



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

25.05.16 № 150-217.1-443

на № 12316-806-133 от 11.05.2016

«УТВЕРЖДАЮ»



Директор ИБХ РАН
академик В.Т. Иванов
24 мая 2016 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации

на диссертацию **Ольги Сергеевны Остроумовой**

«Регуляторное влияние дипольных модификаторов мембран на ионные каналы, образуемые антимикробными агентами и токсинами в липидных бислоях»,
представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертационная работа О.С. Остроумовой посвящена разработке новых молекулярных инструментов для управления функциональными свойствами ионных каналов. В качестве таких инструментов предлагается обширная гетерогенная группа мембрано-активных соединений, т.н. «дипольных модификаторов», среди которых особое внимание уделяется флавоноидам, полифенолам растений. Для демонстрации применимости предлагаемых инструментов автор использует целый ряд ионных каналов, формируемых различными по химическому строению и биологическому источнику соединениями: липопептидами (сирингомицином Е, сурфактином), пептидами (цекропинами, амилоидными пептидами), белками (α -гемолизином), полиеновыми макролидами (амфотерицином В, нистатином и филипином). Актуальность исследования хорошо аргументирована: действительно, удобные инструменты управления активностью ионных каналов необходимы как для изучения фундаментальных основ функционирования мембранного транспорта, так и для разработки лекарств, мишенью которых служат ионные каналы.

Диссертация изложена на 286 страницах, состоит из введения, где в том числе сформулированы цель и задачи исследования, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и обсуждения, заключения, выводов, перечня сокращений, списка работ автора по теме диссертации и списка литературы, включающего 476 ссылок. Текст хорошо

иллюстрирован, содержит 128 рисунков и 35 таблиц.

Задачи исследования соответствуют цели и раскрывают ее. Обзор литературы включает несколько сотен ссылок на оригинальные источники, от классических работ до наиболее недавних публикаций. Построение обзора, на наш взгляд, логичное и позволяет читателю разобраться в современном состоянии изучаемой проблемы – регуляции активности ионных каналов с помощью изменения свойств мембраны, а кроме того в разнообразии объектов исследования – флавоноидов и других дипольных модификаторов (в работе также используются стироловые красители и тиреоидные гормоны) и экзогенных соединений, формирующих ионные каналы. Особо отмечаем наличие кратких выводов в конце каждого параграфа, сильно упрощающих понимание сути излагаемых фактов и гипотез. Кроме того, специальный раздел О.С. Остроумова отводит выделению проблемных вопросов, сложившихся в области, ответу на которые и посвящена диссертационная работа. Здесь же аргументируется выбор экспериментальных методов для решения поставленных задач, что служит логичной связкой со следующей главой.

В экспериментальной части описываются использованные автором методики электрофизиологии, микроскопии и калориметрии. Здесь собрана информация о материалах и реактивах, содержатся все подробности, позволяющие при необходимости воспроизвести поставленные О.С. Остроумовой эксперименты. Приводятся структурные формулы использованных диссертантом липидов и ионофоров, схема экспериментальной установки для работы с плоскими липидными бислоями, а также формулы для расчета определяемых в экспериментах параметров. Условия поставленных опытов удобно отражены в виде таблиц. Отметим полноту и лаконичность этой главы.

Изложение результатов диссертант начинает с действия дипольных модификаторов на физико-химические свойства липидных бислоев: дипольный потенциал, температуру плавления и фазовое состояние липидов, проницаемость. В общей сложности изучено влияние порядка двух десятков соединений (в основном, представителей разных классов флавоноидов, но также нескольких стироловых красителей и тиреоидных гормонов) на мембраны различного состава (фосфолипидные, а также содержащие стерины и сфинголипиды). В результате автор предлагает классифицировать дипольные модификаторы на две группы по способу взаимодействия с мембранами (локализующиеся в области раздела фаз и проникающие глубже) и на несколько групп по характеру воздействия на свойства мембран (три группы для флавоноидов: уменьшающие дипольный потенциал и вызывающие разупорядочение липидов, снижающие потенциальный барьер для катионов в полярной области мембраны, не оказывающие непосредственного влияния на распределение

электрического поля на границах мембраны и ее фазовое состояние). При этом О.С. Остроумова утверждает, что в случае модификаторов, способных интеркалировать в мембрану, имеет место взаимозависимость изменений дипольного потенциала мембраны, фазового разделения липидов и проницаемости бислоя.

