



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437. Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

04.12.15 № 08-24.1-90

на № _____ от _____



Заместитель директора ИБХ РАН
д.ф.-м.н. Р.И. Ефремов
4 декабря 2015 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации

на диссертацию **Евгения Георгиевича Чулкова**

«Механизмы влияния флавоноидов на каналообразующую активность нистатина»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертационная работа Е.Г. Чулкова посвящена разработке подхода к модификации функциональных свойств полиеновых антибиотиков. В качестве объекта выбран хорошо известный тетраеновый противогрибковый антибиотик нистатин, входящий в список важнейших лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения. Механизм действия антибиотика состоит в повышении проницаемости мембран клеток грибов для ионов и небольших молекул за счет формирования олигомерных нистатиновых каналов. Ограничения в использовании нистатина в клинике связаны с его побочной токсичностью, обусловленной действием на мембраны клеток человека. Таким образом, как отмечает автор диссертации, востребованной и актуальной задачей представляется разработка подходов к модуляции активности нистатина и других полиеновых антибиотиков с целью увеличения избирательности их действия против грибных клеток.

В качестве инструмента для изменения свойств полиеновых антибиотиков исследователями под руководством Л.В. Щагиной и О.С. Остроумовой предложено использовать так называемые «дипольные модификаторы», соединения, способные изменять дипольный потенциал мембран. Перспективы использования в таком качестве флавоноидов – группы полифенольных соединений растительного происхождения – подробно

аргументированы этими учеными в цикле публикаций в ведущих биохимических журналах. В своей диссертационной работе Е.Г. Чулков представляет результаты исследования воздействия целого ряда флавоноидов на активность нистатина.

Диссертация изложена на 105 страницах, состоит из введения, где также сформулированы цель и задачи исследования, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 141 ссылку. Текст иллюстрирован 41 рисунком и содержит восемь таблиц.

Задачи исследования соответствуют цели и раскрывают ее. Обзор литературы включает порядка 100 ссылок на оригинальные источники, от классических работ до наиболее недавних публикаций. Построение обзора логичное и включает разделы, посвященные флавоноидам, физико-химическим свойствам мембран и полиеновым антибиотикам. Несмотря на широкий охват, обзору свойственно внутреннее единство, разделы взаимосвязаны и дают общее представление о современной ситуации в области исследований, выбранной диссертантом. Необходимо отметить удачное использование рисунков и таблиц, помогающих читателю разобраться в тексте.

Глава «Материалы и методы» описывает использованные автором методики электрофизиологии, микроскопии и калориметрии. Здесь собрана информация о материалах и реактивах, в том числе приведены формулы всех исследованных флавоноидов. Кроме того, в этой главе содержатся все подробности, позволяющие при необходимости воспроизвести поставленные Е.Г. Чулковым эксперименты.

Автор начинает изложение результатов с демонстрации того, что флавоноиды способны модифицировать нистатин-индуцированный ток через плоскую липидную мембрану не только при двустороннем приложении нистатина, когда формируются так называемые «симметричные» нистатиновые каналы, что было известно ранее, но и при одностороннем приложении, когда формируются «асимметричные» каналы. Автор проводит регистрацию одиночных каналов, переходящих между закрытым и открытым состояниями, при низких рН, когда асимметричные каналы достаточно стабильны, а также анализ электрических свойств мембраны при добавлении нистатина при нейтральном значении рН.

Затем Е.Г. Чулков изучает влияние десяти различных флавоноидов на нистатин-индуцированный ток. Исследованные соединения по активности можно объединить в три группы: (1) неактивные, (2) увеличивающие нистатин-индуцированный ток в ~3 раза и (3) в 10-100 раз. Автор отмечает, что не удастся найти каких-либо структурных признаков, отличающих эти три группы.

Следующим шагом диссертант проверяет гипотезу о снижении дипольного потенциала мембраны как механизме действия флавоноидов на нистатиновые каналы. Для этого он измеряет изменение дипольного потенциала мембран при приложении исследуемых флавоноидов с использованием ионофора нонактина. Выясняется, что корреляция между способностью флавоноидов изменять дипольный потенциал и их активностью в отношении нистатин-индуцированного тока отсутствует (например, один из наиболее активных флавоноидов таксифолин и один из наименее активных, катехин, вызывают сходное изменение дипольного потенциала).

