

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу Аливердиевой Динары Алиевны «Транспортеры дикарбоксилатов и модельные пороформеры в биологических мембранах», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия

Диссертационная работа написана по традиционному плану, содержит разделы: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список цитированной литературы. Текст изложен на 324 страницах, содержит 78 рисунков и 10 таблиц, список цитированной литературы включает 510 источников, 34 из которых на русском языке. Следует сразу отметить, что диссертация написана очень хорошим языком и легко читается. Текст хорошо структурирован и иллюстрирован, видна увлеченность автора своим исследованием и желание донести до читателя логические последовательности, лежащие в основе работы.

Исследование Аливердиевой Динары Алиевны посвящено разностороннему и глубокому анализу процесса порообразования индукторами ионной проницаемости наряду со сравнительным изучением свойств и кинетических параметров трансмембранного транспорта. Актуальность темы не вызывает сомнения, поскольку к началу исследований механизм действия пороформеров на биологические мембраны был далек от выяснения, в том числе и в медицинском аспекте. Актуальность работы убедительно обоснована автором.

В формулировке цели работы фразы: "...изучение особенностей порообразования...", а также "...сравнительное изучение свойств..." несколько снижают фундаментальную значимость проделанной работы. Сказанное можно расценивать как замечание автору.

Обзор литературы не имеет собственного названия, тем не менее логично и обстоятельно описывает представленные в литературе сведения, необходимые для понимания работы. В обзор литературы включены такие главы как "Медицинское значение пороформеров..." важные, в частности, для понимания актуальности темы исследования, даны представления о традиционных прямых и непрямых методах исследования трансмембранного транспорта в органеллах и клетках. Важно, что в обзоре литературы есть раздел, посвященный модельным объектам исследования, выбранным автором. В этой части обосновывается этот выбор.

Очень важно, что Динара Алиевна уделяет в обзоре литературы особое внимание качеству препарата изучаемых митохондрий, параметру, на который многие современные исследователи часто обращают недостаточно внимания, отчего и получаемые ими результаты зачастую трудно или неоднозначно интерпретируемы. Сведения, приведенные в данном разделе, задают высокую планку исследованиям.

В обзоре подробно описываются транспортеры митохондрий млекопитающих и пекарских дрожжей, включая их роль в метаболизме клетки, присутствует раздел, посвященный сопрягающим мембранам митохондрий, а также структуре транспортеров дикарбоксилатов, механизму транспорта, теоретическое обоснование некоторых использованных в работе приемов. Обзор литературы представляет собой объемный, очень хорошо иллюстрированный раздел работы, в котором представлены как статьи, лежащие в истоках проблематики, так и современные исследования.

Раздел материалы и методы убеждает в том, что работа выполнена на самом высоком и современном методическом уровне. Автор успешно сочетал как биохимические, так и молекулярно-генетические методы. В разделе описаны методы выделения митохондрий печени крысы, митохондрий дрожжей, получение субмитохондриальных частиц (СМЧ) и митохондрий с поврежденной внешней мембраной, выделение митохондрий *S. cerevisiae*, измерение сукцинатдегидрогеназной активности СМЧ, получение митохондрий с поврежденной внешней мембраной, определение скорости поглощения кислорода, молекулярно-генетические методы, включая секвенирование, рестриктазный анализ, пульс электрофорез и др. Из описания раздела "Молекулярно-генетические методы" не ясно, сам ли автор проводил секвенирование. Раздел написан излишне кратко. Сожаление вызывает излишне краткое описание экспериментальной процедуры в разделе 2.4.2. "Выделение митохондрий *S. cerevisiae*", одной из ключевых экспериментальных процедур работы. Следующий за этим разделом раздел 2.4.3. "Выделение митохондрий печени крысы" в значительной степени лишен этого недостатка. Тем не менее, раздел 2.4.6., посвященный описанию процедуры получения митохондрий с поврежденной внешней мембраной, снова описан весьма кратко.

Следует отметить, что ссылки в отмеченных разделах на соответствующие публикации присутствуют и, тем не менее, желательно было бы видеть в диссертации более подробное описание указанных методов. Тем более, что теоретическая часть работы занимает 130 страниц, что составляет половину от экспериментальной части, если исключить раздел "Список литературы", что, безусловно, дает автору возможность расширить материал экспериментальной части. Особенно важно высказанное замечание

в свете того, что сам автор, как было сказано ранее, в обзоре литературы уделяет большое внимание качеству исследуемых препаратов митохондрий и в этом ему трудно возразить.

По большей части методы описаны достаточно подробно. Высокий методический уровень не оставляет сомнений в достоверности полученных результатов.

Не совсем ясно, зачем автор проводил столь объемную процедуру идентификации дрожжей *S.cerevisiae*. Желательно прояснить этот вопрос.

Суммируя впечатление о разделе "Результаты и обсуждение" можно отметить, что этот раздел написан внятно и четко, полученные экспериментальные данные хорошо представлены в виде рисунков и таблиц. Начинается этот раздел с главы, название которой более подходит для обзора литературы "Митохондрии печени крысы – биосенсоры трансмембранного тока", однако далее автор переходит на язык экспериментального изложения. Большое внимание автор уделяет тщательной подготовке и чистоте проведенных экспериментов. Примером может послужить оценка гомогенности и стабильности митопластов в опытах с индукторами ионной проницаемости; отдельные опыты, доказывающие непроницаемость плазматической мембраны дрожжей для амфифильных эффекторов. В результате детально спланированного эксперимента и подбора специальных условий для измерения транспорта дикарбоксилатов в клетках дрожжей, было показано, что в плазмалемме *S. cerevisiae* существует система транспорта дикарбоксилатов. Для большей убедительности результатов, была предложена система доказательств, основанная на проверке предложенного подхода для измерения хорошо известных в литературе кинетических параметров транспортера пирувата. Результаты были очень близки результатам, полученным прямыми радиоизотопными методами. Это послужило основанием заявить об эквивалентности прямого и применяемого автором непрямого способа изучения свойств нативных переносчиков.

