуоресцентного красителя из липосом заданного липидного состава, тем не менее,  $^{31}\text{P}$ -ЯМР позволяет, при известном радиусе липосом, связать добавление пептида к липосомам с изменением модуля вязкоэластической упругости бислоя липосом и, вероятно, оценить константу связывания пептида с липосомами.

Не менее интересны полученные в работе пептиды с активностью против золотистого стафилококка. Вероятно, модификации пептида 13, обладающего минимальной гемолитической активностью, позволят увеличить его антибактериальную активность при сохранении гемолитической активности на минимальном уровне. Хотя пептид достаточно короткий и будет быстро расщепляться пептидазами при введении в кровоток, включение пептидов в наночастицы или другие модификации аминокислотной последовательности позволят преодолеть это неблагоприятное воздействие. Но все эти модификации уже значительно проще делать,

если получен хорошо охарактеризованный в плане взаимосвязи структура-активность, набор пептидов. Набор активных/неактивных пептидов, описанный в диссертации Дубовского П.В., облегчит решение задачи оптимизации свойств новых антибактериальных пептидов против золотистого стафилококка и других микроорганизмов.

### **Обоснованность и достоверность выводов диссертации**

Все результаты работы получены с использованием, главным образом, экспериментальных методов. Детали всех проведённых экспериментов запротоколированы в Главе 3 диссертации. Это означает, что эксперименты могут быть воспроизведены повторно. Более того, если речь идёт о структуре пептидов, то в работе одна и та же структура получена разными методами, что служит одновременно проверкой полученного результата, а, с другой стороны, указывает на возможную ограниченность применимости данного структурного метода. Поэтому такая избыточность информации позволяет признать полученные в работе Дубовского П.В. и сделанные выводы достоверными.

### **Полнота освещения результатов диссертации в публикациях**

По данным диссертации опубликовано 25 экспериментальных статей, 7 обзоров и 36 материалов конференций. Частично, материалы конференций, приведены в автореферате. Последние доклады датированы 2025 годом и касаются результатов изучения биоактивных пептидов против золотистого стафилококка. Более широко свойства этих пептидов обсуждаются в статье в журнале *Pharmaceutics* за 2025 год. Работы по изучению структуры кардиотоксинов занимают промежуток времени с 2000 по 2023 год. Классификация кардиотоксинов, согласно их мембранной активности, приводится в обзоре, датированным 2024 годом в журнале *Toxins*. Описание остальных результатов, касающихся линейных пептидов, попадает в диапазон 2006-2025 годы. Таким образом, все результаты диссертации отражены в статьях и обзорах, опубликованных за достаточно продолжительный промежуток времени. Это обуславливает и полноту этого отражения.

### **Вопросы и замечания**

1. Литературный обзор Главы 1 довольно полон и хорошо написан, но не хватает раздела о нынешнем состоянии в области изучения селективности липид/пептидных

взаимодействий. Что известно на сегодняшний день, какие биофизические методы преимущественно используются для этого?

2. Классификация кардиотоксинов на группы, в соответствии с их мембранной активностью, обнаруживает, что некоторые группы малочисленны (самая малочисленная - 5 кардиотоксинов), а другие, наоборот, содержат много кардиотоксинов, например, 21, 36. Не означает ли это, что внутри последних групп также можно провести дальнейшее разделение по мембранной активности?

3. В работе охарактеризован только один комплекс – пептида 9 с лизолипидом LPPG. Что известно о комплексах, формируемых другими активными в отношении золотистого стафилококка, пептидами?

4. В работе охарактеризованы короткие (13-14 а.о.) пептиды с активностью против золотистого стафилококка. Но активность хуже, чем, например, у даптомицина. Были ли попытки модифицировать пептиды с целью улучшения их активности, хотя бы до уровня даптомицина?

5. Обозначения/сокращения. Один и тот же кардиотоксин упоминается под несколькими аббревиатурами. Например, СТ1 - цитотоксин 1 из яда *N. oxiana* (также КТ О1, СТ1No). Это затрудняет чтение. Следовало бы использовать одно сокращение. Тем более, это легко сделать автоматической заменой в программе Word.

6. Рис. 84. Многословие в подписи к рисунку. Две панели рисунка. На обоих фигурирует слово «КД-спектры». Можно было бы использовать его только один раз, перед детализацией содержимого панелей.

7. Сноска 1) к Табл. 16 на стр. 93: «Данные заимствованы...». Можно сказать проще: «По данным работы...».

8. Рис. 107 на стр. 269 диссертации: на нём сравниваются два спектра, но они наложены один на другой, что затрудняет сравнение. Надо было бы разнести их по вертикали.

9. Рис. 109, панель а) (стр. 282). Названия аминокислотных остатков читаются с трудом. Можно было бы оставить только номера, а аминокислотную последовательность привести в подписи к рисунку.

10. В работе получено довольно много структур полипептидов, координаты которых депонированы в банк данных PDB. В диссертации присутствует раздел 3.11 (Базы данных). Казалось бы, в нём должна присутствовать информация о депонированных структурах. Но этот раздел очень короткий: в нём только констатируется о таком депонировании, но детали отсутствуют. Желательно было бы привести коды всех депонированных структур.

Приведённые замечания/уточнения не носят принципиального характера. Они являются следствием высокой значимости полученных результатов и служат дальнейшему развитию этого направления исследований.

### **Заключение**

Диссертационная работа Дубовского П.В. является современным комплексным научным исследованием, представляющим интерес с точки зрения разработанных в ней методик и подходов к изучению взаимодействия мембраноактивных пептидов с модельными липидными мембранами и практических результатов дизайна антимикробных пептидов для исследователей, использующих мембраноактивные пептиды для дизайна биоактивных аналогов. С учётом актуальности, научной новизны и обоснованности выводов, она полностью соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям, пунктами 9-14 "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с актуальными изменениями и дополнениями), а её автор Дубовский Пётр Викторович заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 «Биоорганическая химия».

Автореферат, диссертация и отзыв ведущей организации заслушаны, обсуждены и утверждены на семинаре Лаборатории функциональных свойств биополимеров Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (протокол № 7 от 25 сентября 2026 г.).

Секретарь семинара

к.х.н.

 /Антипова А.С.

Отзыв подготовлен д.х.н. Семеновой М.Г.

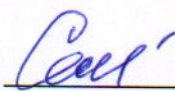
Главный научный сотрудник, руководитель  
Лаборатории функциональных свойств биополимеров  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля  
Российской Академии Наук (ИБХФ РАН)  
119334, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4  
Телефон: 8-495-939-71-02  
E-mail: mariagersem@mail.ru

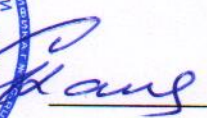
Подпись Семеновой М.Г. заверяю

Ученый секретарь ИБХФ РАН

к.б.н.



 /Семенова М.Г.

 /Скалацкая С.И.