Поскольку известно, что для мембран, содержащих сфингомиелин и холестерин, характерно явление фазовой сегрегации, Е.Г. Чулков далее переходит к анализу влияния флавоноидов на этот процесс. Он использует флуоресцентный маркер неупорядоченной липидной фазы и метод конфокальной микроскопии для визуализации фазовой сегрегации в липосомах. Оказывается, что флавоноиды со сходной активностью в отношении нистатиновых каналов (флоретин и мирицетин) очень по-разному ведут себя при добавлении к липосомам, приготовленным из фосфатидилхолина, сфингомиелина и холестерина: флоретин разрушает упорядоченные домены, а мирицетин такой активностью не обладает. То же касается фазовой сегрегации, индуцированной самим нистатином: флоретин показывает «разжижающее» действие на упорядоченные домены, а мирицетин неактивен.

Е.Г. Чулков обращает внимание на способность флавоноидов индуцировать образование небислойной липидной фазы при добавлении к липосомам. Диссертант предполагает, что эта способность обусловлена встраиванием молекул флавоноидов в область гидрофильных головок липидов и изменением спонтанной кривизны монослоя. Он также отмечает, что активность нистатина зависит от этого свойства мембран: каналы менее эффективно образуются в мембранах, содержащих липиды с отрицательной спонтанной кривизной, например, фосфатидилэтаноламин, и наоборот, потенцируются детергентами с положительной кривизной. Е.Г. Чулков считает, что потенцирование нистатин-индуцированного тока флавоноидами объясняется указанной способностью этих соединений увеличивать спонтанную кривизну монослоя, противоположного той стороне мембраны, к которой прикладывают антибиотик. Действительно, активность флавоноидов отмечается в случае приложения их к стороне мембраны, противоположной стороне введения нистатина, и отсутствует при приложении с той же стороны, с какой подают антибиотик.

Некоторые флавоноиды, например, флоретин, могут проникать через липидный бислой, в то время как другие, например, кверцетин, такой способностью не обладают. В экспериментах на липосомах, нагруженных флуоресцентным красителем кальцеином.

Е.Г. Чулков показывает потенцирующую активность флоретина в отношении нистатиновых каналов при добавлении обоих веществ к внешнему раствору и отсутствие такой активности у кверцетина.

Наконец, диссертант презентует финальную модель, описывающую молекулярный механизм действия флавоноидов на асимметричные нистатиновые каналы. Эти каналы сформированы олигомером молекул нистатина, встроенным в один монослой, и липидным «тором» в другом монослое («липидным устьем»). Формирование тора упрощается при увеличении положительной спонтанной кривизны монослоя, чему способствуют встраиваемые сюда молекулы флавоноидов. Анализ зависимости нистатин-индуцированного тока от концентрации флоретина дает приблизительную оценку числа молекул флавоноида на один нистатиновый канал. Е.Г. Чулков заключает, что в липидном устье канала локализуется порядка двух молекул флавоноида.

Изложение результатов представлено автором в увлекательной манере: последовательно выдвигаются вполне логичные гипотезы о механизме влияния флавоноидов на нистатиновые каналы, которые так же последовательно подвергаются экспериментальной проверке и отвергаются. В результате Е.Г. Чулков подводит читателя к финальной модели, лучше других объясняющей экспериментально наблюдаемые эффекты. Представленная модель отличается элегантною простотой, что лишь укрепляет положительное впечатление от прочтения текста диссертации.

Полученные в работе результаты отличаются высокой степенью новизны и значимости для дальнейших исследований в области мембрано-активных соединений. Впервые визуализирована фазовая сегрегация в мембранах под воздействием полиенового антибиотика. Показана разжижающая активность некоторых флавоноидов в отношении упорядоченных доменов мембран. Обнаружены флавоноиды, увеличивающие активность нистатина при приложении к мембране с противоположной стороны. Показано, что флоретин сохраняет потенцирующую активность и при добавлении к мембране с одной стороны с нистатином. Предложена модель, обобщающая все экспериментальные факты и объясняющая активность флавоноидов стабилизацией липидного устья нистатиновых каналов. Обнаруженный синергизм действия нистатина и флоретина может быть использован в дальнейших исследованиях для увеличения селективности полиеновых антибиотиков.

