

**МИНОБРНАУКИ РОССИИ**  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
**«Федеральный исследовательский центр**  
**«Пушкинский научный центр биологических исследований**  
**Российской академии наук»**  
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)

142290, г. Пушкино Московской обл., проспект Науки, д.3.  
Тел./факс: (4967)73-26-36, e-mail: info@pncbi.ru, http://www.pbcras.ru  
ОКПО 02699688, ОГРН 1025007768983, ИНН/КПП  
5039002841/503901001

22.05.2024 № 191-01-2115/365

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Директор ФИЦ ПНЦБИ РАН

П.Я. Грабарник

« 22 » мая 2024 г.



### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

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

#### **Актуальность темы диссертационной работы**

Несмотря на большое количество научных достижений, интерес к изучению механизмов транспорта соединений через биологические мембраны и структурно-функциональной организации белков-переносчиков достаточно высок. Это связано, прежде всего, с важной ролью мембранных транспортных систем в осуществлении взаимодействия между различными компартментами клетки и в регуляции клеточного метаболизма. Большинство широко используемых прямых методов количественного исследования трансмембранного транспорта соединений обладает рядом недостатков. Очевидна необходимость совершенствования методов и используемых подходов для изучения свойств белков-транспортеров в биологических мембранах. С<sub>4</sub>-дикарбоксилаты играют важную роль в метаболизме

эукариот, являясь интермедиатами цикла Кребса. Кроме того, транспортеры дикарбоксилатов участвуют в обменных процессах, связанных с возникновением системных и онкологических заболеваний. При этом ни для одного из переносчиков дикарбоксилатов эукариот третичная структура не установлена.

В настоящее время в связи с появлением резистентных к антибиотикам штаммов патогенных микроорганизмов, одной из актуально исследованных механизмов действия антимикробных соединений на биологические мембраны. Механизм их антимикробного действия не ясен. Отдельный научный интерес представляют пороформирующие пептиды. Известно их антибактериальное, антигрибковое, антипаразитарное, противоопухолевое и нейропротекторное действие. Однако побочные эффекты терапии, и недостаточное знание механизмов их действия, существенно ограничивают их применение в клинической практике.

В связи с вышесказанным, работа Аливердиевой Динары Алиевны, посвященная изучению особенностей порообразования пептидными индукторами катионной проницаемости с использованием митохондрий печени крысы, а также изучению свойств, кинетических параметров и структуры активного центра нативного транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы дрожжей *S. cerevisiae*, несомненно, является актуальной.

### **Структура и содержание диссертации**

Диссертационная работа изложена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 465 литературных источников. Диссертация изложена на 271 странице и содержит 60 рисунков и 9 таблиц. Изложение литературных данных и результатов исследований хорошо структурировано, подразделы логически связаны друг с другом и отражают порядок проведения работы.

Автор обосновывает актуальность темы, формулирует цель работы и основные задачи исследования, список положений, выносимых на защиту, характеризует научную новизну, практическую значимость, методы исследования, сведения об апробации работы и о научных публикациях по теме диссертационной работы.

Обзор литературы (Глава I) состоит из 9 разделов. В разделе 1 описаны традиционные методы исследования трансмембранного транспорта. Автором

детально проанализированы известные подходы к изучению транспорта субстратов реконструированными белками-транспортёрами, методы прямого измерения трансмембранного транспорта. В следующих разделах дана характеристика объектов исследования - митохондрий печени крыс и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Приведены сведения о структурной организации митохондрий млекопитающих и митохондрий дрожжей и плазматической мембраны *S. cerevisiae*. Приведена структура и механизм действия некоторых мембраноактивных пептидов, приведены данные о медицинском значении пороформирующих пептидов. Автором дан глубокий анализ состояния вопроса о структуре и функционировании транспортеров дикарбоксилатов. Детально описаны и обсуждены механизмы транслокации субстратов. Теоретически обоснованы используемые в работе методические приемы. В главе Обзор литературы автором проанализирован большой материал, непосредственно связанный с темой диссертации и подтверждающий ее актуальность, использованы в достаточной мере современные работы последних лет.

