

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

Ионные каналы, регулирующие обмен ионов в клетке, играют огромную роль в физиологии. В частности, именно ионными каналами опосредуется большинство быстрых нейрофизиологических реакций. Помимо «эндогенных» каналов, белков, которые экспрессируются самой клеткой, существуют экзогенные соединения, которые взаимодействуют с клеточной мембраной и формируют в ней ионные поры. Очевидно, что функциональные характеристики встроенных в мембрану каналоформеров должны зависеть от свойств самой мембраны. Это особенно важно для низкомолекулярных экзогенных каналоформеров, которые в отличие от каналов белковой природы не образуют плотно упакованных и структурно стабильных мембранных доменов. К таким мембранно-чувствительным порам относятся и антимикробные агенты и токсины, которые исследуются в работе Ольги Сергеевны Остроумовой. Зависимость каналоформеров от свойств мембран делает актуальным изучение различных химических модификаторов мембран, таких как флавоноиды. Практическая значимость этих агентов несомненно свидетельствует об актуальности темы работы.

Важным условием успешной научной работы является формулировка конкретных задач исследования в рамках выбранной темы, подбор методов и объектов исследования. В этом отношении работа О.С. Остроумовой заслуживает самой высшей оценки. Во-первых, работа не сводится к поиску новых агентов и характеристике их действия. В задачи работы входит систематизация и развитие современных фундаментальных представлений о молекулярных механизмах влияния модификаторов мембран на различные каналоформеры. Во-вторых, в качестве объекта используются искусственные мембраны. Они гораздо проще по строению, чем нативные биомембраны, что позволяет выявить базовые механизмы влияния модификаторов. В третьих, в работе используется богатый набор методических подходов, что позволяет проанализировать разные аспекты

изучаемых явлений. Таким образом, в сочетании с практической значимостью темы, диссертационная работа О.С. Остроумовой является прекрасным примером того, что фундаментальное научное исследование может сделать для прикладной науки.

В работе получен ряд ценных результатов, которые адекватно отражены в выводах. Среди флавоноидов обнаружены новые дипольные модификаторы. Изучены структурно-функциональные взаимосвязи в широком круге таких соединений. Разработана модель, постулирующая два различных механизма изменения дипольного потенциала под действием флавоноидов: посредством интеркаляции их диполей в липидный бислой и модификации состояния гидратации полярных головок мембранных липидов. Исследована способность флавоноидов влиять на доменную структуру и фазовое разделение в мембранах. Предложена классификация флавоноидов по функциональным характеристикам их взаимодействия с липидным бислоем. Помимо флавоноидов охарактеризовано влияние на физико-химические свойства мембран различного состава и ряда других дипольных модификаторов, стирилпиридиновых красителей и тиреоидных гормонов. Показано, что встраивание в мембрану дипольных модификаторов или липидов, склонных к образованию неламеллярных фаз, приводит к изменению активности липидных пор, формируемых не только пептидами, как считалось ранее, но также липопептидами и полиеновыми макролидами. Оригинальный методический подход, разработанный автором, позволяет комплексно оценить изменения физико-химических свойств мембраны под действием низкомолекулярных амфифилов: изменения дипольного потенциала, характера латеральной гетерогенности (соотношений между твёрдыми и жидкими упорядоченными и неупорядоченной бислойными липидными фазами), температуры плавления насыщенных цепей фосфохолинов и проницаемости мембран для гидрофильных флуоресцентных маркеров. Следует отметить, что, помимо экспериментальных результатов, автор приводит классификацию протестированных соединений в соответствии с их свойствами и проводит параллели структура–свойство и структура–функция, что несомненно усиливает впечатление от этой части работы.

Все полученные в работе результаты опубликованы в представительном наборе статей в российских и международных журналах высокого уровня. Следует отметить, что помимо статей по конкретным результатам в списке работ О.С. Остроумовой имеется глава в книге, обзор в специализированном журнале и учебное пособие. Таким образом, работы прошли международную оценку и используются в учебном процессе. В целом, список

публикаций не оставляет сомнений в качестве, значимости и надежности полученных данных. Работы, представляемые на соискание ученой степени доктора наук должны помимо конкретных результатов содержать фундаментальное обобщение. В работе О.С. Остроумовой такое обобщение содержится в схеме, иллюстрирующей механизмы влияния липидного матрикса мембран на активность антимикробных агентов и токсинов. Значительная часть этой обобщенной схемы составлена из работ автора.