Работа выполнена на высоком методическом уровне. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. Сделанные автором выводы хорошо продуманы и аргументированы. К недостаткам следует отнести следующее.

1. Наблюдается некоторая небрежность в использовании терминов. Так, на стр. 13 вместо «высокоафинной жидкостной хроматографии» речь, по-видимому, идет о высокоэффективной жидкостной хроматографии. При описании общей формулы флавоноидов (стр. 14) Е.Г. Чулков использует некорректное словосочетание «изопропановый фрагмент». В русскоязычной литературе принято написание «грамположительный» (и, соответственно, «грамотрицательный») вместо «грамм-позитивный». «Поломки» ДНК (стр. 15) лучше называть повреждениями.

2. В ряде случаев автор использует неудачные формулировки. Дипольный потенциал липидного бислоя точнее определять как разницу потенциалов между углеводородной областью и областью полярных головок липидов (границей мембраны и водной фазы), а не водным раствором, как указано на стр. 19. К макролидам относят существенно более широкий спектр соединений, нежели представленный автором на стр. 27. Например, к макролидным антибиотикам принадлежат хорошо известные олигомицины и бафиломицины, а к антипаразитарным препаратам – семейство авермектина. На стр. 30-31 имеет место путаница с классификацией гептаеновых антибиотиков.

3. Подписи на рисунках 7 и 11 не переведены на русский язык. В тексте встречаются как «амфотерицин Б», так и «амфотерицин В».

4. Не везде даны объяснения выбранным концентрациям флавоноидов и нистатина. Например, в электрофизиологических экспериментах на плоских мембранах флавоноиды прикладывали в концентрации 20 мкМ, а в экспериментах с фазовой сегрегацией – в концентрации 400 мкМ.

5. Остается неясным, как вписывается отсутствие активности у даидзеина и катехина в общую модель. Эти флавоноиды не изменяют спонтанную кривизну монослоя? Кроме того, модель асимметричной поры с липидным устьем не является единственной возможностью для описания нистатиновых каналов. Почему именно ее автор считает предпочтительной?

Указанные недостатки не снижают общего удовлетворения от прочтения диссертации. Результаты работы и представленные выводы соответствуют поставленным цели и задачам исследования. Автореферат достаточно полно отражает содержание, основные результаты и выводы диссертации. Диссертационная работа Е.Г. Чулкова соответствует заявленной специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

По материалам диссертации опубликовано три статьи в ведущих научных журналах в области липидов и мембран. Результаты работы докладывались на 38-м конгрессе ФЕБО.

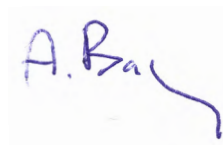
Результаты, полученные Е.Г. Чулковым, могут быть использованы для научных

исследований в различных институтах РАН (например, в Институте цитологии, Институте физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина, Институте биорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии»), на химическом факультете и в Институте физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, а также в других профильных научных учреждениях.

Диссертация соответствует требованиям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, в том числе п. 9 данного Положения, а ее автор, Евгений Георгиевич Чулков, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Отзыв обсужден и утвержден на семинаре Отдела молекулярной нейробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), протокол № 1 от 26 ноября 2015 г.

Руководитель группы
молекулярных инструментов для нейробиологии
ИБХ РАН,
к.х.н. А.А. Василевский
специальность 02.00.10 – биорганическая химия



«Подпись А.А. Василевского заверяю»

Ученый секретарь ИБХ РАН,

д.ф.-м.н. В.А. Олейников



Контактная информация:

117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, ИБХ РАН

Телефон канцелярии: +7 (495) 335-01-00

Эл. почта: office@ibch.ru

Официальный сайт: www.ibch.ru