

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Ольги Сергеевны Остроумовой

**“РЕГУЛЯТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ ДИПОЛЬНЫХ МОДИФИКАТОРОВ МЕМБРАН НА
ИОННЫЕ КАНАЛЫ, ОБРАЗУЕМЫЕ АНТИМИКРОБНЫМИ АГЕНТАМИ И
ТОКСИНАМИ В ЛИПИДНЫХ БИСЛОЯХ”,**

представленную к защите на соискание учёной степени доктора биологических наук
(специальность 03.01.03 – молекулярная биология)

Одной из важнейших и актуальных проблем современной биологии и биофизики клетки является выяснение структурно-функциональной организации, механизмов регуляции и патологии ионных каналов мембран. Классическими модельными системами для изучения молекулярных механизмов функционирования каналов являются ионные каналы, образуемые природными антибиотиками и токсинами с известной структурой молекул в искусственных и клеточных мембранах. Изучение свойств каналов, индуцируемых в природных и модельных мембранах белками-каналоформерами, способствует пониманию строения и физико-химических основ функционирования и регуляции ионных каналов биологических мембран. В связи с этим, диссертация **О.С. Остроумовой**, посвященная исследованию молекулярных механизмов влияния широкого спектра дипольных модификаторов мембран на формирование и функционирование ионных каналов, образованных антимикробными агентами и токсинами в модельных липидных мембранах, представляется чрезвычайно интересной и актуальной.

Диссертация изложена на 286 страницах машинописного текста; написана по традиционному плану: состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 476 публикаций. Работа иллюстрирована 128 рисунками и 35 таблицами. Диссертация написана четко, логично, с интересом читается.

Во введении автор обосновывает актуальность, научную новизну, теоретическую и практическую значимость избранной темы исследования, а также формулирует цель и задачи работы.

Глава «Обзор литературы» включает четыре раздела. В первом разделе обсуждаются данные литературы о влиянии физико-химических свойств липидного бислоя (дипольного потенциала мембраны, геометрической формы и фазового состояния липидов) на активность ионных каналов. Во втором разделе проведен анализ самых последних данных литературы о классификации и мембранной активности дипольных

модификаторов мембран (флавоноидов, стирилпиридиновых красителей и тиреоидных гормонов). Особый интерес представляют информативные таблицы 1.1 и 1.2, в которых приведены химические структуры и фармакологическая активность наиболее известных флавоноидов. Следует особо отметить третий раздел обзора литературы, в котором детально описаны процессы формирования и характеристики ионных каналов, образуемых в искусственных и природных мембранах широким спектром каналоформеров с известной структурой молекул: липопептидами (противогрибковым липопептидом сирингомицином E, антимикробным липопептидом сурфактином), пептидами (α -гемолизином золотистого стафилококка, антимикробными пептидами цекропинами и амилоидогенными и амилоидоподобными пептидами), а также антимикотическими полиеновыми антибиотиками амфотерицином B, нистатином и филипином. В целом, обзор оставляет очень приятное впечатление. Обзор литературы информативен и демонстрирует глубокое знакомство диссертанта с кругом изучаемых проблем.

Важность и достоверность получаемых результатов в любой экспериментальной работе зависит прежде всего от адекватности и корректности применения методических подходов. Диссертационная работа **О.С. Остроумовой** выполнена на модельных липидных мембранах – плоских липидных бислоях и моноламеллярных липосомах - с использованием широкого спектра самых современных методов исследования: биофизического метода фиксации потенциала на бислойных липидных мембранах, дифференциальной сканирующей микрокалориметрии и конфокальной флуоресцентной микроскопии. В главе "Материалы и методы исследования" детально описаны методы формирования бислойных липидных мембран, автоматизированный комплекс для фиксации потенциала на модельных мембранах, обработка экспериментальных данных, методы измерения биофизических характеристик (проводимости, времени открытого состояния, катион-анионной селективности и величин воротного заряда) каналов, сформированных в липидных мембранах каналоформерами с известной структурой молекул, а также методы измерения изменения дипольного потенциала мембран при адсорбции дипольных модификаторов. Следует специально отметить, что методический раздел диссертации написан очень четко и детально, что свидетельствует о методическом мастерстве автора.

Полученные **О.С. Остроумовой** экспериментальные данные несомненно являются **приоритетными**. Автором **впервые** проведено широкое комплексное исследование молекулярных механизмов влияния трех групп дипольных модификаторов мембран (флавоноидов, стирилпиридиновых красителей и тиреоидных гормонов) на

формирование и функционирование ионных каналов, образованных антимикробными агентами и токсинами в модельных липидных мембранах. Изучена каналоформерная активность широкого спектра каналообразующих агентов, включающих крупные белковые поры (α -гемолизин золотистого стафилококка, антимикробные пептиды цекропины и амилоидогенные и амилоидоподобные пептиды и белки), липопептиды (противогрибковый липопептид синрингомицин Е, антимикробный липопептид сурфактин) и макролидные полиеновые антибиотики (амфотерицин В, нистатин и филипин).

Впервые показано, что дипольные модификаторы влияют на важнейшие физико-химические характеристики модельных мембран (дипольный потенциал, латеральную организацию мембран и геометрические характеристики бислоя) (раздел 3.1). При этом наиболее эффективными модификаторами дипольного потенциала мембран оказались флавонолы (кверцетин и мирицетин) и изофлавоны (генистейн и биоханин А). Полученные данные позволили автору использовать дипольные модификаторы в качестве инструментов исследования механизмов функционирования ионных каналов, образованных антимикробными агентами и токсинами в модельных липидных мембранах.

