

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

Актуальность темы исследования

Диссертация Аливердиевой Д.А. посвящена изучению механизмов взаимодействия пороформирующих антимикробных пептидов на митохондриях печени крыс и исследованию транспортеров дикарбоксилатов митохондрий печени крыс и плазмалеммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Актуальность выбранной 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 различными внутриклеточными пулами метаболитов. Например, в клетках растений переносчики дикарбоксилатов играют ключевую роль в условиях фотосинтеза, обеспечивая взаимодействие между хлоропластами и митохондриями с участием малат-оксалоацетатного челнока, благодаря которому осуществляется вынос избыточных восстановительных эквивалентов из хлоропластов и их диссипация в ЭТЦ митохондрий с участием альтернативных нефосфорилирующих путей окисления. Благодаря этому удается контролировать образование АФК и фотоокислительное повреждение аппарата фотосинтеза.

Однако, несмотря на большое количество экспериментальных данных, информация о третичной структуре дикарбоксилатных переносчиков с хорошим разрешением на сегодняшний день отсутствует. А многие аспекты их функционирования исследованы поверхностно. Разработка методологических подходов к измерению активности нативных транспортеров в интактных системах и получение информации об особенностях их структуры является актуальной. Принимая во внимание ключевую роль в контроле энергетического обмена, гликолиза, цикла трикарбоновых кислот, биосинтеза жирных кислот, в литературе активно обсуждается важная роль транспортеров моно-, ди- и трикарбоксилатов в регуляции различных метаболических заболеваний. Особое внимание уделяется Na⁺-зависимым дикарбоксилатным переносчикам, нарушение функций которых вызывает эпилептическую энцефалопатию и различные виды онкологических заболеваний. Несмотря на большое количество публикаций, механизм

действия антимикробных пептидов, исследованных в данной работе, остается дискуссионным. Актуальность изучения действия пороформеров на митохондрии и клетки связана с перспективами медицинского применения этих соединений – потенциальных лекарств, а разработанные экспериментальные подходы могут быть основой создания эффективных тест-систем для новых лекарственных препаратов. В этой связи работа Аливердиевой Д.А. является актуальной как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Аливердиевой Д.А. написана по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, описания результатов исследования и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 465 источников. Объем работы - 271 страница, иллюстративный материал состоит из 60 рисунков и 9 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. Можно рекомендовать автору опубликовать раздел работы касающийся функционированию дикарбоксилатных переносчиков в митохондриях и других клеточных мембранах в виде отдельной брошюры.

В главе «Материалы и методы» исследования автор описывает детально 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 эффекта от концентрации использованных индукторов катионной проницаемости валиномицина и мелиттина обосновано использование биосенсора катионного тока на основе митохондрий, даны его конкретные характеристики.

Большое внимание автор уделил подбору условий для измерения транспорта дикарбоксилатов в митохондриях печени крыс и дрожжах *S. cerevisiae*. Для проверки предложенного подхода измерения кинетических параметров переносчиков в нативном окружении с использованием свойств эндогенных сопряженных систем, были получены характеристики переносчика пирувата плазмалеммы *S. cerevisiae*. Результаты были очень близки результатам, полученным прямыми радиоизотопными методами. Это послужило основанием заявить об эквивалентности прямого и применяемого автором непрямого способа изучения переносчиков. На основании анализа обширного многолетнего экспериментального материала автор сделал вывод о том, что в плазмалемме *S. cerevisiae* существует O-пальмитоил-L-малат чувствительная система транспорта дикарбоксилатов.

В рамках предлагаемого методического подхода – использование эндогенных сопряженных систем в количественном изучении трансмембранного транспорта, были проведены эксперименты по изучению действия мембраноактивных полипептидов аламетицина, мелиттина, мастопарана и тетраацетилмелиттина на митохондрии печени крыс. На препарате митохондрий автору удалось показать проводимость низкоолигомерной поры аламетицина. Полипептиды разделены на две группы – умеренно и радикально подавляющие трансмембранный потенциал. Обнаружены два механизма самоассоциации пороформеров в биомембране: с замедлением образования непроводящей димерной предпоры (мастопаран и мелиттин) и с замедлением образования транспортирующего канала (аламетицин и тетраацетилмелиттин).

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, основанные на литературных данных о структуре аденилатного переносчика. В «Заключении» автор, анализируя полученные результаты, предлагает пути и перспективы их развития.

Оригинальность, теоретическая и практическая значимость результатов.

Аливердиевой Д.А. 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 низкополимерной формой аламетицина и оценить диаметр поры. Впервые показано, что транспорт сукцината через плазмалемму *S. cerevisiae* опосредован транспортером с нетипичными для плазмалеммы грибов свойствами. Изучена структура канала транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы дрожжей вблизи точки связывания субстрата, проведено сравнение со структурой канала антипортера митохондрий печени крыс.

Надо 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 дикарбоксилатов *S. cerevisiae* экспериментальные подходы применимы для изучения малоактивных переносчиков окисляемых субстратов дрожжей. Метод зондирования активных центров переносчиков дикарбоксилатов с использованием линейки производных субстратов с монотонно увеличивающимся алифатическим

заместителем можно использовать для изучения структуры активных центров трансмембранных транспортеров. Обнаружение эффектов пороформеров на митохондрии, сопоставление литической и эффективной их концентрации, влияние на трансмембранный потенциал митохондрий, может найти применение в доклинических исследованиях пороформирующих антимикробных пептидов.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, поскольку они базируются на достаточно большом объеме экспериментального материала.

Выводы корректны, оригинальны и полностью соответствуют полученным результатам. Результаты доложены на российских и международных конференциях и симпозиумах, по теме диссертационной работы опубликовано 47 работ, из них 24 статьи в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК, в том числе 22 – в журналах, индексируемых в Web of Science, получено 2 патента на изобретение. Содержание автореферата полностью соответствует содержанию диссертации.

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

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. Полученные данные будут способствовать развитию новых подходов в биохимических, микробиологических и медико-биологических исследованиях.

Замечания

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

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 принципиальны и являются пожеланием автору для дальнейшего развития предлагаемого им направления исследований.

Заключение. 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 Динары Алиевны полностью соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям, установленным Разделом 2 (п. 9-14) «Положения о присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» (в действующей редакции), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия.

Официальный оппонент

Ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией
дыхания растений и механизмов его регуляции

доктор биологических наук *Шугаев* 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)678-54-00, e-mail: ippras@bk.ru, agshugaev@ifr.moscow, ifr@ippras.ru

Шифр и наименование специальности, по которой была защищена диссертация – 03.00.12 – «Физиология и биохимия растений»

23.05.2024 г.

Подпись Шугаева Александра Григорьевича заверяю

*зам. директора по
научной работе
Карталов Д.В.*

