

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д002.230.01
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ
УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 10.06.2016 г. № 210/389

О присуждении Остроумовой Ольге Сергеевне (Российская Федерация)
ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация «Регуляторное влияние дипольных модификаторов мембран на ионные каналы, образуемые антимикробными агентами и токсинами в липидных бислоях» по специальности 03.01.03 – молекулярная биология принята к защите 02.03.2016 г., протокол № 206/385 диссертационным советом Д 002.230.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., д. 4, утвержден приказом Минобрнауки РФ №105/нк от 11.04.2012 г., частичные изменения совета утверждены приказом Минобрнауки РФ № 731/нк от 05.11.2013 г.

Соискатель Остроумова Ольга Сергеевна, 1981 года рождения, диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Многоуровневая проводимость ионных каналов, образованных циклическими липодепсипептидами *Pseudomonas syringae* в липидных бислоях» защитила в 2007 году в порядке прохождения очной аспирантуры, в диссертационном совете, созданном на базе Института цитологии РАН. В Институте цитологии РАН работает с 2003 года, с 2010 года по настоящее время – старший научный сотрудник, а с 2013 года – руководитель Группы моделирования ионных каналов Лаборатории ионных каналов клеточных мембран Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук. Диссертация выполнена в Лаборатории ионных

каналов клеточных мембран Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Тихонов Денис Борисович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биофизики синаптических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург

Крутецкая Зоя Иринарховна, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой биофизики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Ермаков Юрий Александрович, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биоэлектрохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук, Москва

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, в своем положительном заключении (составленном Ефремовым Романом Гербертовичем, доктором физико-математических наук, заведующим лабораторией моделирования биомолекулярных систем, заместителем директора ИБХ РАН и Василевским Александром Александровичем, кандидатом химических наук, руководителем группы молекулярных инструментов для нейробиологии ИБХ РАН, и утвержденном Ивановым Вадимом Тихоновичем, доктором химических наук, академиком, профессором, директором Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук) указала, что диссертационная работа Остроумовой Ольги Сергеевны является

законченным самостоятельным научно-квалификационным исследованием, в котором на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические и практические положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое крупное научное достижение в области молекулярной биологии. Диссертационная работа полностью отвечает требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а её автор заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология», и

дала положительный отзыв на диссертацию.

Соискатель имеет 104 опубликованные работы, в том числе по теме диссертации 85 работ, из них 28 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК для размещения материалов диссертаций (15,6 печатных листов), включая обширный обзор в журнале «International Review of Cell and Molecular Biology», 1 коллективная монография (3.3 печатных листа) в тематическом выпуске «Advances in planar lipid bilayers and liposomes», 1 учебное пособие (7.5 печатных листов) для студентов ВУЗов, а также 55 работ в сборниках трудов конференций.

Наиболее значимые работы О.С. Остроумовой по теме диссертации:

1. **Остроумова О.С., Щагина Л.В., Малев В.В.** Влияние дипольного потенциала липидных бислоев на свойства ионных каналов, образованных циклическим липодепсипептидом сирингомицином Е // Биологические мембраны. – 2008. – Том 25 (5). – С. 388–400.

Работа посвящена роли дипольного потенциала мембраны в регуляции каналообразующей активности противогрибкового циклического липопептида сирингомицина Е. Разработана теоретическая модель работы сирингомициновых каналов. На ее основе проанализирован вклад различных факторов в активность сирингомициновых пор при варьировании дипольного потенциала. Установлено,

что основными причинами изменения числа открытых сирингомициновых пор являются модификация эффективного воротного заряда каналов и коэффициента распределения липопептида между мембраной и водной фазой.

2. **Ostroumova O.S.**, Malev V.V., Ilin M.G., Schagina L.V. Surfactin activity depends on the membrane dipole potential // *Langmuir*. – 2010. – Vol. 26 (19). – P. 15092–15097.

Работа посвящена исследованию механизмов образования и функционирования ионных каналов, образованных антимикробным липопептидом сурфактином, с помощью дипольных модификаторов мембран. Выявлено, что ключевая роль в процессах образования пор липопептидами принадлежит заряд-дипольным взаимодействиям между молекулами каналоформера и бислоем.

3. **Ostroumova O.S.**, Efimova S.S., Schagina L.V. 5- and 4'-hydroxylated flavonoids affect voltage gating of single alpha-hemolysin pore // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2011. – Vol. 1808 (8). – P. 2051–2058.