В главе Материалы и методы исследования описаны объекты исследования, оборудование и реагенты, достаточно детально изложены основные методы и подходы, использованные при выполнении работы.

Глава Результаты и обсуждение содержит результаты собственных исследований, полученные автором, и разделена на 12 разделов. В первом разделе автором приводится обоснование использования препарата митохондрий и оксиметрической ячейки в качестве биосенсора трансмембранного катионного тока, индуцированного пороформерами в сопрягающей мембране митохондрий. Отдельное внимание уделено разработке методических приемов работы. Второй раздел посвящен изучению трансмембранного транспорта в препаратах митохондрий печени крысы и дрожжах *S. cerevisiae* с использованием эндогенных сопряженных систем митохондрий и клеток. Применимость и корректность такого подхода показана автором на примере хорошо охарактеризованного в литературе транспортера пирувата. Установлено, что транспорт сукцината через плазмалемму *S. cerevisiae* опосредован O-пальмитоил-L-малат чувствительным транспортером с нетипичными для плазмалеммы грибов свойствами. Для изучения активного центра этого транспортера применен метод зондирования с использованием конкурентных ингибиторов переносчика 2-алкилмалонатов и O-ацил-L-малатов.

Непроницаемость плазматической мембраны дрожжей для всех использованных ингибиторов была проверена в отдельных опытах.

В третьем разделе приведены характеристики пороформирующих пептидов мелиттина, аламетицина, мастопарана и тетраацетилмелиттина в сопрягающей мембране митохондрий печени крысы. Впервые автору удалось показать, что стационарную калиевую проводимость, индуцированную в митохондриях низкоолигомерной формой аламетицина, можно измерить на фоне проводимости его высокоолигомерных форм. Убедительно обосновано предположение, что образованная алметицином пора содержит димеризованный пептид и липид.

В четвертом разделе приведен большой экспериментальный материал, посвященный энзимологической характеристике нового транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae*, показано влияние катионов на транспортную активность, зависимость от pH среды, его субстратная специфичность. Обсудив возможные механизмы транспорта субстратов через плазмалемму низших эукариот, автор обоснованно предположил механизм транспорта – неэлектрогенный унипорт.

Пятый, шестой и седьмой разделы посвящены использованию амфифильных производных субстратов для изучения активного центра транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы дрожжей *S. cerevisiae*. Автор приводит данные по моделированию конформации 2-алкилмалонатов и О-ацил-L-малатов и применяет эти данные для изучения активного центра транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы дрожжей. Автором проведено сравнение структуры канала дрожжевого переносчика со структурой канала антипортера митохондрий печени крыс и показать различия.

В восьмом разделе приведены основные методические достижения работы. Предложена обобщающая схема самоассоциации пептидов-пороформеров в сопрягающей мембране митохондрий. Автором предложено учитывать такие особенности пороформеров, как коэффициент их распределения в мембране, критическая концентрация, вызывающая лизис органелл, влияние на мембранный потенциал.

В девятом разделе приведены и проанализированы уникальные свойства нового транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae*, проведено сравнение его свойств со свойствами известных в литературе транспортеров плазмалеммы дрожжей.

В десятом разделе приведена модель трансмембранной части канала транспортера дикарбоксилатов митохондрий печени крысы, созданная на базе третичной структуры ADP/ATP антипортера и модель транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae*, созданная на базе третичной структуры калиевого канала бактерии *S. lividans*.

В одиннадцатом разделе обсуждены результаты и обозначены перспективы изучения липофильных профилей ионных каналов с точечными мутациями. Приведен анализ результатов по изучению активных центров транспортеров дикарбоксилатов, основные принципы методологии исследования. Сделан обоснованный вывод, что изученный в работе переносчик – единственный дикарбоксилатный транспортер плазмалеммы дрожжей, для которого охарактеризовали липофильность внутренней поверхности канала активного центра. Учитывая трудоемкость применяемых прямых методов сканирования каналов переносчиков, разработка новых методов и подходов к изучению активных центров нативных транспортеров является перспективной.

