

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА  
Д 002.230.01 НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО  
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
ПО ДИССЕРТАЦИИ **ЧУЛКОВА ЕВГЕНИЯ ГЕОРГИЕВИЧА**  
НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № \_\_\_\_\_

Решение диссертационного совета от 25 декабря 2015 № 201/380

О присуждении **ЧУЛКОВУ ЕВГЕНИЮ ГЕОРГИЕВИЧУ** (Россия) учёной степени кандидата биологических наук

Диссертация **«МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ФЛАВОНОИДОВ НА КАНАЛООБРАЗУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ НИСТАТИНА»**

**по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».**

**принята к защите** 16.10.2015 г., протокол № 199/378 Диссертационным советом Д 002.230.01, созданный на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, адрес: Тихорецкий проспект, д.4, Санкт-Петербург 194064, Россия, утверждён приказом Минобрнауки РФ № 105/нк от 11.04.2012 г.

**Соискатель** Чулков Евгений Георгиевич, 1989 года рождения, в 2012 г. окончил факультет медицинской физики и биоинженерии по направлению прикладные математика и физика (специализация «прикладные математика и физика»), с присвоением степени магистра. С 23.08.2013 – по 25.12.2015 гг – очная аспирантура в Институте цитологии РАН. Диссертация выполнена в порядке прохождения аспирантуры.

**Работает** в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии РАН с 2010 года в Группе моделирования ионных каналов Лаборатории ионных каналов клеточных мембран, с 2013 года по настоящее время – старший лаборант-исследователь с в/о.

**Диссертация выполнена** в Группе моделирования ионных каналов Лаборатории ионных каналов клеточных мембран Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии РАН.

**Научный руководитель** – кандидат биологических наук, доцент **ОСТРОУМОВА ОЛЬГА СЕРГЕЕВНА**, старший научный сотрудник руководитель Группы моделирования ионных каналов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии РАН, кандидат биологических наук (специальность 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология»)

Официальные оппоненты:

1. **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, доктор биологических наук (специальность физиология).
  2. **КОТОВА ЕЛЕНА АВРАМОВНА**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, кандидат биологических наук (специальность биофизика).
- 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 в своём положительном заключении, (заключение составлено руководителем Группы молекулярных инструментов для нейробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, к.х.н. А.А. Василевским и утверждено заместителем директора Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова д.ф.-м.н. Р.Г. Ефремовым указала, что диссертационная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне, результаты представляют научно-практическую ценность и соискатель заслуживает присуждения искомой степени, и

**- дала положительный отзыв на диссертацию.**

**Соискатель имеет 12 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 11 публикаций, из них 3 работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях, в том числе 3 статьи входят в рекомендованный перечень ВАК.**

### **Наиболее значимые работы по теме диссертации:**

1. 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 статье представлены результаты изучения влияния флоретина, биоханина А и мирицетина на латеральную гетерогенность мембран гигантских однослойных липосом, составленных из бинарных смесей диолеоилфосфатидилхолина с димиристоилфосфатидилхолином,

дипальмитоил фосфатидил холином и сфингомиелином. Показано, что флоретин и биоханин А оказывают разжижающее действие на гелеобразные домены.

2. **Chulkov E.G.**, Efimova S.S., Schagina L.V., Ostroumova O.S. Direct visualization of solid ordered domains induced by polyene antibiotics in giant unilamellar vesicles. // *Chem. Phys. Lipids*. 2014. Vol. 183. P. 204–207. В статье описаны результаты исследования влияния полиеновых антибиотиков на латеральную гетерогенность мембран гигантских однослойных липосом. Показано, что нистатин, амфотерицин Б и филиппин индуцируют образование твёрдых упорядоченных липидных доменов в липосомах из пальмитолеоилфосфатидилхолина, смесей диолеоилфосфатидилхолина с холестерином и сфингомиелином.

