

## ОТЗЫВ

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

### **Актуальность темы исследования.**

С<sub>4</sub>-дикарбоксилаты, в частности, малат, сукцинат и фумарат, играют важную роль в метаболизме. Их транспорт обнаружен во всех энергопреобразующих мембранах клеток животных, растений, грибов и бактерий. Однако механизмы транспорта изучены недостаточно. Известно, что среди более сотни транспортеров, для которых есть 3D – структуры с разрешением около 4Å и среди двух десятков транспортеров – с разрешением около 1,5 Å переносчики дикарбоксилатов отсутствуют. Методические проблемы, связанные с получением третичной структуры транспортеров с высоким разрешением, привели к тому, что структура активного центра и канала для дикарбоксилатных переносчиков, не изучены. В настоящее время показана существенная роль транспортеров дикарбоксилатов в регуляции таких заболеваний, как рак, диабет, ожирение, заболевания центральной нервной системы. Обсуждаются терапевтические перспективы применения синтетических ингибиторов дикарбоксилатных транспортеров в качестве лекарств.

В связи с появлением многочисленных штаммов патогенных микроорганизмов, резистентных к традиционным антибиотикам, одной из актуальных проблем является раскрытие механизмов действия антимикробных соединений на биологические мембраны. При этом устойчивых к антибиотикам-пороформерам патогенных штаммов бактерий и грибов практически нет. Некоторые природные пептиды, способные формировать поры в биологических мембранах, признаны перспективными для терапии ряда инфекционных и онкологических заболеваний, большинство из них находится на этапе клинических испытаний. Особенности механизмов порообразования этими пептидами остаются предметом дискуссии.

Работа Аливердиевой Д.А. как раз посвящена решению подобных проблем и поэтому, безусловно, является актуальной. В своей работе Динара Алиевна исследует свойства и кинетические параметры нативных дикарбоксилатных транспортеров с различными механизмами функционирования, а также изучает особенности порообразования митохондриальных мембран антимикробными пептидами аламетицином, мелиттином и мастопараном.



## **Общая характеристика, структура и оформление диссертации.**

Диссертационная работа Аливердиевой Д.А. составлена по традиционной схеме. Работа включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, изложение результатов исследования и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающий 465 источников. Работа изложена на 271 странице и включает 60 рисунков и 9 таблиц.

Во «Введении» автор описывает важность изучаемой темы, формирует цель и задачи работы, характеризует научную новизну, научно-практическую значимость результатов исследования, определяет научные положения, выносимые на защиту, приводит данные о личном вкладе автора, публикациях в журналах и апробации работы на конференциях.

В разделе «Обзор литературы» Динара Алиевна представила свой взгляд на изучаемую проблему. Из 9 глав данного раздела можно вычлениить 3 основные темы – митохондрии млекопитающих и дрожжей *S. cerevisiae*, их мембраны и переносчики, структура и механизм действия мембранных пороформеров и характеристика дикарбоксилатных транспортеров. Важно отметить, что диссертант сделал очень глубокий исторический обзор по данной тематике исследований.

В разделе «Материалы и методы исследования» автор приводит описание всех методик, используемых в работе. В качестве ключевых методов в работе используются классические методы исследования митохондрий и мембран животных и дрожжевых клеток. Также можно отметить использование таких методов молекулярной биологии и биохимии как секвенирование и молекулярное моделирование. Применяемые в работе методики и подходы позволили достаточно подробно охарактеризовать полученные результаты. Исходя из использованных методов и полученных результатов, можно сказать, что диссертационная работа Аливердиевой Д.А. является добротной работой в области современной митохондриологии.

В работе автор ставит перед собой две основных задачи: 1) определить биохимические параметры и свойства нового транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы дрожжей; 2) охарактеризовать механизмы действия пороформеров на митохондриальные мембраны. Результаты исследования и их обсуждение изложены в 12 главах. Первая глава посвящена анализу возможности использования митохондрий печени крыс в качестве биосенсоров трансмембранного тока. В этой главе автор характеризует гомогенность и стабильность митопластов при индукции катионной проницаемости, и используя валиномицин и меллитин делает вывод о том, что митохондрии можно использовать в качестве биосенсора калиевого трансмембранного тока, индуцированного пороформерами.



