

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук **Холиной Екатерины Георгиевны**

«Молекулярные механизмы взаимодействия катионных антимикробных соединений с мембранными структурами бактерий и вирусов»

по специальности 03.01.02 – биофизика

Актуальность диссертационной работы. Диссертационная работа Е. Г. Холиной выполнена в целях исследования молекулярных механизмов процессов взаимодействия биоцидов различной структуры и фотосенсибилизаторов с бактериями и вирусами, имеющими важное клиническое значение при инфекционном заражении. Основа работы – молекулярное моделирование первичных актов связывания данных агентов с функциональными группами липополисахаридной и плазматической мембран грамотрицательных бактерий, и оболочки вирусов. Основное внимание уделено широко применяемым в практических задачах клинической медицины антисептикам – хлоргексидину и мирамистину, и фотосенсибилизатору – фталоцианину цинка.

Структурная организация оболочки бактерий, состоящей из липополисахаридной и плазматической мембраны, крайне сложна своей гетерогенностью и лабильностью состава. Наличие двух барьеров на пути переноса веществ в клетку (липополисахаридной и плазматической мембран с периплазматическим пространством между ними) накладывает также серьезные ограничения для построения обобщенной модели диффузии и взаимодействия на молекулярном уровне с клеткой.

Актуальность работы Е.Г. Холиной обусловлена как выбором бактерицидных агентов, так и мишеней патогенов человека, на которые направлено первичное действие антисептиков. В качестве первичных молекулярных мишеней рассматриваются модельные липополисахаридные и

плазматические мембраны грамотрицательных бактерий и структурные компоненты оболочки коронавирусов.

Общая оценка структуры и содержания работы. Положительное впечатление оставляет изложение материала по классической схеме, с представлением ссылки на работу, материалы которой служили основой представленных результатов. Интерпретация и обоснование выводов корректны. Работа написана четко, логично, литературный обзор включает современные источники.

Во введении автор обосновывает необходимость выполнения данного исследования, его научную новизну и значимость, формулирует цель работы, задачи работы и положения, выносимые на защиту.

Первая глава посвящена обзору литературы. Автор приводит необходимые для понимания выбора объектов моделирования данные о строении оболочек бактерий и вирусов. Довольно подробно описывается структура липополисахаридов, их функциональное значение, распространенные варианты модификации их структуры и современные представления о трехмерных структурах ферментов, осуществляющих эти модификации. В разделе 1.1.2. систематизированы знания о разнообразии липидного состава плазматической мембраны среди различных видов бактерий, особая роль уделяется описанию роли кардиолипина в составе плазматической мембраны. Помимо теоретических сведений о структуре компонентов бактериальных клеточных стенок, приводится подробный обзор существующих молекулярных моделей и описывается прогресс, произошедший в данной области в течение последнего десятилетия. В разделе 1.2. описывается строение компонентов оболочек коронавирусов, особое внимание уделяется S-белкам, приводится иллюстративный материал, позволяющий оценить пространственное расположение доменов спайковых белков. В разделе 1.3 излагаются современные представления о наиболее популярных группах антисептиков, бигуанидах и четвертичных аммониевых соединениях, и анализируются известные экспериментальные факты об их

влиянии на метаболизм и морфологию бактериальных клеток, в том числе установленные в работах с участием Холиной Е.Г. Обзор литературы завершается рассмотрением основных принципов фотодинамической терапии, основных групп фотосенсибилизаторов и механизмов фотоповреждения.

Вторая глава содержит описание методов, использованных для решения поставленных задач. В большей части работы Холина Е.Г. использовала комплекс методов компьютерного моделирования. Помимо теоретических методов, в работе был применен экспериментальный метод оценки дзета потенциала, позволяющий валидировать результаты молекулярного моделирования по связыванию катионных антисептиков с внешними липополисахаридными мембранами. С помощью крупнозернистого моделирования Холина Е.Г. успешно решает задачу по исследованию взаимодействий катионных антисептиков и фотосенсибилизаторов с мембранными компонентами бактериальной клеточной стенки. Применение метода броуновской динамики позволило оценить сайты связывания фотосенсибилизаторов с S-белками коронавируса. В главе рассматривается как теоретическая база задействованных методов, так и конкретные методики их реализации, включая описание создания молекулярных моделей.

В третьей главе представлены оригинальные результаты диссертационной работы. Молекулярное моделирование проведено в микросекундном диапазоне, что описывает первичные акты взаимодействия бактерицидных агентов с биологическими объектами. Особое значение отводится электростатическим взаимодействиям, которые, как показано в работе, играют определяющую роль в реакции положительно заряженных биоцидов и фотосенсибилизаторов с отрицательно заряженными функциональными группами липополисахаридов клеточной оболочки бактерий и спайковых белков вирусов.

