

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию 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»

Актуальность темы. Диссертация Аливердиевой Д.А. посвящена исследованию транспортеров дикарбоксилатов митохондрий печени крыс и плазмалеммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, а также изучению механизмов воздействия пороформирующих антимикробных пептидов (аламетицина, меллитина мастопорана и др.) на митохондрии печени крыс. Актуальность избранной темы связана с ключевой ролью дикарбоксилатов в метаболизме эукариотической клетки. Окисление C₄-дикарбоксилатов необходимо для окислительного фосфорилирования, основного поставщика АТФ в клетке. Особую роль играет специфический транспорт этих метаболитов через биологические мембраны, который необходим для обеспечения взаимодействия между двумя пулами метаболитов, митохондриальным и цитозольным. В последнее время исследование транспортеров дикарбоксилатов в таких модельных объектах, как дрожжи *S. cerevisiae*, приобрело новый импульс, в связи с проблемой промышленного биосинтеза органических кислот (сукцината, малата) с участием микроорганизмов. Кроме того, принимая во внимание ключевую роль в контроле энергетического обмена, в литературе активно обсуждается роль транспортеров моно-, ди- и трикарбоксилатов в регуляции различных метаболических заболеваний. При этом особое внимание уделяется Na⁺-зависимым транспортерам, нарушение функций которых вызывает эпилептическую энцефалопатию и различные виды онкологических заболеваний. Однако, несмотря на большое количество экспериментальных данных, многие аспекты функционирования транспортеров дикарбоксилатов исследованы поверхностно, структура активного центра и трансмембранного

канала не изучена. Также отсутствовали достоверные данные о транспорте дикарбоксилатов через плазматическую мембрану дрожжей *S. cerevisiae*. Актуальность изучения действия пороформеров на митохондрии и клетки связана с перспективами медицинского применения этих соединений, как потенциальных лекарств, включая их использование в качестве антимикробных и противоопухолевых препаратов. В связи с этим тема диссертационной работы Д.А. Аливердиевой является, несомненно, актуальной, как для фундаментальной науки, так и в практическом отношении.

Новизна полученных результатов. Аливердиевой Д.А. впервые экспериментально обосновано использование суспензии высокосопряженных митохондрий в оксиметрической ячейке в качестве бесконтактного биосенсора трансмембранного катионного тока, индуцированного пептидами-пороформерами. С помощью такого подхода удалось измерить проводимость, индуцированную в митохондриях аламетицином и оценить диаметр поры. Впервые показано существование О-пальмитоил – L – малат чувствительного переносчика плазмалеммы *S. cerevisiae*. Показано, что транспорт сукцината через плазмалемму *S. cerevisiae* опосредован транспортером с нетипичными для плазмалеммы грибов свойствами. Для двух дикарбоксилатных транспортеров (митохондрий и плазмалеммы) с разным механизмом действия изучена структура их каналов вблизи точки связывания субстрата. С этой целью впервые был применен метод зондирования активного центра транспортера с использованием рядов непроникающих ингибиторов –алкильных и ацильных производных малоната и малата.

Надо особо отметить, что работа Аливердиевой Д.А. ценна в методическом аспекте. Разработаны или усовершенствованы оригинальные подходы изучения нативных транспортеров в сложных эндогенных системах, методы использования амфифильных эффекторов в экспериментах с митохондриями и целыми клетками. Разработанные при изучении

транспортера ДКБ *S. cerevisiae* экспериментальные подходы применимы для изучения малоактивных переносчиков окисляемых субстратов дрожжей..

Структура и содержание диссертации. Диссертационная работа Аливердиевой Д.А. написана по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, описания результатов исследования и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 510 источников. Объем работы 324 страницы, иллюстративный материал состоит из 78 рисунков и 10 таблиц.

Во «Введении» автор кратко описывает состояние проблемы, актуальность темы, цель и задачи работы, характеризует научную новизну, научно-практическую значимость результатов исследования, формулирует положения, выносимые на защиту.

В «Обзоре литературы» автор детально рассматривает сначала особенности структурной организации и механизмы функционирования транспортеров митохондрий млекопитающих и митохондрий *S. cerevisiae*, особое внимание при этом уделяя транспортерам дикарбоксилатов. Затем автор переходит к описанию структуры и механизма мембранотропного действия пороформеров аламетицина, мелиттина и мастопарана. Обзор написан достаточно подробно, охватывает большое количество литературных источников. Надо отметить, что диссертант хорошо знаком с литературой по проблематике диссертационной работы.

В главе «Материалы и методы» исследования автор детально описывает оригинальные методические подходы, классические и современные методы биохимии, микробиологии и молекулярной биологии, метод молекулярного моделирования, используемые в работе для решения поставленных экспериментальных задач. Оригинальный подход заключался в измерения кинетических параметров интактных переносчиков *in situ*, основанный на использовании эндогенных систем окисления субстратов в качестве сопряженных систем измерения транспорта этих соединений. Подробное описание использованных методик гарантирует успешное

воспроизведение поставленных экспериментов. Необходимо отметить, что использованные диссертантом методы соответствовали поставленным задачам и позволили успешно их решить.

В главе «Результаты и обсуждение» изложены результаты проведенных экспериментов и их анализ в свете литературных данных. Описание результатов последовательно в соответствии с логикой проведенного эксперимента, основанной на разработке методологии использования амфифильных эффекторов и измерения нативных транспортеров в интактных системах. В подобранных условиях на основании линейной зависимости проводимости, индуцированной во внутренней мембране митохондрий пептидами-пороформерами и степени активации ими окисления сукцината, обосновано использование митохондрий в оксиметрической ячейке в качестве биосенсора трансмембранного катионного тока, даны его характеристики.