В работе изучена природа низкопроводящих ("закрытых") состояний одиночной поры, формируемой альфа-гемолизином золотистого стафилококка. Обнаружено, что 5-, 7- и 4'-гидроксильированные флавоноиды увеличивают потенциал-чувствительность закрывания альфа-гемолизиновой поры. Полученные результаты указывают на локализацию сенсора напряжения альфа-гемолизинового канала в глицин-богатом регионе с цитоплазматической стороны бета-складчатости.

4. **Ostroumova O.S.**, Efimova S.S., Chulkov E.G., Schagina L.V. The interaction of dipole modifiers with polyene-sterol complexes // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7 (9). – P. e45135.

В работе проанализировано влияние различных дипольных модификаторов на стабильность полиен-стериновых комплексов, формирующих поры в мембранах. Установлено, что благодаря участию в сети водородных связей и π - π -электронных взаимодействиям дипольные модификаторы могут служить дополнительными ориентирующими или дезориентирующими факторами, влияя на силы Ван-дер-Ваальса, возникающие между полиеновой и стереновой

молекулами. Определены структурные модификации молекул модификаторов, полиеновых антибиотиков и стероидов, приводящие к изменению энергии комплексообразования.

5. **Ostroumova O.S.**, Chulkov E.G., Stepanenko O.V., Schagina L.V. Effect of flavonoids on the phase separation in giant unilamellar vesicles formed from binary lipid mixtures // *Chem. Phys. Lipids.* – 2014. – Vol. 178. – P. 77–83.

В работе впервые продемонстрировано изменение сценария фазовой сегрегации мембраны под действием полифенолов растительного происхождения, обладающих выраженной диполь-модифицирующей активностью. Установлено, что наибольшее влияние на фазовое разделение в мембране оказывают соединения, способные интеркалировать в область гидрофильных голов мембранных липидов, флоретин и биоханин А. Разжижающее действие флавоноидов обусловлено увеличением площади, приходящейся на одну молекулу в бислое, что сопровождается увеличением подвижности ацильных хвостов липидов и разрушением упорядоченных доменов в мембране. Обнаружен полиморфный фазовый переход липидов из ламеллярной в гексагональную фазу под действием флоретина, биоханина А и кверцетина.

6. Efimova S.S., Schagina L.V., **Ostroumova O.S.** The influence of halogen derivatives of thyronine and fluorescein on the dipole potential of phospholipid membranes // *J. Membr. Biol.* – 2014. – Vol. 247 (8). – P. 739–745.

В работе проведен сравнительный анализ диполь-модифицирующей способности тиреоидных гормонов. Определены количественные характеристики влияния тироксина и трийодтиронина на дипольный потенциал фосфолипидных бислоев различного состава. Установлено, что эффект уменьшения дипольного потенциала мембраны обусловлен сорбцией незаряженной формы гормонов.

7. Ефимова С.С., Захаров В.В., **Остроумова О.С.** Влияние дипольных модификаторов на каналобразующую активность амилоидных и амилоидоподобных пептидов в липидных бислоях // *Цитология.* – 2015. – Том. 57 (2). – С. 144–152.

В работе продемонстрирована возможность прямого электростатического взаимодействия флавоноидов с ионными каналами. Показано, что таким образом флоретин изменяет агрегационный статус и каналообразующую активность бета-амилоидных пептидов, ассоциированных с болезнью Альцгеймера.

8. Ефимова С.С., **Остроумова О.С.** Модификаторы дипольного потенциала липидных бислоев // Акта Натура. – 2015. – Том 7 (4). – С. 73–82.

Работа посвящена оценке величин изменения дипольного потенциала мембран при адсорбции широкого круга модификаторов на липидных бислоях различного состава. На предмет выявления диполь-модифицирующих свойств протестированы флавоноиды, миорелаксанты, тиреоидные гормоны, ксантеновые и стирилпиридиновые красители. Охарактеризованы зависимости величины изменения дипольного потенциала от химической структуры модификаторов, а также от заряда и спонтанной кривизны липидных монослоев.

9. Efimova S.S., Zakharova A.A., Schagina L.V., **Ostroumova O.S.** Two types of syringomycin E channels in sphingomyelin-containing bilayers // Eur. Biophys. J. – 2016. – Vol. 45 (1). – P. 91-98.

В работе впервые продемонстрировано, что фазовая сегрегация компонентов мембраны приводит к неоднородному распределению дипольного потенциала в латеральном направлении и, тем самым, обуславливает различия в характеристиках ионных каналов, встроенных в упорядоченные и неупорядоченные липидные домены.