Затем автор переходит к исследованию влияния дипольных модификаторов на функциональные свойства ионных каналов, реконструированных в плоских липидных бислоях. Вначале излагаются данные, касающиеся каналов, формируемых липопептидом сирингомицином E. Диссертант убедительно демонстрирует, что увеличение дипольного потенциала мембраны сопровождается ростом проводимости и времени жизни элементарных каналов, формируемых сирингомицином E, а также снижением кооперативности открывания и уменьшением числа функционирующих в мембране липопептидных пор. Эти наблюдения получают интерпретацию с точки зрения вероятного устройства каналов в виде асимметричной липопептид-липидной поры, предлагается модель их работы. Эксперименты с ионными каналами, образуемыми липопептидом сурфактином, позволяют О.С. Остроумовой заключить, что наблюдаемая их многоуровневая проводимость обусловлена олигомеризацией молекул липопептида, а геометрические характеристики закрытого и открытых состояний предполагаемых симметричных каналов сходны.

Изучение мембранной активности цитолитических пептидов цекропинов A и B приводит автора к обнаружению ион-проводящих пор, формирующихся при сравнительно низких концентрациях пептидов (при концентрациях свыше ~10 мкМ наблюдается разрушение мембран). При интерпретации полученных результатов с использованием различных липидов и дипольных модификаторов диссертант склоняется к модели олигомерного цилиндрического пептидного канала. Кроме того, полученные данные свидетельствуют в пользу интеркаляции в мембрану C-концевого участка пептида. Исследование влияния дипольных модификаторов на ионные каналы, формируемые амилоидными пептидами, приводит к диссертанта к обнаружению выраженного потенцирующего эффекта одного из флавоноидов, флоретина. Предполагается, что механизм действия флоретина реализуется за счет прямого связывания с амилоидными олигомерами. При этом его нейропротекторное действие ставит под сомнение взаимосвязь нейротоксичности амилоидов с образованием ими ионных каналов в клеточных мембранах.

В результате изучения воздействия дипольных модификаторов на каналы, формируемые α -гемолизином, О.С. Остроумова неожиданно обнаруживает селективную активность 5-, 7- и 4'-гидроксилированных флавоноидов, которые оказываются способными увеличивать потенциал-чувствительность каналов при связывании с ними в

стехиометрическом соотношении 3:1. Анализ структуры этих флавоноидов и олигомера α -гемолизина позволяет автору предположить локализацию сенсора потенциала в канале.

Наконец, детальное рассмотрение механизмов регуляции дипольными модификаторами активности полиеновых макролидов позволяет О.С. Остроумовой, во-первых, обнаружить потенцирующий эффект флоретина в отношении каналов, формируемых нистатином, и, во-вторых, выдвинуть модель, объясняющую этот эффект. Флоретин, по заключению автора, можно рассматривать в качестве потенциального синергиста терапевтического действия нистатина.

Специальный раздел посвящен наблюдаемым закономерностям в регуляции активности ионных каналов за счет направленной модификации свойств мембран дипольными модификаторами. Здесь приводится финальная схема, иллюстрирующая роль липидного матрикса мембран в каналообразующей активности антимикробных агентов и токсинов, которую удобно сравнивать с аналогичной схемой, приведенной ранее в обзоре литературы. В результате наглядно демонстрируется вклад диссертанта в рассматриваемую проблему.

Изложение результатов удобно для читателя и производит хорошее впечатление: во-первых, выбран, на наш взгляд, оптимальный вариант рубрикации (влияние дипольных модификаторов на свойства мембран – регуляция дипольными модификаторами ионных каналов – обобщение результатов и поиск закономерностей), а во-вторых, наличие кратких выводов в конце каждого раздела позволяет следить за ходом работы, развитием замысла автора, наконец в-третьих, сравнение получаемых результатов с литературными данными дает возможность оценить вклад автора в контексте современного состояния проблемы.

Полученные в работе результаты отличаются высокой степенью новизны и значимости для дальнейших исследований в области ионных каналов. Наиболее важный, с нашей точки зрения, результат заключается в том, что влияние дипольных модификаторов на ионные каналы оказалось гораздо более разнообразным, чем представлялось ранее: это далеко не только эффекты, связанные непосредственно с изменением дипольного потенциала мембран. А наиболее любопытными представляются случаи, где отмечено специфичное взаимодействие исследованных соединений с ионными каналами.

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. Цель и задачи исследования сформулированы в работе дважды: во введении и в

конце обзора литературы. Хотя в каждом случае формулировки и обоснования приводятся логичные, на наш взгляд, это несколько избыточно.