Сам текст диссертационной работы построен по классическому образцу. Объем диссертации – 286 страниц, количество ссылок на источники – 476. Литературный обзор занимает 80 страниц, написан очень грамотно и ясно, прекрасно проиллюстрирован. Цитируемая литература – в высшей степени современная. Так, среди первых 100 ссылок на источники порядка 80 – работы, опубликованные после 2000 года. Важно, что обзор литературы заканчивается суммированием современного состояния темы, ее проблем и перспектив. Из этого логично вытекают задачи исследования и обоснование методов и подходов. Методическая часть диссертации изложена достаточно сжато, однако содержит все необходимые сведения.

Основную часть диссертации составляет глава «Результаты и обсуждение». Несмотря на большой объем, глава хорошо структурирована. Каждая часть начинается с краткого описания мотивации исследования и заканчивается суммированием полученных результатов. Очень полезным мне представляется наличие в каждой части работы упоминания списка публикаций автора по данному конкретному вопросу. Отсутствие в диссертации отдельной главы «обсуждение» компенсируется наличием раздела 3.3. «Общие закономерности липидопосредованной регуляции дипольными модификаторами мембран ионных каналов, образуемых антимикробными агентами и токсинами» а также информативного заключения.

Замечания и вопросы

- 1) В методической части отсутствует параграф, посвященный флуориметрической оценке изменений дипольного потенциала, хотя результаты подобных измерений обсуждаются в параграфе 3.1.1.1.
- 2) В разделе 3.2.4 представлены результаты оценки проницаемости для кальцеина везикул, модифицированных фрагментом 25-35 β -амилоидного пептида, до и после введения флоретина. Снижение временного параметра, характеризующего медленную компоненту утечки, автор трактует в пользу изменения агрегационного статуса пептида. А с чем автор связывает снижение быстрой компоненты и как это согласуется с общей концепцией?
- 3) Параграф 3.2.6.1, посвященный исследованию симметричных полиеновых каналов, содержит очень большое количество экспериментального материала, полученного автором при последовательном варьировании состава модельной системы. Несмотря на то, что соответствующий раздел достаточно хорошо структурирован, целостную картину составить сложно: что на что влияет, в какую сторону, при каких условиях? К одной из причин сложности прочтения можно отнести отсутствие иллюстративного материала, результаты представлены в виде таблиц. Учитывая, что в итоге автор приходит к заключению, что ключевая роль в каналообразующей активности полиеновых макролидных антибиотиков принадлежит влиянию различных компонентов мембраны на энергию комплексообразования полиен-стерин, хорошим подспорьем могли бы служить схемы подобные рис. 1.35, иллюстрирующие модели двойных или тройных комплексов «антибиотик-липид-дипольный модификатор». Подобные схемы, в упрощенном виде суммирующие экспериментальные данные, могли бы позволить следить за выводами о тех или иных закономерностях.

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 молекулярных механизмов активации и инактивации ионных каналов, образуемых различными классами экзогенных соединений.

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, а её автор заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Заведующий лабораторией биофизики
синаптических процессов Федерального
государственного учреждения науки
Институт эволюционной физиологии и
биохимии им. И.М. Сеченова Российской
академии наук, доктор биологических
наук по специальности 03.03.01 –
физиология.

24 мая 2016 г.

Д.Б. Тихонов



Подпись руки *Тихонова Д.Б.*
удостоверяю
зап. канцелярией *Остроумова О.С. (Тихонов Д.Б.)*
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института эволюционной
физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук
24.05.2016

Адрес: 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

Сайт института: <http://www.iephb.ru/>

Телефон: (812) 552-7901, Факс: (812) 552-3012

E-mail: denistikhonov2002@yahoo.com