

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Остроумовой Ольги Сергеевны

"Регуляторное влияние дипольных модификаторов мембран на ионные каналы, образуемые антимикробными агентами и токсинами в липидных бислоях",

представленную к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертационная работа Остроумовой О.С. представляет собой объемное и подробное изложение результатов экспериментального изучения электрических и термодинамических характеристик липидных моделей клеточных мембран в присутствии низкомолекулярных соединений, среди которых основное внимание уделено флавоноидам и близким к ним по структуре стероидам. Такой выбор вполне оправдан благодаря влиянию таких соединений на работу встроенных в бислойную липидную мембрану (БЛМ) ион-проводящих каналов, обнаруженному уже в ранних работах автора. Вполне естественно было ожидать, что их адсорбция на мембране должна отражаться и на работе подобных каналов в натуральных клеточных мембранах. Более того, структурная «близость» исследуемых химических соединений означает не только наличие у них амфифильных свойств, но и заметного дипольного момента, благодаря которому их принято считать дипольными модификаторами мембран. Именно изменение дипольной компоненты граничного потенциала оказывается, по мнению автора, важной причиной изменения проницаемости клеточных мембран и регуляции ионных каналов, хотя известный вклад вносят и прямые структурные перестройки в их липидном окружении. Полученные в работе результаты достаточно демонстрируют адекватность такого предположения. Однако наибольший интерес, на наш взгляд, и особую актуальность данной работе придает возможность в конечном итоге сформулировать ряд выводов, направленных на создание оптимальных фармакологических систем. Тем самым устанавливается важная связь исследований, проведенных на модельных системах, с различными медико-биологическими приложениями. *Актуальность* такого рода задачи и *научно практическая значимость* полученных в работе результатов вполне очевидна и не вызывает никаких сомнений. Этот вывод аргументируется далее при детальном анализе конкретных результатов.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа представлена в традиционном стиле и содержит все необходимые структурные компоненты – введение, обзор литературы (глава 1, и 476 ссылок в списке цитированной литературы), подробное описание материалов и методов в экспериментальном разделе (глава 2), прекрасно иллюстрированное изложение и обсуждение результатов (глава 3) и заключительные выводы. Диссертация хорошо оформлена, при использовании литературных данных цитированы источники в тексте, таблицах и рисунках. Автореферат с достаточной полнотой отражает ее содержание.

Объемный и весьма подробный обзор литературы состоит из нескольких разделов, в первом из которых приведены основные сведения о распределении электрического поля на границах мембран, структурные особенности мембран, сформированных из липидов с различной спонтанной кривизной, факторах, влияющих на фазовое разделение липидов в

мембране. Основной акцент здесь сделан на условиях, когда эти характеристики оказываются существенными в работе изученных в литературе канал-образующих соединений. Это позволило автору аргументировано сформулировать основную концепцию исследования – лидирующую роль в регуляции каналов дипольной компоненты граничного потенциала и структурных изменений в латеральной упаковке липидов в мембране. Эти характеристики мембран существенным образом должны изменяться в присутствии целого ряда соединений стероидного типа, которые обоснованно отнесены к дипольным модификаторам. Их систематическое описание с включением известных в литературе численных характеристик приведены во втором разделе обзора. В разделе 3 обзора описан ряд канал-образующих соединений, в функционировании которых ожидаются заметные изменения при наличии в мембране дипольных модификаторов и/либо структурных изменений в латеральной организации липидов. В заключительном разделе обзора автор приходит к логическому выводу о необходимости экспериментального изучения механизмов регуляции каналов, которые были предложены ранее или сформулированы автором на основании литературных данных. В этом разделе формулируются основные задачи исследования.

В экспериментальной главе 2 в компактном виде обоснован выбор объектов и методов исследования. В списке использованных липидов содержатся все основные компоненты липидного матрикса клеточных мембран, в качестве каналоформеров использованы около 15 соединений различного типа, включая, помимо коммерчески доступных, также выделенные из биологических объектов каналоформеры, предоставленные специализированными лабораториями. Всего в общий список включено около 20 изученных в работе каналоформеров. Следует отметить, что описание экспериментальных методик и, что особенно важно, реальных процедур измерения и обработки данных, выполнено вполне квалифицированно, что делает эту главу полезным практическим пособием для воспроизведения и дальнейшего развития этих методик молодыми коллегами и студентами. Конечно, в ряде случаев было бы полезно расширить экспериментальную базу в рамках сотрудничества с лабораториями и специалистами в близких областях для оценки важных структурных параметров системы.

Большую часть диссертации по понятной причине занимает глава 3, посвященная изложению результатов многолетних исследований и их подробному обсуждению. Поскольку из-за краткости текста автореферата не всегда очевидна связь между результатами и выводами, позволю себе здесь остановиться на этом аспекте чуть более подробно. Классификация флавоноидов и их использование для изучения регуляции каналов (первые два вывода работы) закономерно следуют из всей совокупности приведенных в этой главе результатов, в большинстве случаев суммированных в виде таблиц. Некоторое сомнение возникает лишь в том, что, что наблюдаемые эффекты обусловлены именно дипольной компонентой граничного потенциала. Дипольным эффектом автор считает изменение трансмембранного тока при введении флавоноидов в околосмембранный раствор примерно так, как это обычно интерпретируется в случае популярных модификаторов типа флоретина. Экспериментальные кривые, полученные автором для этого соединения, приведены на рисунке 3.1 и не противоречат известным литературным данным. Такая гипотеза представляется закономерной при наличии дипольного момента у большинства соединений, используемых в работе (таблица 1.1.). Более того, применение формул (2.8) и изотермы Ленгмюра (2.9) дает возможность