2. Присутствует некоторая неточность в терминологии. Так, на стр. 20 медоносную пчелу автор называет «медовой». При описании структуры α -гемолизина (стр. 74-77) и возможного механизма взаимодействия с ним флавоноидов (стр. 205-207) диссертант использует термин « β -складчатость» вместо традиционных « β -структура» или « β -слой», а кроме того ошибочно называет β -тяжи β -слоями.

3. Среди важных обобщений, которые делает автор, – классификация дипольных модификаторов на две группы по способу взаимодействия с мембранами (локализирующиеся в области раздела фаз и проникающие глубже). Существуют разнообразные методы, позволяющие экспериментально оценить глубину проникания различных веществ в бислои. Не кажется ли автору, что подобные опыты необходимы для подтверждения выдвинутых предположений?

4. Основная часть результатов получена в условиях реконструкции ионных каналов в плоских липидных бислоях. Нам кажется, что стоило бы более подробно описать методические ограничения. Например, хорошо известно, что используемый в некоторых экспериментах фосфатидилсерин локализован в природных мембранах преимущественно во внутреннем монослое. Можно ли все наблюдаемые эффекты заведомо считать реализуемыми и в случае природных мембран?

5. Модель олигомерного цилиндрического пептидного канала в случае цекропинов не кажется убедительной. Дело в том, что длины только С-концевого участка молекулы цекропина в α -спиральной конформации не хватает для того, чтобы пронизывать мембрану, а вся молекула характеризуется сравнительно большим положительным зарядом (+7 при нейтральном рН у цекропина А), и потому формирование олигомеров крайне невыгодно. Считает ли автор, что модель тороидальных пептид-липидных пор лучше?

Указанные недостатки не снижают общего удовлетворения от ознакомления с текстом диссертации. Результаты работы и представленные выводы соответствуют поставленным цели и задачам исследования. Диссертационная работа О.С. Остроумовой соответствует заявленной специальности 03.01.03 – молекулярная биология. Автореферат достаточно полно отражает содержание, основные результаты и выводы диссертации, хотя в ряде случаев для уточнения экспериментальных условий не обойтись без полного текста диссертации.

По материалам работы опубликовано 27 статей, в том числе многие – в ведущих

научных журналах в области липидов и мембран. Результаты докладывались диссертантом на научных семинарах Института цитологии РАН и Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина, на многих российских и международных конференциях, в том числе на 37-м и 38-м конгрессах ФЕБО, 17-м Международном биофизическом конгрессе, конференции Европейского биофизического общества. По теме диссертации подготовлено учебное пособие для студентов ВУЗов.

Результаты, полученные О.С. Остроумовой, могут быть использованы для научных исследований в различных институтах РАН (например, в Институте цитологии, Институте физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина, Институте биоорганической 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 представлена одним из ярких ученых нашей страны в области биофизики мембран и ионных каналов. Работы О.С. Остроумовой известны, и ее вклад в разработку новых инструментов для модификации работы целого ряда ионных каналов признается в научном сообществе. Подтверждением тому служат статьи в высокорейтинговых профильных журналах (например, *Langmuir* и *BBA-Biomembranes*), а также победа в престижных конкурсах и получение премий (грант Президента РФ, премия Европейской академии для молодых ученых России, национальная премия Л'Ореаль-ЮНЕСКО «Для женщин в науке»).

Диссертация соответствует требованиям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, в том числе пп. 9-14 данного Положения, а ее автор, Ольга Сергеевна Остроумова, заслуживает присуждения степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Пользуясь случаем, передаем поздравления всем коллегам Ольги Сергеевны и особенно её учителю – профессору Людмиле Владимировне Щагиной.

Отзыв обсужден и утвержден на совместном семинаре Отдела молекулярной нейробиологии и лаборатории моделирования биомолекулярных систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, протокол № 2 от 19 апреля 2016 г. (журнал научных коллоквиумов Отдела молекулярной нейробиологии).

Заведующий лабораторией
моделирования биомолекулярных систем,
заместитель директора ИБХ РАН,
д.ф.-м.н. Р.Г. Ефремов
специальность 03.00.02 – биофизика



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



«Подписи Р.Г. Ефремова и А.А. Василевского заверяю»

Ученый секретарь ИБХ РАН,
д.ф.-м.н. В.А. Олейников



Контактная информация:

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

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

Эл. почта: office@ibch.ru

Официальный сайт: www.ibch.ru