Исследуя транспорт дикарбоксилатов в клетках дрожжей, автору удалось доказать существование нового транспортера в плазмалемме. Большая часть исследований посвящена изучению его свойств. Сравнивая свойства нового транспортера с известными переносчиками дикарбоксилатов, автор делает вывод об уникальности его свойств. Применен ингибиторный анализ структуры канала переносчика дрожжей и проведено сравнение его со структурой канала дикарбоксилатного транспортера митохондрий печени крыс. Применение такого подхода оправдано отсутствием рентгеноструктурных данных по дикарбоксилатным переносчикам и является единственным источником информации о структуре их каналов.

В обсуждении полученных результатов автор подробно обосновывает методические достижения в исследовании свойств пороформеров, в сравнении с литературными данными, описывает перспективы предложенного подхода. Автор приводит экспериментальные доказательства, свидетельствующие о существовании транспортера дикарбоксилатов

плазматической мембраны дрожжей, сравнивает его свойства с переносчиками дикарбоксилатов других видов дрожжей. При обсуждении липофильного профиля канала транспортера дикарбоксилатов дрожжей, автор опирается на существующие общепринятые модели транспортеров плазматической мембраны (калиевого канала бактерии). Обсуждаются особенности структуры активного центра митохондрий печени крыс и возможная модель его функционирования, основанная на литературных данных о структуре аденилатного переносчика. В «Заключении» автор, анализируя предложенные новые методологические подходы и полученные результаты, предлагает пути и перспективы их развития и применения.

Достоверность и апробация полученных результатов не вызывает сомнений, поскольку они базируются на достаточно большом объеме экспериментального материала. Результаты работы доложены на российских и международных конференциях и симпозиумах, по теме диссертационной работы опубликовано 43 работы, из них 23 статьи в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК, в том числе 21 – в журналах, индексируемых в Web of Science, получен 1 патент на изобретение.

Выводы корректны, оригинальны и полностью соответствуют полученным результатам. Автореферат диссертации включает в себя необходимые разделы и полностью соответствует содержанию диссертации.

Личный вклад соискателя в проведенных исследованиях был определяющим, о чем свидетельствуют публикации, в большей части которых диссертант является первым автором.

Научная и практическая значимость. Необходимо отметить, что результаты работы Д.А. Аливердиевой вносят значимый вклад в понимание механизмов функционирования транспортеров дикарбоксилатов и индукции проницаемости пороформирующими пептидами в биологических мембранах. Методический подход, основанный на использовании суспензии высокосопряженных митохондрий в оксиметрической ячейке в качестве

биосенсора трансмембранного катионного тока, можно в перспективе применить для изучения побочных эффектов пороформеров-антибиотиков широко используемых в медицине. Разработаны методы измерения кинетических параметров интактных переносчиков дикарбоксилатов *in situ*. Эти методы могут быть использованы для поиска и изучения малоактивных переносчиков окисляемых субстратов дрожжей. Проведенное зондирование активных центров переносчиков дикарбоксилатов с использованием амфифильных производных субстратов является в настоящее время важнейшим источником информации об их структуре. Полученные в работе результаты будут способствовать развитию новых подходов в биохимических, микробиологических и медико-биологических исследованиях.

Замечания. Отмечая высокий уровень диссертационной работы, следует отметить некоторые замечания, вопросы и пожелания, возникшие при прочтении диссертации.

1) Литературный обзор, который занимает 130 страниц, на мой взгляд, несколько перегружен детальной информацией о структуре и механизмах функционирования транспортеров дикарбоксилатов из самых различных объектов.

2) Хотелось бы уточнить, является ли вывод о механизме транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы дрожжей *S. cerevisiae* – неэлектрогенный унипорт, единственно возможным?

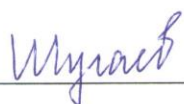
3) Кроме того, было бы интересно узнать, в опытах по изучению дыхательной активности клеток дрожжей, как дифференцировали в составе сукцинатоксидазной сопряженной системы плазмалеммный и митохондриальный переносчики дикарбоксилатов?

4) В качестве пожелания можно отметить, что на базе полученных результатов чрезвычайно перспективным представляется разработка новых *in vitro*-тестов для оценки степени токсичности различных пороформирующих антимикробных соединений, потенциальных лекарств.

Высказанные замечания не носят принципиального характера и не снижают научной ценности результатов и выводов диссертации.

Закключение. Диссертационная работа «Транспортеры дикарбоксилатов и модельные пороформеры в биологических мембранах» является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой. По актуальности темы, методологии, объему и новизне полученных результатов, их научно-практической значимости, диссертационная работа Аливердиевой Д.А. полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» (в последней редакции), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия.

Официальный оппонент. Заведующий лабораторией дыхания растений и механизмов его регуляции Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, доктор биологических наук (специальность 1.5.21 – «Физиология и биохимия растений»)



Шугаев Александр Григорьевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, адрес: 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35, телефон: +7 (499) 678-53-40, e-mail: ag_shugaev@ippras.ru, ag-shugaev@ifr.moscow 09 марта 2023 г.



ПОДПИСЬ
ЗАВЕРЯЮ
ОТД. КАДРОВ