Впервые показано, что дипольный потенциал мембраны играет важную роль в регуляции активности ионных каналов, образованных липопептидами (синрингомицин Е, сурфактин) и цекропинами А и Б, модулируя заряд-дипольные и диполь-дипольные взаимодействия между каналоформерами и липидным бислоем.

Особый интерес имеют данные о прямом взаимодействии дипольных модификаторов с ионными каналами. Впервые показано, что 5-(7-) и 4'-гидроксилированные флавоноиды прямо взаимодействуют с сенсором напряжения альфа-гемолизинового канала и изменяют его чувствительность к потенциалу. Предполагают, что сенсор напряжения альфа-гемолизинового канала локализован в богатом глицином участке с цитоплазматической стороны β -складчатости. Обнаружено также, что электростатическое взаимодействие флоретина с фрагментом 25-35 β -амилоида приводит к увеличению его каналообразующей активности. Это может указывать на потенциальную возможность регулировать амилоидогенную активность и токсичность агентов, сопровождающих болезнь Альцгеймера.

Несомненную практическую значимость для фармакологии и медицины имеет обнаруженный синергизм действия флоретина и антимикотических полиеновых антибиотиков амфотерицина В и нистатина. Полученные данные могут быть использованы для создания новых эффективных лекарственных средств, включая их липосомальные формы.

В разделах 3.3 и “Заключение” представлена общая схема, предложенная автором на основании результатов исследования и анализа данных литературы, которая отражает возможные механизмы влияния дипольных модификаторов и липидной фазы мембраны на каналобразующую активность токсинов и антимикробных агентов.

Таким образом, с использованием дипольных модификаторов в качестве индукторов изменения физико-химических характеристик модельных липидных мембран, в работе **Ольги Сергеевны Остроумовой** впервые показана важная роль липидной фазы мембраны в модуляции активности ионных каналов, образованных антимикробными агентами и токсинами. Полученные данные могут явиться основой для изучения роли липидов в модуляции активности ионных каналов клеточных мембран.

Необходимо отметить, что работа прекрасно написана и оформлена, в ней приведены многочисленные и информативные рисунки (128) и 35 таблиц, дающие возможность детального знакомства как с исходным экспериментальным материалом, так и с результатами его обработки. Работа хорошо построена по логике экспериментов и по логике изложения материала.

Выводы сформулированы автором четко и обоснованно.

Основные результаты и выводы диссертации отражены в 27 статьях в ведущих отечественных (9 статей) и престижных зарубежных (18 статей) журналах, 1 монографии, 1 обзорной статье, 55 работах в сборниках трудов конференций и автореферате; их можно рекомендовать для использования в работе биологических факультетов ряда университетов, физиологических и медицинских институтов, в частности в Санкт-Петербургском государственном университете, Санкт-Петербургском политехническом университете Петра Великого, Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, Институте Эволюционной Физиологии и Биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Институте Физиологии им. И.П. Павлова РАН, Институте Цитологии РАН, Институте Биофизики клетки РАН, Институте Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН, а также в учебном процессе соответствующих вузов.

Диссертация **О.С. Остроумовой** имеет несомненное теоретическое и практическое значение для молекулярной биологии, биофизики, физиологии, медицины, фармакологии. Полученные автором **новые** данные о молекулярных механизмах влияния дипольных модификаторов на образование и функционирование каналов, образованных токсинами и антимикробными агентами в модельных мембранах, вносят существенный вклад в выяснение молекулярных механизмов функционирования и регуляции ионных каналов клеток, а также в понимание природы биологической активности природных соединений, индуцирующих проводимость мембран.

В порядке дискуссии хотелось бы задать автору следующие вопросы:

1. В разделе 3.1.1.3, посвященном диполь-модифицирующей способности гормонов щитовидной железы, обсуждается зависимость гормон-индуцированного уменьшения дипольного потенциала от заряда мембранообразующих липидов. Поскольку в случае других используемых в работе модификаторов также наблюдалась зависимость от формы липидов, возникает вопрос, зависит ли диполь-модифицирующее действие тироксина и трийодтиронина от геометрических характеристик молекул, формирующих бислои?

2. В разделе 3.1.3 указано, что некоторые флавоноиды, в частности, флоретин, биоханин А и генистеин способны индуцировать высвобождение флуоресцентного маркера кальцеина из липосом. В связи с этим возникает вопрос, каков механизм утечки кальцеина из липосом под действием этих флавоноидов?

3. На рис. 3.87 можно заметить, что биоханин А ингибирует утечку кальцеина, обусловленную полиеновыми антибиотиками нистатином и амфотерицином Б. Является ли диссипация градиента маркера единственной причиной наблюдаемых эффектов? Изменяется ли при этом каналобразующая активность полиеновых макролидов?

В целом, диссертация **О.С. Остроумовой**, выполненная на высоком научном и методическом уровне, заслуживает высокой оценки, в ходе ее выполнения получены **новые** данные по актуальной проблеме. Являясь законченным исследованием, работа при этом раскрывает большие перспективы для дальнейшего развития.

Заключение. 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 законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические и практические положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое крупное научное достижение в области исследования мембранного транспорта.

По актуальности темы, новизне полученных результатов, теоретической и практической значимости 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.

True

З.И. Крутецкая

24 мая 2016 г.

Адрес: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9
Санкт-Петербургский государственный университет
Сайт биологического факультета университета: <http://bio.spbu.ru/>
Тел.: +7(812) 328-94-65
E-mail: z.krutetskaya@spbu.ru

личную подпись
З.И. Крутицкой
удостоверено



24.05.2016