Задачи, поставленные автором для достижения цели, о формулировке которой я уже говорила (см. выше), в целом выполнены в полном объеме. Позволю себе предложить свое понимание логики изложения материала и формулирования выводов.

Результатами работы явились разработанные на препаратах митохондрий печени крысы и клетках дрожжей новые экспериментальные подходы для определения параметров переносчиков и измерения трансмембранного катионного транспорта, что нашло отражение в выводах 1 и 4.

Получены количественные соотношения между активацией дыхания митохондрий печени крысы и катионным током, индуцированным во внутренней мембране и изучена

скорость-лимитирующая стадия порообразования. Следует отметить, что фраза из формулировки задачи "изучить скорость-лимитирующую стадию...." представляется мне излишне расплывчатой и неконкретной, однако на этой стадии работы были получены важные результаты, что нашло отражение в выводах 2 и 3.

Изучены свойства, в том числе кинетические характеристики переносчика дикарбоксилатов плазмалеммы дрожжей. Результаты этой части исследований были использованы автором при формулировании выводов 5 и 6, что хотя и не противоречит логике исследования, однако несколько нечетко сформулировано в выводах.

Проведено зондирование принципиально важных областей транспортера дикарбоксилатов плазматической мембраны дрожжей и митохондрий печени крысы. Результаты легли в основу вывода 7.

Таким образом, можно сказать, что выводы логически условно «распадаются» на 2 части: выводы 1,2 и 3 – это выводы по тем разделам работы, в которых исследованы пороформеры, в свою очередь, выводы 5, 6 и 7 сделаны по экспериментам, в которых исследованы транспортеры дикарбоксилатов. Выводы №4 носит общий характер.

Если говорить о некотором нарушении логики, с которого я начала анализ полученных результатов, выводов и положений, выносимых на защиту диссертантом, то хотелось бы получить ответ на вопрос и уточнить, как соотносятся задача 2 и положение 5.

Следует отметить, что выводы, сделанные Динарой Алиевной, являются именно выводами из работы, а не переписыванием полученных результатов, что производит весьма хорошее впечатление.

Высказанные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают суть полученных результатов и можно рассматривать как пожелание автору для дальнейшей работы при развитии направления исследований.

Научная новизна исследований не вызывает сомнений и заключается в первую очередь в том, что получены новые данные, характеризующие первые этапы порообразования для мелиттина, мастопарана и аламетицина в митохондриях печени крысы, генерирующих $\Delta\psi$. Проводимость, индуцированная во внутренней мембране митохондрий печени крысы, и степень активации окисления ими сукцината связаны линейной зависимостью. Впервые показано, что с помощью такого подхода можно измерить стационарную калиевую проводимость, индуцированную в митохондриях низкоолигомерной формой аламетицина на фоне проводимости его высокоолигомерных форм в присутствии $\Delta\psi$ при низких пептид/липидных соотношениях и оценить диаметр поры. Определено соотношение степеней активации дыхания аламетицином,

мелиттином или мастопараном в монокалийевой и монокальциевой средах при одинаковом значении $\Delta\psi$. Сделано предположение о том, что в присутствии аламетицина и тетраацетилмелиттина проводимость лимитируется реакцией образования поры, а в присутствии мелиттина или мастопарана – стадией, предшествующей порообразованию. Впервые показано, что в диапазоне от pH 5,5 до pH 7,5, транспорт сукцината через плазмалемму *S. cerevisiae* опосредован О-пальмитоил-L-малат чувствительным транспортером с уникальными и нетипичными для плазмалеммы грибов свойствами.

Практическая значимость заключается, в разработанных или усовершенствованных методах использования амфифильных эффекторов и методологии измерения нативных транспортеров в интактных системах.

Работа хорошо представлена на международных и отечественных конференциях, по теме диссертации опубликована 21 статья в журналах, входящих в Web of Science, и рекомендованных ВАК.

Аннотация написана логично, хорошим языком и, в целом, достаточно полно представляет содержание диссертации. Список сокращений в аннотации приведен на странице 7, непосредственно перед содержательной частью работы, а следовало его привести ранее, например на странице 3.

Завершая отзыв, следует сказать, что диссертационная работа «Транспортеры дикарбоксилатов и модельные пороформеры в биологических мембранах» представляет собой законченное оригинальное экспериментальное исследование, которое по актуальности, научной и практической значимости соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям, изложенным в пп. 9-10 Положении о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в действующей редакции) «О порядке присуждения ученых степеней», а ее автор, Аливердиева Динара Алиевна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия.

Официальный оппонент

доктор биологических наук, профессор

ведущий научный сотрудник кафедры молекулярной биологии

Биологического факультета

Федеральное государственное бюджетное

высшее образовательное учреждение
высшего образования

«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,

Калебина Татьяна Сергеевна _____

«10» 03 2023 г.

Шифр и наименование специальности, по которой была защищена диссертация –
03.00.03 – «Молекулярная биология»

Подпись Калебиной Татьяны Сергеевны заверяю

Заместитель декана

биологического факультета МГУ

Михайлович



Рубцов Александр

Федеральное государственное бюджетное высшее образовательное учреждение
высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.
Ломоносова», Биологический факультет, адрес: 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы,
д. 1, стр. 12, телефон: +7(495) 939-50-75, e-mail: kalebina@gmail.com