

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Конова Константина Борисовича на тему: «Исследование методами ЭПР воздействия криопротекторов сахарозы, трегалозы, глицерина и сорбита на структуру и динамику модельной липидной мембраны», представленной на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.11 – «физика магнитных явлений».

Диссертационная работа К.Б. Конова посвящена исследованию взаимодействия криопротекторов различной структуры с липидными мембранами. В настоящее время применение низких температур, в том числе ниже температуры замерзания воды, является одним из основных методов хранения биологических объектов: клеток крови (эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов и др.), белков, ферментов, генетического материала человека, животных и растений. Однако, замораживание при его неправильном применении может наоборот разрушать биологические структуры. Для сохранения биологической активности этих объектов при воздействии низких температур используются различные криопротекторы и ведется поиск новых соединений, обладающих более эффективными защитными свойствами. Одним из важных компонентов, на которые может оказывать поражающий эффект замораживание, являются липидные мембраны, поскольку их разрушение приводит не только к потере функционирования компонентов мембраны, но и гибели клеток.

Несмотря на значительное число работ в этой области, механизмы защитного действия криопротекторов даже на липидные компоненты мембраны на молекулярном уровне до конца не ясны. Очевидно, что для эффективного поиска и применения криопротекторов необходимо понимать (1) как они включаются в мембранные структуры и (2) какие изменения структуры и динамики мембраны они вызывают. Поэтому диссертационная работа К.Б. Конова является весьма актуальной и практически значимой.

Новизна работы состоит в использовании новых подходов, адекватных для решения указанных задач. А именно, для решения первой задачи – определения профиля проникновения глицерина и дисахаридов в мембраны ДПФХ использован метод модуляции огибающей ЭСЭ, а для исследования влияния криопротекторов обоих типов на динамику липидов мембраны ДПФХ – кинетика затухания ЭСЭ и стационарная ЭПР спектроскопия.

В литературном обзоре рассмотрен широкий круг работ по проблеме криопротекции - использование ее в природе живыми организмами, исследования эффектов

замораживания и криопротекции различными физическими методами. Обзор демонстрирует достаточно глубокое знание проблемы и широкую эрудицию автора.

Однако, к сожалению, здесь попадаются неправильные утверждения, например: на с. 25: «в жидкокристаллической фазе ацильные цепи вытянуты перпендикулярно плоскости бислоя» Известно, что степени порядка даже для зонда 5-PC равны около 0.6, а для других зондов n-PC уменьшаются при удалении NO группы от межфазной границы.).

Экспериментальные результаты изложены в гл. 3-6

В главе 3 исследуется профиль проникновения глицерина- криопротектора, проникающего через мембрану. Здесь автором получен важный методический и научный результат – установлена зависимость пространственного распределения фосфолипидных спиновых меток от условий замораживания. Пространственное распределение определялось путем измерения модуляции огибающей ЭСЭ. Модуляция возникает за счет сверхтонкого взаимодействия электронного спина с ядрами дейтерия в дейтерированном глицерине. Показано, что быстрое замораживание из жк фазы приводит к явно артефактному расположению ацильных цепей параллельно межфазной границе, в то время как при медленном замораживании из субгелевой фазы Рβ по-видимому в значительной степени сохраняется транс конформация и ориентация этих цепей перпендикулярно мембране. Это важный результат для дальнейшего применения спиновых меток в низкотемпературных исследованиях, хотя трудно доказать, что при втором методе полностью сохраняется нативная конформация, присущая геле-фазе.

Основным результатом главы 3 является получение профиля проникновения глицерина в мембране ДПФХ. в терминах локальной концентрации в мембране, т.е. в моль/л.

Локальные концентрации глицерина на разной глубине в мембране достигали 4М вблизи межфазной границы и 1.0-1.25 М на уровне зондов 7-PC и 10-PC. Эти значения были получены с помощью калибровочной зависимости амплитуды модуляции от концентрации глицерина в смеси глицерин/вода для радикала Темпол в изотропном растворе.

Трудно себе представить столь громадные концентрации глицерина (1.25М) и воды (см. рис. 3.11) в гидрофобной мембране, однако интерпретация этих цифр и аналогичных результатов в гл. 4 в работе не проводится. По-видимому, вследствие сродства молекул зонда и глицерина глицерин распределен в мембране сильно неравномерно.

В работе показано также, что амплитуда модуляции ЭСЭ для образцов, гидратированных водно-глицериновой смесью, слабо отличается от амплитуды

кроме 16 положения, для которого амплитуда в случае гидратации водой близка к нулю, а в случае гидратации водно-глицериновой смесью существенно выше нуля.