В двенадцатом разделе показаны преимущества предложенного подхода по сравнению с традиционными прямыми методами измерения транспорта.

В заключении кратко обобщены полученные экспериментальные данные и перспективы их применения в свете современного состояния проблемы.

Выводы, сформулированные в диссертации, изложены логично в соответствии с задачами и положениями, выносимыми на защиту, являются выводами из результатов проведенных исследований и в полной мере обоснованы и правомерны. Результаты диссертационного исследования опубликованы в рецензируемых международных и российских научных журналах, доложены и обсуждены на российских и международных конференциях, конгрессах и симпозиумах.

### **Научная новизна полученных в работе результатов**

Автором получены новые данные о механизме действия пороформирующих антибиотиков на митохондрии. Показано, что проводимость, индуцированная во внутренней мембране митохондрий печени крысы, и степень активации окисления сукцината связаны линейной зависимостью. Выявлены два механизма самоассоциации пороформеров во внутренней мембране митохондрий, обосновано предположение, что пора, образованная аламетицином во внутренней мембране митохондрий, может содержать димеризованный пептид и липид.

На основании обобщения многолетнего экспериментального материала разработана методология использования амфифильных эфффекторов и изучения нативных транспортеров в интактных системах. Показано, что транспорт сукцината через плазмалемму дрожжей *S. cerevisiae* опосредован переносчиком с уникальными и нетипичными для плазмалеммы грибов свойствами: широкой субстратной специфичностью, оптимумом в области щелочных значений pH, pH-зависимым модулированием транспорта однозарядными катионами с механизмом транспорта – неэлектрогенным унипортом. Впервые с помощью непроникающих в клетку конкурентных ингибиторов 2-алкилмалонатов изучена структура канала транспортера плазмалеммы дрожжей *S. cerevisiae*, выявлена протяженная липофильная область, занимающая значительную часть канала вблизи точки связывания субстрата. Скорректированы модели трехмерных структур переносчика дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* и антипортера митохондрий печени крысы с разным механизмом функционирования.

#### **Практическая значимость результатов**

Разработанные или усовершенствованные в работе методы использования амфифильных эфффекторов, безусловно, представляют научно-практическую ценность. Отдельно можно отметить предложенную автором методологию измерения нативных транспортеров в интактных системах. А методы, разработанные при изучении транспортера *S. cerevisiae*, применимы для изучения и поиска малоактивных переносчиков окисляемых субстратов дрожжей. Примененный автором ингибиторный анализ (в отсутствие данных о третичной структуре переносчиков дикарбоксилатов) является единственным источником информации о структуре их активных центров. Методы и подходы, использованные автором при изучении пептидов-пороформеров, можно применить для изучения уже применяемых в медицинской практике антибиотиков-пороформеров и антимикробных соединений, которые все еще находятся на стадии клинических испытаний. Результаты работы расширяют представления о механизмах возможного токсического действия пептидов-пороформеров. Предложенные автором подходы к изучению механизмов действия пороформеров на митохондрии могут успешно применяться при тестировании новых антимикробных природных и синтетических соединений – потенциальных лекарственных препаратов. Научная новизна и практическая значимость данной диссертационной работы не вызывают сомнений.

**Методология и методы исследования.** Работа выполнена с привлечением комплекса методов молекулярной биологии, микробиологии и биохимии. В процессе работы были использованы методы ферментативной кинетики и молекулярного моделирования. Надо отметить, что многие из используемых методов были разработаны или оптимизированы в лаборатории при непосредственном участии автора.

**Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов не вызывает сомнений.** Представлен большой объем экспериментальных воспроизводимых данных, результаты получены разными методами, соответствуют поставленным задачам.

**Апробация работы.** Результаты и основные положения диссертации доложены и обсуждены на многочисленных российских и международных научных форумах.