3. **Chulkov E.G.**, Schagina L.V., Ostroumova O.S. Membrane dipole modifiers modulate single-length nystatin channels via reducing elastic stress in the vicinity of the lipid mouth of a pore. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2015. Vol. 1848. P. 192–199. В статье представлены результаты изучения влияния флавоноидов на каналобразующую активность нистатина. Показано, что таксифолин, кверцетин, биоханин А, мирицетин, флоретин, флорицин генистеин и генистин увеличивают трансмембранный ток, индуцированный односторонней добавкой нистатина. Установлено, что эффект флавоноидов опосредован влиянием на липидное транс-устье полиен-липидной поры, но не изменениями дипольного потенциала или латеральной гетерогенности под действием флавоноидов.

#### **На диссертацию и автореферат поступили отзывы:**

1. Директора научно-образовательного Центра «Фундаментальные основы медицинских и биомедицинских технологий», профессора кафедры «Медицинская физика» Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, доктора физико-

математических наук по специальности 03.01.02 — «Биофизика» **Ольги Леонардовны Власовой**. Отзыв положительный, без критических замечаний.

2. Заведующего Лабораторией сравнительной физиологии мозжечка Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, доктора биологических наук по специальности 03.03.01 — «Физиология» **Сергея Михайловича Антонова**. Отзыв положительный, без критических замечаний.

3. Научного сотрудника Секции Молекулярного Транспорта Национального Института Детского Здоровоохранения и Развития Человека США, кандидата биологических наук по специальности 03.00.25 — «Гистология, цитология, клеточная биология» **Филиппа Алексеевича Гурьева**. Отзыв положительный, имеются вопросы.

«...Насколько правомерным является заключение автора о росте числа нистатиновых асимметричных каналов при введении флавоноидов? Альтернативной моделью представляется образование нового типа пор, или иного рода мембранных ионопроводящих дефектов, при специфическом взаимодействии нистатина, флавоноидов и/или липидов в исследуемых бислоях. Проводилось ли в этой связи исследование дозо-зависимости флавоноидов на интенсивность нистатинового каналообразования? Насколько выводы автора о гомогенизирующем эффекте флавоноидов на фазо-разделенные мембранные смеси и увеличение каналообразования согласуется с опубликованными данными о специфичности формирования нистатиновых каналов на периферии липидных рафтов, Lo – доменов (например, Helrich et al., Biophys. J. 91 (3), 2006, 1116-1127)? Было ли проведено исследование усиления тенденции к образованию гексагональной липидной фазы (или изменения внутренней кривизны отдельных монослоев мембран) при помощи каких-либо других липид-чувствительных молекул, например, грамицидина А?»

4. Ведущего научного сотрудника Лаборатории структурной и функциональной протеомики ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 — «Биохимия» **Владимира Валерьевича Егорова**. Отзыв положительный, без критических замечаний.

В дискуссии принимали участие:

1. Доктор биологических наук, **С.Ю. Хайтлина**, член Совета
2. Доктор биологических наук, **С.О. Скарлато**, зав. лаб., зам. Дир. ИНЦ РАН, куратор дис. совета
3. Академик, **Н.Н. Никольский**, член Совета
4. Доктор биологических наук **Е.А. Морачевская**, внс ИНЦ РАН

**Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается** высокой квалификацией выбранных специалистов в области молекулярной биологии и изучения механизмов работы ионных каналов для более объективной оценки полученных результатов, представленных в диссертации.

**Диссертационный совет отмечает**, что на основании выполненных соискателем исследований:

**разработана** новая научная концепция влияния флавоноидов на каналообразующую активность нистатина, обогащающая существующие представления о природе трансмембранных пор, образованных полиеновыми антибиотиками;

**предложена** оригинальная научная гипотеза действия флавоноидов на нистатиновые каналы посредством модификации профиля латерального давления в бислое;

**доказана** связь структурно-функциональных особенностей флавоноидов и их способности модифицировать профиль латерального давления в бислое;

**введены** новые представления о вкладе механических свойств липидного матрикса в регуляцию активности полиен-липидных пор.

**Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:**

**доказано**, что разупорядочивающее действие флавоноидов на бислой определяется гидрофобностью молекул;

**применительно к проблематике диссертации результативно использован** комплекс современных молекулярно-биологических методов, включающих измерение проводимости плоских липидных бислоёв, модифицированных нистатином и флавоноидами, оценку характера фазового разделения в гигантских однослойных липосомах различного состава под действием нистатина и флавоноидов, дифференциальную сканирующую микрокалориметрию, исследование утечки водорастворимого флуоресцентного маркера кальцеина из больших однослойных липосом, а также адекватные методы статистической обработки результатов (с использованием компьютерной программы Clampfit, OriginPro 9, Calisto);

**изложены** новые экспериментальные факты, описывающие чувствительность липидного устья асимметричной полиеновой поры к веществам, увеличивающим кривизну монослоя;

**раскрыты** механизмы мембранной активности полиеновых антибиотиков;

**изучено** влияние дипольного потенциала и фазовой сегрегации в бислое на каналобразующую активность нистатина;

**проведена** оценка возможности синергетического действия флоретина и нистатина на проницаемость модельных мембран.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:**

**разработаны и внедрены в практику научного исследования** способы описания характера латеральной гетерогенности гигантских однослойных липосом под действием различных амфифильных веществ;

**определены** перспективы возможного практического применения результатов исследования при разработке липосомальных форм полиеновых антибиотиков, включающих низкомолекулярные амфифилы;

**представлены** новые данные, свидетельствующие о необходимости модификации методик, использующих нистатин в качестве маркера упорядоченных доменов в мембране, в силу того, что антибиотик сам способствует образованию упорядоченных доменов.

### **Оценка достоверности результатов исследования выявила:**

**результаты**, представленные в диссертации, получены на сертифицированном оборудовании, выбор использованных методов обоснован спецификой работы и поставленными в работе задачами, достоверность экспериментальных результатов оценена с помощью адекватных методов статистической обработки данных;

**теория** о индукции мембранной проводимости односторонней добавкой нистатина при изменении эластических свойств противоположного липидного монослоя построена на известных и проверенных литературных фактах, а также данных о регуляции каналобразующей активности нистатина путём введения в мембраноомывающий раствор амфифильных веществ, модулирующих профиль латерального давления бислоя, и согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации;

**идея базируется** на анализе современных литературных данных, а также на обобщении и анализе собственного экспериментального материала;

**использовано** сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по рассматриваемой тематике;

**установлено**, что авторские результаты согласуются с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике, в тех случаях, когда такое сравнение было обоснованным;



**использованы** современные экспериментальные подходы (измерение проводимости плоских липидных бислоев, модифицированных нистатином и флавоноидами, оценку характера фазового разделения в гигантских однослойных липосомах различного состава под действием нистатина и флавоноидов, дифференциальную сканирующую микрокалориметрию, исследование утечки водорастворимого флуоресцентного маркера кальцеина из больших однослойных липосом, а также методы статистической обработки данных) и адекватные методы статистической обработки результатов (с использованием компьютерных программ OriginPro 9, MatLab 2015, Simulink, MathCad).

**Личный вклад соискателя состоит в:**

непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов, получении, обработке, анализе и интерпретации экспериментальных данных, полученных с помощью современных молекулярно-биологических методов. Автор принимал непосредственное участие в апробации результатов исследований на российских и международных научных конференциях, в подготовке и написании статей и тезисов по теме диссертации.

Диссертация посвящена изучению механизмов влияния флавоноидов на каналобразующую активность нистатина и является оригинальным и законченным (в рамках поставленных задач) научно-квалификационным исследованием в области молекулярной биологии, полностью отвечающим требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года) по специальности 03.01.03 — «Молекулярная биология».

На заседании 25 декабря 2015 г. Диссертационный совет принял решение присудить **ЧУЛКОВУ Евгению Георгиевичу** ученую степень кандидата биологических наук по специальности «Молекулярная биология» (03.01.03).

При проведении тайного голосования Диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 7 по специальности рассматриваемой диссертации, участвующих в заседании, из 24 человек, входящих в состав Совета, – ПРОГОЛОСОВАЛИ: ЗА 19, ПРОТИВ НЕТ, недействительных бюллетеней НЕТ.

Председатель

Диссертационного совета Д 002.230.01

Доктор биологических наук, профессор



Юдин А.Л.

Учёный секретарь

Диссертационного совета Д 002.230.01

Кандидат биологических наук



Каминская Е.В.

«28» декабря 2015