Следующая глава посвящена изучению методов измерения трансмембранного транспорта в митохондриях печени крыс и дрожжах *S. cerevisiae*. Автор описывает сукцинатоксидазную систему митохондрий печени крыс и клеток *S. cerevisiae*. В дальнейшем проводится подбор условий (в том числе подбор состава среды, pH и температуры) для характеристики дикарбоксилатного транспорта в исследуемых объектах. В дальнейшем исследуется транспорт сукцината и пирувата, рассчитываются соответствующие кинетические параметры. Все это, а также использование непроникающих ингибиторов транспортера плазматической мембраны *S. cerevisiae* позволило автору сделать вывод об обнаружении нового О-пальмитоил-L-малат чувствительного транспортера плазмалеммы *S. cerevisiae*.

Третья глава посвящена изучению механизмов порообразования в мембране митохондрий печени крыс с помощью аламетицина и мастопарана. Определено соотношение степеней активации дыхания аламетицином, мелиттином, мастопараном или тетраацетилмелиттина в монокалийевой и монолитиевой средах при одинаковом значении  $\Delta\psi$ . Сделано предположение о том, что в присутствии аламетицина проводимость лимитируется реакцией образования поры, а в присутствии мелиттина или мастопарана – стадией, предшествующей порообразованию. На основании полученных данных автор предполагает, что существует два механизма самоассоциации пороформеров в биомембране: с замедлением образования непроводящей димерной предпоры и с замедлением образования транспортирующего канала. Важным результатом является то, что пора в низкопроводимом состоянии, образуемая аламетицином, является пептид-липидной.

Следующие три главы посвящены характеристике нового дикарбоксилатного транспортера плазмалеммы дрожжей. Автор описывает его регуляцию, pH зависимость. Параллельно с помощью пакета ChemOffice Аливердиева Д.А. моделирует структуру ингибиторов (2-алкилмалонатов и О-ацил-L-малатов) и рассчитывает их размер и энергию конформации. В дальнейшем использование данных синтезированных ингибиторов позволило автору получить зависимости ингибирования транспортера ДКБ плазмалеммы дрожжей и сукцинатоксидазной системы митохондрий печени крыс. На основании полученных результатов автор делает вывод о том, что транспортер плазмалеммы дрожжей обладает широкой субстратной специфичностью, pH оптимумом в щелочной области и pH-зависимым модулированием транспорта однозарядными катионами. Тип транспорта, осуществляемый этим переносчиком – это неэлектрогенный унипорт.

Главы 3.7-3.12 посвящены обсуждению полученных в работе результатов. Аливердиева Д.А. обосновывает методический подход к анализу характеристик



пороформеров изучению трансмембранного транспорта моно-, ди- и трикарбоновых кислот. Автор также обсуждает характеристики обнаруженного в работе транспорта дикарбоксилатов в плазмалемме *S. cerevisiae*.

Раздел «Заключение» обобщает полученные в работе результаты. Выводы оригинальны и полностью соответствуют полученным результатам.

#### **Научная новизна, теоретическая и практическая ценность исследования.**

Полученные при выполнении диссертационной работы Аливердиевой Д.А. данные имеют большую научную значимость в данной области исследований. Они развивают представления о мембранном транспорте и формируют новые направления для будущих исследований. В работе предложено использование суспензии митохондрий в качестве биосенсора трансмембранного катионного тока, индуцированного пороформерами. С помощью этого подхода проведено измерение стационарной калиевой проводимости, индуцированной в митохондриях низкоолигомерной формой аламетицина на фоне проводимости его высокоолигомерных форм при низких пептид/липидных соотношениях и оценен диаметр поры. Полученные в работе данные значительно расширяют представления о механизмах порообразования мелиттина, мастопарана и аламетицина, используемых в медицинской практике.

Разработана методология измерения нативных транспортеров в интактных системах (плазматической мембране *S. cerevisiae* и митохондриях печени крыс). Впервые показано, что транспорт янтарной кислоты через плазмалемму *S. cerevisiae* опосредован О-пальмитоил-L-малат чувствительным транспортером с уникальными и нетипичными для плазмалеммы грибов свойствами. Для дикарбоксилатного транспортера плазмалеммы дрожжей изучена структура канала вблизи точки связывания субстрата, проведено сравнение со структурой канала антипортера митохондрий печени крыс. Разработанные при изучении дикарбоксилатного переносчика *S. cerevisiae* экспериментальные подходы могут быть применимы для изучения малоактивных переносчиков окисляемых субстратов дрожжей. Использование на сегодняшний день этих подходов необходимо для изучения мембранного транспорта, поскольку для широкого спектра переносчиков до сих пор отсутствует кристаллическая структура.