применять этот подход для количественного сопоставления большинства флавоноидов по их влиянию на проводимость липидных мембран (таблица 3.1). Автор отдает себе отчет в том, что применимость этих формул подразумевает ряд неочевидных допущений и оставляет открытым вопрос о молекулярной природе параметров этих уравнений. На серии экспериментальных кривых (рисунки 3.6 и 3.8) хорошо видно, что они хорошо линеаризуются в рамках такой простой обработки. Тем самым автор доказывает, что выбранный в работе феноменологический анализ является удобным для проведения классификации и приводит к логически непротиворечивому третьему выводу работы.

Однако остается не ясным, что имеет в виду автор, упоминая плоскость адсорбции столь крупных молекул в полярной области мембран. По всей видимости, здесь неявно предполагается локализация и ориентация собственных дипольных моментов. Строгое доказательство этого факта получить экспериментально весьма непросто, и автор к этому не стремится, ограничиваясь качественным описанием наблюдаемых эффектов. Упуская при этом из виду, что проникновение любых молекул, и даже неорганических ионов, в эту область должно менять состояние гидратной воды, перестройку водородных связей и, конечно, ориентации диполей молекул воды и самих фосфолипидов. Наблюдаемые эффекты являются сложной комбинацией подобных процессов. Понятно, однако, что анализ таких процессов не входил в задачу автора.

В настоящее время в литературе активно разрабатываются экспериментальные подходы и модельные представления о доменной структуре мембран. В диссертации этим аспектам уделено должное внимание. Автор убедительно доказал, что образование доменов может быть стимулировано присутствием флавоноидов и, что этот вывод согласуется с их влиянием на форму термограмм, полученным методом сканирующей дифференциальной калориметрии. Эти результаты, и выводы автора, сами по себе не вызывают сомнений и удивления. Конечно, латеральная сегрегация многокомпонентных липидных мембран известна достаточно давно, однако их изучение в присутствии соединений данного типа впервые подробно проведено в работах автора.

Значительные трудности возникают при изучении более сложных объектов, к которым относятся многие токсины, образующие в мембранах ионные каналы. Приятно видеть, что разработанные автором экспериментальные подходы оказались эффективными в применении к таким объектам. В последнем разделе главы 3 приведены, пожалуй, наиболее важные для практических целей результаты. Здесь необходимо отметить большой цикл исследований каналов, сформированных сириномицином Е. Экспериментальные данные, полученные с этим объектом, как впрочем и с другими каналоформерами, и их теоретическая обработка представляют собой, на наш взгляд, наиболее сильную в физическом отношении часть диссертации. Впечатляет, например, регистрации одиночных каналов в мембранах разного состава, и полученная автором зависимость открытого состояния канала от трансмембранной разности потенциалов. Для проведения подобных измерений и убедительного доказательства их достоверности, требуется незаурядное экспериментальное чутье и даже просто удача. Судя по результатам этого раздела диссертации, удача сопутствовала автору, а тщательность в постановке эксперимента была обеспечена его высокой квалификацией.

Диссертация Остроумовой О.С. представляет собой весьма впечатляющий набор фактов и их количественную обработку, позволяющих качественно анализировать широкий класс соединений по их влиянию на проводимость большинства известных ион-

селективных каналов. Интерпретация этих фактов не противоречит основной концепции автора. Конечно, доказательная сила этой интерпретации существенно повысилась бы при оценке изменений в исследуемых системах прямыми структурными методами, например, спектральными, либо получая подтверждение в рамках современных методов молекулярного моделирования. Ценность данной работы, на наш взгляд, состоит в другом: эмпирические исследования и гипотезы, сформулированные на их основе, безусловно важны для очевидных практических медико-биологических приложений. Более того, они стимулируют интерес в коллективах, владеющих сложными физическими методиками и аппаратурой, к фундаментальным исследованиям в данной области.

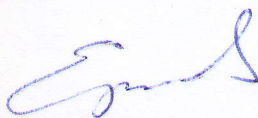
Заключение

Считаю, что диссертационная работа Остроумовой Ольги Сергеевны "Регуляторное влияние дипольных модификаторов мембран на ионные каналы, образуемые антимикробными агентами и токсинами в липидных бислоях", представленная к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология, является научно-квалификационной работой. В диссертации на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические и практические положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое крупное научное достижение в области изучения молекулярных основ функционирования ионных каналов в модельных и клеточных мембранах.

По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов работа Остроумовой Ольги Сергеевны соответствует требованиям п. 9 «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.

Ведущий научный сотрудник лаборатории биоэлектрохимии
Федерального государственного учреждения науки Институт
физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина
Российской академии наук, доктор физико-математических
наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

23 мая 2016 г.



Ю.А.Ермаков

Адрес: 119071, Москва, Ленинский проспект, 31, корп. 5

Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН

Сайт: <http://www.phyche.ac.ru/> Телефон: +7(495)954-72-16, Факс: +7(495)952-53-08

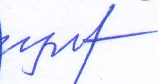
E-mail: yury.a.ermakov@gmail.com

Подпись руки Ю.А. Ермакова удостоверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения
науки Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина

Российской академии наук, к.х.н.



 И.Г.Варшавская