10. **Ostroumova O.S.**, Efimova S.S., Malev V.V. Modifiers of membrane dipole potentials as tools for investigating ion channel formation and functioning. In: K.W. Jeon (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology*. – 2015. – P. 245–297.

В работе проведен аналитический обзор литературных и полученных авторским коллективом данных о применении дипольных модификаторов мембран в качестве инструментов для изучения механизмов функционирования ионных каналов, образуемых антимикробными агентами и токсинами в модельных липидных мембранах. Доказано, что использование дипольных модификаторов мембран позволяет установить регуляторную роль дипольного потенциала,

геометрических характеристик мембранообразующих молекул и характера фазовой сегрегации в бислое.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Доктора физико-математических наук, профессора кафедры молекулярной физики Ереванского государственного университета **Аракеляна Валерия Бейбудовича**. Отзыв положительный, без замечаний.
2. Доктора биологических наук, профессора, ведущего научного сотрудника лаборатории физиологии и биофизики клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук **Бигдай Елены Владимировны**. Отзыв положительный, без замечаний.
3. Доктора биологических наук, профессора, члена-корреспондента Национальной Академии Наук Азербайджана, заведующего лабораторией физико-химических свойств клеточных мембран Института ботаники НАНА **Касумова Халила Мамедовича**. Отзыв положительный, без замечаний.
4. Доктора химических наук, профессор, заведующего кафедрой электрохимии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» **Кондратьева Вениамина Владимировича**. Отзыв положительный, содержит вопросы о независимой оценке величин дипольного потенциала методами, не основанными на измерении ионофор-индуцированной проводимости мембран и о влиянии модификации флавоноидами электрических характеристик бислоя на утечку кальцеина из липосом.
5. Доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника отдела биоэнергетики «Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского» **Мамедова Махира Джафар оглы**. Отзыв положительный, без замечаний.
6. Доктора биологических наук, профессора Медицинского колледжа Висконсина **Старущенко Александра Викторовича**. Отзыв положительный, содержит вопросы о связи насыщения зависимостей уменьшения дипольного

потенциала от концентрации флавоноидов в околосмембранных растворах с пределом растворимости флавоноидов в водной фазе и о вкладе механических факторов в изменения K^+ -нонактинового трансмембранного тока под действием флоретина и биоханина А.

7. Доктора химических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории химической трансформации антибиотиков Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе» **Тевяшовой Анны Николаевны**. Отзыв положительный, без замечаний.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что они являются признанными экспертами и имеют публикации в рецензируемых международных и отечественных журналах в области изучения молекулярных основ функционирования ионных каналов в модельных и клеточных мембранах, соответствующей теме диссертационной работы О.С. Остроумовой.

Выбор ведущей организации обосновывается тем, что Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук – это ведущая научная организация России, осуществляющая междисциплинарные проекты по исследованию структуры и механизмов действия важнейших биомолекулярных систем, включая модельные и клеточные мембраны, а также встроенные в них ионные каналы.

В дискуссии приняли участие: члены диссертационного совета – проф. С.Н. Борхсениус, проф. ЕС. Корнилова, проф. М.И. Мосевичкий; присутствующие специалисты – д.б.н. Б.А. Маргулис, д.б.н., проф. Я.Ю. Комиссарчик, д.б.н., проф. Л.В. Щагина, д.х.н., проф. В.В. Малев.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработаны принципы регуляции ионных каналов, формируемых экзогенными соединениями, дипольными модификаторами мембран, включающие изменение распределения электрического поля на границах мембран, доменной структуры

липидного бислоя, трансмембранного распределения латеральной компоненты давления и непосредственное взаимодействие дипольных модификаторов с ионными каналами;

предложена оригинальная гипотеза, постулирующая два различных механизма изменения дипольного потенциала под действием флавоноидов: посредством интеркаляции их диполей в липидный бислой и модификации состояния гидратации мембранных липидов;

доказана перспективность использования дипольных модификаторов мембран для изучения функционирования ионных каналов, в том числе нативных каналов клеточных мембран;

введена новая классификация флавоноидов по функциональным характеристикам взаимодействия с липидным бислоем, учитывающая существование трех различных типов таких соединений, которые а) уменьшают дипольный потенциал мембраны и вызывают разупорядочение липидов в бислой; б) только уменьшают дипольный потенциал; в) не влияют на распределение электрического поля на границах мембраны и ее фазовое состояние.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны положения, вносящие вклад в расширение представлений о роли физико-химических свойств липидного бислоя в процессах порообразования экзогенными соединениями;