**Обоснованность выводов.** В диссертационной работе поставлено 5 основных задач, сформулировано 4 основных положения, выносимых на защиту. По результатам исследований сделано 7 выводов. Выводы полностью соответствуют цели и задачам исследования, подтверждаются результатами исследований, являются научно обоснованными и правомерными. Все выводы диссертации сделаны на основе результатов большого количества тщательно подготовленных и проведенных экспериментов. Использование в исследованиях методов молекулярной биологии, микробиологии, биохимии, методов ферментативной кинетики и молекулярного моделирования, часть из которых были разработаны или оптимизированы в процессе выполнения работы, подтверждает обоснованность и достоверность полученных результатов, а также выносимых на защиту положений и выводов. Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов обусловлена репрезентативным объемом экспериментального материала, подтверждается воспроизводимостью полученных результатов и не вызывает сомнений.

**Полнота изложения результатов диссертации в публикациях автора.** Основные положения и результаты диссертационной работы отражены в автореферате и публикациях автора. По материалам диссертационной работы опубликовано 47 работ, в том числе 24 статьи в журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК, из них 22 – в научных журналах, индексируемых в базе данных Web of Science. В соавторстве получены 2

российских патента на изобретение. Данные диссертации представлены также в обзорных статьях, и включены в книги зарубежных издательств. Рукопись автореферата соответствует содержанию диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

**При ознакомлении с диссертационной работой возник ряд вопросов:**

1. Интересно мнение автора о перспективах применения ингибиторного анализа для изучения структуры каналов нативных переносчиков в биологических мембранах.
2. Возможно ли изучение других переносчиков плазматической мембраны дрожжей с использованием предложенного подхода?
3. Какие ограничения имеет применение предложенного в работе подхода с использованием эндогенных сопряженных систем?
4. Есть ли данные об успешном применении пороформирующих соединений в клинической практике последних лет и чем обусловлены ограничения их использования в рамках современных представлений?

Высказанные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают основных результатов и выводов диссертации, вопросы вызваны интересом к проводимым исследованиям и не снижают общей положительной оценки работы. Автореферат и опубликованные автором научные труды в полной мере отражают содержание диссертации.

**Заключение**

Диссертационная работа Аливердиевой Динары Алиевны на тему: «Транспортеры дикарбоксилатов и модельные пороформеры в биологических мембранах», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, вносит существенный вклад в понимание механизмов функционирования транспортеров дикарбоксилатов и пептидных индукторов катионной проницаемости, является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, имеющей большое научное и практическое значение. Диссертация полностью соответствует требованиям, изложенным в Положении о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в редакции от 25.01.2024 г.) «О порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к докторским диссертациям, а ее



автор, Аливердиева Динара Алиевна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Отзыв ведущей организации на диссертацию Аливердиевой Д. А. обсужден и одобрен на открытом семинаре лаборатории адаптации микроорганизмов и лаборатории регуляции биохимических процессов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», протокол № 1 от 21.05.2024 г.

Отзыв подготовил

доктор биологических наук

по специальности 03.00.07 Микробиология

ведущий научный сотрудник

лаборатории адаптации микроорганизмов

ИБФМ им. Г.К. Скрябина – обособленного подразделения

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный

исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических

исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН)

 Меденцев Александр Григорьевич

22.05.2024

Подпись Меденцева Александра Григорьевича заверяю

кандидат биологических наук

Ученый секретарь

ФИЦ ПНЦБИ РАН





Назарова Галина Николаевна

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН).

Почтовый адрес: 142290, г. Пушкино Московской обл., проспект Науки, д.3.

Эл. почта: [info@pbcras.ru](mailto:info@pbcras.ru); [medentsev-ag@rambler.ru](mailto:medentsev-ag@rambler.ru); сайт: <https://www.pbcras.ru/>;

тел./факс: +7(4967)73-26-36, +7(4967)73-86-20, +7(910) 469-53-49.