

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Чулкова Евгения Георгиевича на тему

«Механизмы влияния флавоноидов на каналобразующую активность нистатина»,

представленную на соискание ученой степени кандидата

биологических наук по специальности 03.01.03 — молекулярная биология

Актуальность темы

Диссертационная работа Чулкова Е.Г. посвящена изучению изменений мембранной активности известного противогрибкового препарата нистатина под действием флавоноидов как потенциальных агентов, способных повысить активность антибиотика по отношению к болезнетворным микроорганизмам и снизить его токсичность для человека. Актуальность работы, выполненной исключительно на модельных мембранах, обусловлена, в первую очередь, тем, что именно мембранная активность, т.е. взаимодействие с компонентами клеточных мембран, лежит в основе фунгицидного действия нистатина. С другой стороны, эксперименты, выполненные на модельных системах с известным составом, позволяют делать более определённые выводы о механизме работы антибиотика, чем исследования на клеточном уровне.

Степень обоснованности научных положений, выводов и практических рекомендаций

Несомненным достоинством работы является проведение и сопоставление экспериментов на различных искусственных мембранных системах: плоских бислойных липидных мембранах, больших моноламеллярных везикулах и гигантских липосомах. При этом автором применен целый арсенал современных биофизических методов: измерение как интегрального электрического тока через БЛМ, так и одиночных ионных каналов,

конфокальная микроскопия, дифференциальная сканирующая калориметрия, флуорометрия. Выбор методов оказался удачным для реализации поставленных автором цели и задач исследования. Правильная постановка экспериментов, адекватность методов, тщательность проведенных исследований и высокий уровень анализа полученных результатов обеспечили обоснованность научных положений, выносимых на защиту, выводов и рекомендаций.

Оценка новизны, практического значения и достоверности

Научная новизна результатов представленного диссертационного исследования достаточно высока. Автором впервые установлено, что некоторые флавоноиды способны значительно повышать каналобразующую активность нистатина, введенного с одной стороны мембраны. Впервые выявлен синергизм действия флоретина и полиеновых антибиотиков на утечку кальцеина из липосом. Кроме того, автором описано не зарегистрированное ранее образование гелеобразных доменов в присутствии полиенов в мембранах, содержащих липиды с низкой температурой плавления ацильных цепей. Также автором впервые показано исчезновение индуцированных нистатином доменов под действием таких флавоноидов как флоретин и биоханин А. Все полученные в диссертации результаты характеризуются высокой надежностью и достоверностью.

Оценка структуры и содержания диссертации

Диссертационная работа Чулкова построена по традиционному плану и включает Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы и Список литературы, включающий 141 ссылку. Во Введении автором четко сформулированы цели и задачи исследования, его актуальность и научная новизна, основные положения, выносимые на защиту, а также теоретическая и практическая значимость работы. В Обзоре литературы рассмотрена классификация и биологическая активность флавоноидов и полиеновых антибиотиков, к которым относится

нистатин, а также описано известное влияние флавоноидов на некоторые физические свойства липидных мембран. Глава «Материалы и методы» содержит достаточно сжатое и в то же время полное всех использованных в диссертации экспериментальных методик. Глава «Результаты и обсуждение» хорошо структурирована. В первую очередь, автором изложены и проанализированы данные по влиянию флавоноидов на мембранную активность нистатина, а именно: увеличение трансмембранного тока, индуцированного односторонней добавкой нистатина, под действием таких различных по химической структуре флавоноидов как флоретин, флорицин, биоханин А и мирицетин. Далее доказано, что мишенью флавоноидов является липидное устье асимметричного нистатинового канала. Для обоснования этого вывода автором не только поставлены сравнительные опыты по действию флавоноидов на трансмембранный ток в случае их цис- и транс-добавки (по отношению к введению нистатина), но также изучено влияние флавоноидов на механические свойства бислоя и фазовую сегрегацию мембраны, модифицированной полиеном. Полученные в работе результаты и проведённый анализ литературных данных позволили автору предположить, что увеличение флавоноидами трансмембранного тока, индуцированного односторонним введением нистатина, обусловлено изменением эластических свойств *транс*-монослоя мембраны, в котором находится липидное устье полиеновой поры; тем самым автору удалось сформулировать и обосновать новый механизм стимуляции каналобразующей активности нистатина. Выводы диссертации сформулированы чётко и информативно.

Недостатки и общие замечания

Несмотря на обстоятельность, обзор литературы не лишен недочетов. Так, среди структурных форм флавоноидов на рис. 2 отсутствует структура одной из наиболее многочисленных групп флавоноидов—флаванолов (флаван-3-олов), к которым, в частности, относится используемый авторами катехин.

На стр. 15 и 16 некорректно изложен механизм антиоксидантного действия флавоноидов («поглощение ультрафиолетового излучения, создающего свободные радикалы, и прямое тушение реакционно способных атомов кислорода и азота»). Следует также отметить, что в литературе показана взаимосвязь между биологической активностью и взаимодействием флавоноидов с мембраной. Эта взаимосвязь является одним из важных обоснований цели работы, но в диссертации это не сформулировано, хотя на стр.6 и 26 автор перечисляет литературные данные о влиянии флавоноидов на физические свойства липидных мембран (например, дипольный потенциал, кривизну, температуру фазового перехода, текучесть и проницаемость). При этом автор пропускает серию работ из лаборатории классика биофизических исследований на плоских бислойных мембранах Олафа Андерсена (2003, 2005, 2007, 2010, 2014), в которых было показано действие целого ряда флавоноидов, в том числе генистеина и флоретина, использованных в диссертации, на механические (например, эластичность) свойства мембраны. Результаты исследований Андерсена и соавторов, выполненных в основном на грамицидиновых каналах, важны и для обсуждения влияния флавоноидов как дипольных модификаторов на свойства одиночных каналов грамицидина на стр. 22. Здесь, приводя на рис.7 данные из статьи Дейвида Бусата и коллег, автор допускает неточность, называя просто грамицидиновым каналом, под которым принято понимать грамицидин А, канал грамицидина М, у которого 4 триптофана заменены на фенилаланин, что обуславливает значительное усиление действия дипольного потенциала на проводимость одиночного канала.

Нельзя не заметить также, что судить о разжижающем влиянии флавоноидов на мембрану по индукции утечки кальцеина, как это делает автор на стр.79 и 81, неправомерно, хотя сами по себе данные о вытекании кальцеина из липосом под действием флоретина и нистатина представляют большой интерес.

Сделанные замечания не умаляют достоинств представленной работы.

Заключение: Диссертационная работа Чулкова Е.Г. «Механизмы влияния флавоноидов на каналообразующую активность нистатина» является законченной научно-квалификационной работой. В целом работа производит благоприятное впечатление цельностью и разнообразием подходов к решению четко поставленных задач. По актуальности выбранной темы и новизне полученных результатов, их значению для дальнейших исследований диссертационная работа Чулкова Е.Г. соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - "Молекулярная биология".

Старший научный сотрудник Отдела фотосинтеза и флуоресцентных методов исследований Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва

кандидат биологических наук по специальности 03.01.02 — «Биофизика»

Котова

Е.А. Котова

«17» ноября 2015 г.

Адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 40
НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова
тел.: +7(495)9395413
e-mail: kotova@genebee.msu.ru
сайт института: <http://www.belozersky.msu.ru/>

Директор
НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского
МГУ имени М.В. Ломоносова,
академик



[Handwritten signature]

В.П. Скулачев