применительно к проблематике диссертации эффективно использован комплекс существующих и модернизированных экспериментальных методик, включающий регистрацию токов, протекающих через плоские липидные бислои, инкорпорирование различных антимикробных соединений и токсинов в модельные мембраны, дифференциальную сканирующую микрокалориметрию липосомных суспензий, конфокальную флуоресцентную микроскопию гигантских одноламеллярных липосом и флуориметрию, индуцированной модификаторами утечки флуорофора из липидных везикул;

изложена гипотеза, связывающая особенности функционирования ионных каналов в мембранах, подверженных латеральной сегрегации компонентов, с различием физико-химических свойств упорядоченных и неупорядоченных липидных доменов, в том числе, скачка дипольного потенциала на их границах с внешней средой;

раскрыты основные принципы управления ионными каналами, формируемыми экзогенными соединениями, с помощью дипольных модификаторов мембран: универсальность, отражающая независимость липидопосредованных путей регуляции от химической природы порообразующих и диполь-модифицирующих агентов, комплексность, обусловленная множественностью изменяемых дипольными модификаторами параметров мембран, и амплификация, заключающаяся в усилении неоднородности свойств мембран;

изучены связи между структурой модифицирующих агентов и изменениями дипольного потенциала и фазового состояния липидных бислоев;

разработана теоретическая модель, позволяющая проанализировать вклад различных факторов в изменение каналаобразующей активности липопептидов при варьировании дипольного потенциала мембран.

Значение полученных соискателем результатов для практики подтверждается тем, что:

разработана и внедрена в практику научного исследования методология комплексного исследования строения и функционирования ионных каналов с помощью дипольных модификаторов мембран;

определены перспективы использования дипольных модификаторов мембран для изучения липидопосредованной регуляции нативных каналов клеточных мембран;

создана система практических рекомендаций для анализа возможностей совместного применения антимикробных соединений и дипольных модификаторов в фармацевтических целях;

представлены материалы, которые могут быть включены в курсы лекций по молекулярной биологии, биофизике и мембранологии для студентов ВУЗов

биологического и медицинского профилей; материалы изданы в виде учебного пособия "Современные проблемы биофизики. Ионные каналы в модельных липидных мембранах", СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2013.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

для экспериментальных работ было использовано сертифицированное оборудование, прошедшее плановую проверку и калибровку, показана воспроизводимость результатов исследования;

теория построена на проверяемых данных и согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации;

идея базируется на анализе и обобщении работ, выполненных автором, а также опубликованных российскими и зарубежными исследователями в области изучения молекулярных основ функционирования ионных каналов в модельных и клеточных мембранах;

использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по рассматриваемой тематике.

установлено качественное и количественное совпадение авторских результатов с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике, в тех случаях, когда такое сравнение было обоснованным;

использованы современные методики получения и обработки экспериментальных данных, представительные выборочные совокупности с обоснованием гипотез о статическом распределении изучаемых величин.

Личный вклад соискателя состоит в планировании и проведении экспериментов, получении, обработке, анализе и интерпретации полученных экспериментальных данных. Автор принимал непосредственное участие в апробации результатов исследований, подготовке и написании основных публикаций по выполненной работе.

Диссертация О.С. Остроумовой, посвященная изучению регуляторного влияния дипольных модификаторов мембран на ионные каналы, образуемые антимикробными агентами и токсинами в липидных бислоях, является законченным (в рамках поставленных задач) научно-квалификационным

исследованием, в котором на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические и практические положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое крупное научное достижение в области молекулярной биологии. Диссертационная работа О.С. Остроумовой полностью отвечает требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям (пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842) по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

На заседании 10 июня 2016 г. диссертационный совет принял решение присудить Остроумовой Ольге Сергеевне ученую степень доктора биологических наук по специальности «Молекулярная биология» (03.01.03).

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 7 по специальности рассматриваемой диссертации, участвующих в заседании, из 24 человек, входящих в состав совета, проголосовали:

«ЗА» 17, «ПРОТИВ» нет, недействительных бюллетеней нет.

Председатель

Диссертационного совета Д 002.230.01
на базе ИНЦ РАН,
доктор биологических наук, профессор



А.Л. Юдин

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д 002.230.01
на базе ИНЦ РАН,
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

«13» июня 2016 г.