К научно значимым достижениям работы следует отнести установленный в моделях факт формирования агрегатов в поверхностной

зоне ЛПС, ограничения в диффузии заряженных молекул биоцидов в коровую часть. Автор уделит основное внимание первичным актам взаимодействия - адсорбции, реакциям катионных антимикробных соединений с функциональными группами на поверхности мембран, физическому состоянию мембран и поверхностному заряду. Установлена нейтрализация Z-потенциала катионными антисептиками за счет электростатического взаимодействия с отрицательно заряженными функциональными группами наружной мембраны бактерий.

В качестве наиболее интересных результатов можно рассматривать установленный факт, согласно которому катионные антисептики не проникают внутрь коровой части мембран, а происходит формирование агрегатов на поверхности мембран. Модели ЛПС рассматривались на комбинации шероховатых и гладких мембран ЛПС с различным соотношением, содержащие антигенные цепи. Автором выявлена защитная роль антигенных цепей липополисахаридов на пути переноса биоцидов внутрь клетки.

Автор обосновано предполагает, что заряженные антисептики могут диффундировать через пориновые каналы с последующим взаимодействием с плазматической мембраной. В качестве модели плазматической мембраны как мишени действия антисептиков рассматривался бислой из POPE:POPG без и с добавлением кардиолипина. Показано, что в течении микросекунд антисептики не только сорбировались на мембране, но и специфическим встраивались в мембраны гидрофобной частью. При этом положительно заряженные группы располагались на поверхности с электростатическим взаимодействием с отрицательно заряженными группами фосфатов фосфолипидов. Важный факт заключается в нарушении физического состояния матрикса липидного бислоя в присутствии катионных антисептиков, что может впоследствии приводить к разобщению энергетических процессов генерации мембранного потенциала, осморегуляции и транспорта. Также на модельной плазматической мембране,

модифицированной кардиолипином, показано, что в присутствии октенидина происходит вытягивание из объема бислоя части липидов на поверхность мембраны.

Важно отметить, что на поверхности спайковых белков выявлены области отрицательного потенциала, ответственные за первичное связывание фотосенсибилизатора. Показана определяющая роль электростатических взаимодействий и для фотосенсибилизатора фталоцианина цинка. Также установлена возможность формирования индуцированного порообразования и самопроизвольного транспорта фотосенсибилизатора через липополисахаридные мембраны бактерий.

Следует также отметить большой объем и широкую направленность проведенных исследований, подкрепленных участием в международных конференциях и публикациями в ведущих научных журналах. Необходимо также подчеркнуть фундаментальность представленных к работе исследований, сочетающих экспериментальный материал с современными моделями методами молекулярной и броуновской динамики.

Степень обоснованности и достоверности научных результатов, выводов и заключений. Считаю, что цель и задачи, сформулированные в работе, достигнуты в ходе ее выполнения, а положения, выносимые на защиту, обоснованы, при этом новизна и достоверность полученных результатов не вызывают сомнений. Это подкрепляется списком научных статей с участием диссертанта, состоящим из 4 работ в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, и одной работы, входящей в список ВАК.

Замечания по диссертационной работе. Принципиальных замечаний по постановке задач и обсуждению результатов нет. Интерпретация данных корректна и в целом согласуется с приведенным в работе литературным материалом. Теоретический и экспериментальный материал базируется на современных научных исследованиях, о чем свидетельствует цитируемая

литература. Однако возник ряд вопросов по результатам, представленным в данной диссертации:

1. Каковы физико-химические основы так называемого «вырывания» липидов из бислоя?
2. Подразумевает ли рассмотрение в модели с силовым полем участие во взаимодействии антисептиков с клеткой мембранного потенциала бактерий?
3. Можно ли аппроксимировать полученные в микросекундном диапазоне данные на эффекты антисептиков при клинических концентрациях этих веществ?
4. В работе акцентировано внимание только на заряженных антисептиках. Рассматривались ли эффекты на мембраны при взаимодействии с антисептиками нейтральной природы?
5. Какие доминирующие элементы резистентности клетки от данного класса антисептиков?

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.02 – «Биофизика» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертация оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Холина Екатерина Георгиевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика».

Официальный оппонент:

Исмаилов Анвар Джураевич

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и биохимии микробов, кафедры микробиологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

«__» _____ 2021 г.

Контактные данные:

Тел.: +7(916) _____. Email: an_____@_____.ru.

Специальности, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.01.02 – биофизика, 03.02.03 – микробиология.

Адрес места работы: 119991, Россия, Москва, Ленинские горы 1, стр. 12.