

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

Исследование Аливердиевой Динары Алиевны посвящено разностороннему и глубокому изучению процесса порообразования пептидными индукторами катионной проницаемости наряду со сравнительным изучением свойств и кинетических параметров трансмембранного транспорта. Актуальность работы 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. Диссертационная работа Д.А. Аливердиевой является объемным, значительным и фундаментальным научным исследованием, вносящим существенный вклад в развитие заявленной области исследований.

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 271 странице, содержит 60 рисунков и 9 таблиц, список цитированной литературы включает 465 источников, 22 из которых на русском языке. Диссертация написана очень хорошим языком и легко читается. Текст хорошо иллюстрирован и структурирован, очевидна увлеченность автора своим исследованием и желание донести до читателя логику исследования и последовательности в рассуждениях, лежащие в основе работы.

Цели работы и сформулированные емко и значимо задачи исследования выявляют фундаментальную значимость проделанной работы.

Обзор литературы не имеет собственного названия, тем не менее, в нем автор логично и обстоятельно описывает представленные в литературе сведения, необходимые для понимания работы. В обзор литературы включена главы "Медицинское значение пороформеров...", важная, 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 работы обосновывается этот выбор.

Очень важно, что Динара Алиевна уделяет в обзоре литературы особое внимание качеству препарата изучаемых митохондрий, параметру, на который многие современные исследователи 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 описаны 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 *S. cerevisiae*, получение СМЧ и митохондрий с поврежденной внешней мембраной, измерение сукцинатдегидрогеназной активности СМЧ, определение скорости поглощения кислорода,

молекулярно-генетические методы, включая секвенирование, рестриктазный анализ, пульс электрофорез и др. Положительной стороной раздела является подробное описание экспериментальной процедуры "Выделение митохондрий *S. cerevisiae*", одной из ключевых экспериментальных процедур работы. Следующий за этим разделом раздел, посвященный выделению митохондрий печени крысы, также описан хорошо и подробно. Следует отметить, что в отмеченных разделах представлены ссылки на соответствующие публикации. Сказанное особенно важно в свете того, что сам автор 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.

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. 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, выполнены в полном объеме.

Результатами работы явились разработанные на препаратах митохондрий печени крысы и клетках дрожжей новые экспериментальные подходы для определения параметров переносчиков и измерения трансмембранного катионного транспорта.

Получены количественные соотношения между активацией дыхания митохондрий печени крысы и катионным током, индуцированным во внутренней мембране и изучена скорость-лимитирующая стадия порообразования, на этой стадии работы были получены важные результаты, что нашло отражение в выводах.

Изучены свойства, в том числе кинетические характеристики, переносчика дикарбоксилатов плазмалеммы дрожжей. Результаты этой части исследований также были использованы автором при формулировании выводов.

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

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

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 монокалиевой и монокалиевой 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 рН 5,5 до рН 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 опубликовано 24 статьи в журналах, входящих в список Web of Science, и рекомендованных ВАК. Автором написаны главы и статьи в нескольких книгах зарубежных издательств и получено 2 патента.

Несмотря на общее весьма положительное впечатление от работы есть несколько вопросов, на которых следует остановиться.

1. В различных местах текста автор применяет термины «транспортеры дикарбоксилатов» и «дикарбоксилатные транспортеры», (например, на стр.4 автореферата). Как можно объяснить необходимость применения различных терминологических обозначений?

2. Первое положение, выносимое на защиту, сформулировано следующим образом: «Теоретически обоснована и экспериментально подтверждена возможность использования митохондрий и клеток в качестве

ЭСС для изучения трансмембранного транспорта моно-, ди- и трикарбоновых кислот» Какие выводы, сделанные автором, являются свидетельством доказательства этого положения?

3. Какова наиболее вероятная конформация молекул ингибиторов в канале транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы дрожжей? Задача определить этот параметр была поставлена автором.

4. Какие методы молекулярного моделирования применял автор для определения наиболее вероятной конформации молекул.

Автореферат написан логично, хорошо оформлен и, в целом, достаточно полно представляет содержание диссертации.

Завершая отзыв, следует сказать, что диссертационная работа Аливердиевой Динары Алиевны «Транспортеры дикарбоксилатов и модельные пороформеры в биологических мембранах» представляет собой завершенное оригинальное экспериментальное исследование, которое по актуальности, научной и практической значимости полностью соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям, изложенным п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в действующей редакции) «О порядке присуждения ученых степеней», а ее автор 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

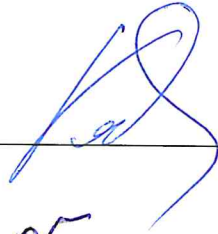
Биологического факультета

Федерального государственного бюджетного

учреждения высшего образования

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

Калебина Татьяна Сергеевна


«4» 05 2024 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

А.М. Рубцов

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