#### **Обоснованность выводов**

Выводы диссертации основаны на данных многолетних исследований и большом количестве проведенных экспериментов с использованием классических методов биохимии, микробиологии и молекулярной биологии. Также о достоверности полученных данных свидетельствует то, что они были опубликованы в российских и международных



рецензируемых журналах. Выводы соответствуют цели и задачам исследования, подтверждены результатами исследований.

### **Полнота изложения положений и результатов в публикациях автора**

Все положения и результаты экспериментальной работы диссертации отражены в автореферате и были опубликованы в рецензируемых научных изданиях. По материалам диссертации опубликовано 47 работ, из них 24 статьи в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК, в том числе 22 – в научных журналах, индексируемых в Web of Science, получены 2 патента на изобретение. Данные диссертации опубликованы в обзорных статьях, а также включены в книги зарубежных издательств. Материалы работы достаточно полно представлены и обсуждены на всероссийских и международных конференциях. Рукопись автореферата соответствует содержанию диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

### **Пожелания, вопросы и замечания.**

Давая положительную оценку полученным результатам и сделанным выводам, хотел бы остановиться на некоторых моментах, которые вызывают вопросы и замечания.

1. Ключевым подходом для определения кинетических показателей дикарбоксилатного транспорта в клетках дрожжей являлась инкубация клеток при температуре 0°C. Осуществлялась ли проверка жизнеспособности клеток в этих условиях? Также хотелось бы узнать происходил ли анализ чистоты фракции полученных митопластов?

2. Автор использовал итаконовую кислоту в качестве модулятора сукцинатоксидазной активности. Хотелось бы уточнить, на что данная кислота действует. Ведь известно, что итаконовая кислота является ингибитором сукцинатдегидрогеназы митохондрий, но не дикарбоксилатного переносчика. А какая картина наблюдается в дрожжевых клетках.

3. Что, по мнению автора, является лимитирующей стадией для окисления дикарбоксилатов в клетках млекопитающих и дрожжей – фермент, осуществляющий это окисление (например, сукцинатдегидрогеназа) или транспортеры?

4. Чем, по мнению автора, эксперименты на митохондриях с пороформерами лучше по сравнению с другими экспериментами на искусственных системах?

5. В разделе «Обзор литературы» в главе 1.9 автор описывает механизм действия протонофоров и протонофорный цикл. Согласно современным литературным данным (например, работы Ю.Н. Антоненко) протонофоры могут работать через белки. Однако это не описано у автора. Может ли данный тип работы протонофоров повлиять на интерпретацию данных, полученных автором.



6. Как и во всякой большой работе, встречаются опечатки, но их мало. Из раздела 2.11. непонятно, при какой длине волны измеряли набухание митохондрий (610 или 540 нм), а на рисунке 3.1. вкралась досадная опечатка, была пропущена буква “к”, написано, что добавляли к митохондриям 4 мМ цитохром с, хотя в подписи к рисунку правильно указано, что конечная концентрация цитохрома с в среде инкубации составляла 4 мкМ.

Несмотря на высказанные замечания, диссертационная работа Д.А. Аливердиевой в целом заслуживает высокой оценки. Критические комментарии вызваны интересом к представленным материалам и предложенным объяснениям.

Таким образом, следует признать, что диссертационная работа Д.А. Аливердиевой содержит серьезные научные результаты, имеющие важное значение для развития биохимии, клеточной биологии и биомедицины. Содержание автореферата и опубликованных статей полностью отражает содержание диссертации. Считаю, что диссертационная работа Динары Алиевны Аливердиевой на тему «Транспортеры дикарбоксилатов и модельные пороформеры в биологических мембранах» соответствует требованиям, изложенным в п. 9-14 Положении о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в действующей редакции от 25.01.2024 г.) «О порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

#### Официальный оппонент

Проректор по инновационной деятельности,  
профессор кафедры биохимии,  
клеточной биологии и микробиологии  
ФГБОУ ВО «Марийский  
государственный университет»



доктор биологических наук, доцент  
Белослудцев  
Константин Николаевич

24.05.2024

Адрес: 424000, Марий Эл, г. Йошкар-Ола, пл. Ленина, д. 1, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Марийский государственный университет»

Телефон: (8362)68-80-02

Сайт: [www.marsu.ru](http://www.marsu.ru); e-mail: [bekonik@gmail.com](mailto:bekonik@gmail.com)