По мнению автора полученные данные согласуются с гипотезой диффузионного прохождения глицерина через липидную мембрану. Однако, не поясняется, как этот вывод следует из приведенных зависимостей, в то время как исследования кинетики встраивания в работе не проводились.

Данные, приведенные в гл. 4, показывают преимущественное накопление молекул дисахаридов у поверхности мембраны. Было установлено, что адсорбция молекул дисахаридов на модельной мембране хорошо описывается в рамках модели Ленгмюра и, таким образом, по мнению автора, косвенно подтверждают гипотезу вытеснения воды. Отметим, что более прямым доказательством было бы обнаружение уменьшения количества поверхностной, а также встроенной в мембрану воды в присутствии дисахаридов. С использованием спиновой метки, репортерская группа которой находится практически на межфазной границе, были определены концентрации адсорбированных молекул дисахаридов.

Важным результатом является также обнаружение достаточно высоких локальных концентраций дисахаридов внутри липидной мембраны - криопротекторов, которые, как считалось ранее, не проникают через липидную мембрану. Однако, как и для глицерина, по-видимому требуется интерпретация этих локальных концентраций дисахаридов в мембране в рамках другой, более реалистической модели.

В гл. 5 и 6 исследовано влияние глицерина и дисахаридов на вращательную динамику липидов в мембране. Этой цели служило сочетание двух подходов: из стационарных спектров ЭПР определялись среднеквадратичные амплитуды либраций, которые использовались для определения времен корреляции этих движений из кинетики затухания ЭСЭ.

На рисунке 5.4 видно, что параметр $2 A_{zz}$ для липидов, спин-меченых в 5 положении, значительно больше, чем для липидов, спин-меченых в 16 положении. Автор объясняет это различие только разной полярностью окружения спиновой метки, локализованной в различных частях бислоя. В положении 5, вблизи от поверхности бислоя присутствует значительное количество молекул воды, которые повышают полярность окружения спиновой метки, и соответственно значение компоненты A_{zz} тензора СТВ метки.

Однако это объяснение по крайней мере недостаточное, поскольку оно не учитывает хорошо известное существенное различие во вращательной диффузии и степени упорядоченности меток 5-PC и 16-PC, расположенных на разной глубине в бислое. Это

различие в динамических параметрах, проявляется в существенном различии формы спектров ЭПР меток 5-РС и 16-РС, что особенно заметно при T около 0 С. (см. рис. 5.4)

Параметр A_{zz} для липида, спин-меченого в 16 положении и гидратированного в водно-глицериновом растворе, принимает заметно бóльшие значения, чем для того же липида, гидратированного в воде. Автор объясняет это различие повышением полярности в окружении спиновой метки за счет проникновения глицерина в мембраны. Это объяснение нуждается в уточнении. В растворе полярность чисто водного окружения несколько больше, чем полярность смеси глицерин/вода. Однако в мембране, гидратированной смесью глицерин/вода, как показал эксперимент, количество глицерина, включающегося в мембрану на уровне 16-РС, заметно больше, чем количество молекул воды в мембране, гидратированной водой; поэтому суммарный эффект приводит к увеличению параметра A_{zz} по сравнению с мембраной, гидратированной водой.

Резюмируя работу в целом, можно сказать, что научная новизна и практическая значимость результатов диссертации не вызывает сомнений. Сделанные в отзыве замечания относятся в основном к интерпретации ряда экспериментов и не снижают ценности полученных экспериментальных результатов. В целом диссертационная работа К. Б. Конова выполнена на высоком научном уровне и вносит существенный вклад в понимание молекулярных механизмов действия криопротекторов на липидные мембраны.

Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации.

Заключение. Работа «Исследование методами ЭПР воздействия криопротекторов сахарозы, трегалозы, глицерина и сорбита на структуру и динамику модельной липидной мембраны является законченной научно-квалификационной работой и по своему содержанию, научным и практическим результатам отвечает всем требованиям ВАК, включая п. 9 "Положения о порядке присуждения ученых степеней" (Постановление Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 в редакции от 21.04.2016 года), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени физико-математических наук, а ее автор – Конов Константин Борисович - заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.11 – физика магнитных явлений.

Дата

Доктор химических наук, профессор,

Главный научный сотрудник лаборатории

сенсорика Центра фотохимии РАН
ФГУ ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН
Лившиц Всеволод Аронович
Адрес: г. Москва, ул. Новаторов, д. 7а, корп. 1.
e-mail: vlivshi@mail.ru, тел. : 8 (917) 540 8992

ли ш

Подпись Лившица В.А. удостоверяю
Ученый секретарь ФНИЦ «Кристаллография и фотоника РАН»

К. ф.-м.н. Ю. А. Дьякова

подпись, печать



*Учен. секретарь ФНИЦ
ФГУ ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН
Дьякова Ю.А.*