

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.01 ПО ЗАЩИТЕ
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
ДОКТОРА НАУК

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 06 апреля 2023 г. № 9

О присуждении Аливердиевой Динаре Алиевне, гражданство Российская Федерация,
ученой степени доктора биологических наук

Диссертация «Транспортеры дикарбоксилатов и модельные пороформеры в биологических мембранах» по специальности 1.5.4. Биохимия принята к защите 17 ноября 2022 г. (протокол № 11) диссертационным советом 24.1.233.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, 119071, Москва, Ленинский проспект, дом.33, строение 2. Совет Утвержден Федеральной службой по надзору в сфере образования и науки (Рособрнадзор), приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г., с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13 февраля 2013 года № 74/нк; от 10 февраля 2014 года № 55/нк; от 30.09.2015 №1166/нк; от 13 марта 2019 года № 222/нк; от 03.06.2021 №561/нк и 22 марта 2023 г. № 501/нк.

Соискатель

Аливердиева Динара Алиевна, 1960 года рождения, окончила с отличием биологический факультет Дагестанского государственного университета с присуждением квалификации «биология, химия» в 1981 г. С 1981 по 1984 г. обучалась в очной аспирантуре Института биохимии им. А.Н. Баха РАН. В 1985 г. Аливердиева Д.А. защитила кандидатскую диссертацию «Действие мастопарана и аламетицина на митохондрии печени крыс» в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН по специальности 03.01.04. Биохимия (диплом БЛ № 016040), выполненную в лаборатории биологического окисления (лаборатории биоэнергетики) в группе к.б.н. К.Ф. Шольца под руководством д.б.н., профессора А.В. Котельниковой. С 1987 г. работала в лаборатории биохимии и биотехнологии Прикаспийского института биологических ресурсов Дагестанского федерального исследовательского центра Российской академии наук в должности м.н.с., н.с., с.н.с., с 2010 г. по настоящее время – ведущего научного сотрудника, заведующего лабораторией.

Диссертационную работу соискатель Аливердиева Д.А. выполняла в лаборатории

биоэнергетики Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научный консультант

Звягильская Рената Александровна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биоэнергетики Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

По результатам рассмотрения диссертации «Транспортеры дикарбоксилатов и модельные пороформеры в биологических мембранах» принято следующее заключение.

Официальные оппоненты

Калебина Татьяна Сергеевна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», кафедра молекулярной биологии, лаборатория молекулярной биологии, ведущий научный сотрудник.

Шугаев Александр Григорьевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Института физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН, лаборатория дыхания растений и его регуляции, заведующий.

Белослудцев Константин Николаевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Марийский государственный университет», кафедра биохимии, клеточной биологии и микробиологии, профессор кафедры.

Выбор официальных оппонентов был обусловлен:

тем, что доктор биологических наук, профессор Калебина Татьяна Сергеевна является одним из ведущих специалистов в области молекулярной биологии клетки, исследования роли белков в молекулярной организации клеточной стенки дрожжей;

тем, что доктор биологических наук Шугаев Александр Григорьевич является одним из ведущих специалистов в области митохондриологии, исследования механизмов транспорта в митохондриях и их роли в функциональной организации органелл.

тем, что доктор биологических наук Белослудцев Константин Николаевич является одним из ведущих специалистов в области митохондриологии, исследования механизмов пермеабилзации фосфолипидных мембран, свойств митохондрий и регуляции проницаемости их внутренней мембраны.

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них значительного числа публикаций в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах.

Все три официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Аливердиевой Д.А.

Ведущая организация Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» в своем положительном отзыве, составленном ведущим научным сотрудником лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов доктором биологических наук (по специальности 03.00.04 – биохимия) Моргуновым Игорем Григорьевичем, и утвержденном заместителем директора по научной работе А.В. Лисовым, указала, что диссертационная работа Аливердиевой Д.А. является законченной научно-квалификационной работой, которая соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям, изложенным в Положении о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842 «О порядке присуждения ученых степеней», а ее автор, Аливердиева Д.А. заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4.- Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен тем, что ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН является ведущим российским институтом микробиологического и биотехнологического направления, в котором лаборатория аэробного метаболизма микроорганизмов активно проводит изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе регуляции обмена веществ микроорганизмов, и располагает значительным опытом исследований в области окислительного метаболизма дрожжей, разработки физиолого-биохимических путей регуляции сверхсинтеза органических кислот у дрожжей и изучения механизма этого процесса. Таким образом, сотрудники указанной лаборатории являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования по тематике, непосредственно связанной с диссертационной работой Аливердиевой Д.А.

В целом, высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы.

Публикации

Основные результаты диссертационной работы Аливердиевой Динары Алиевны изложены в 23 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК РФ, из них 21 – в научных журналах, индексируемых в базе данных Web of Science, что соответствует требованиям п.11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842.

Обзоры и главы в книгах:

1. **Аливердиева Д.А.,** Мамаев Д.В. Молекулярные характеристики транспортеров дикарбоксилатов и механизм транслокации // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2009. – Т. 45, № 3. – С. 263-276.

2. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V., L.S. Lagutina and D.I. Bondarenko. Transport of dicarboxylates in *Saccharomyces cerevisiae*. In: "Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology" Ed.: Antonio Mendez Vilas, Publisher: Formatex Research Center, Spain. – 2010. – V. 2. – P. 1611-1620.

3. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V. Study on the Dicarboxylates transport into *Saccharomyces cerevisiae* Cell using its Endogenous Coupled System" In: "Biotechnology in Medicine, Foodstuffs, Biocatalysis, Environment and Biogeotechnology" Eds.: S.D. Varfolomeev, G.E. Zaikov, L.P. Krylova, Publisher: Nova Publishers, USA/Russia. – 2010. – Chapter 8. P. 65-72.

4. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V., Lagutina L.S. *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane dicarboxylate transporter is a probable sensor of extracellular pH. In: "Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges". Ed.: Antonio Mendez Vilas. Publisher: World Scientific Publishing Co., Spain. – 2012. – P. 640-644.

5. Рогов А.Г., Суханова Е.И., Уральская Л.А., **Аливердиева Д.А.**, Звягильская Р.А. Альтернативная оксидаза: распространение, индукция, свойства, структура, регуляция, функции // Биохимия. – 2014. – Т. 79, Вып.13 – С. 1615-1634.

6. **Aliverdieva D.A.**, Efendieva M.H., Mamaev D.V. Natural pore forming antimicrobial peptides: test for potential toxicity. In: "Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms: Current Status and Trends", Publisher: Wageningen Academic Publishers. – 2014. – P. 560-564.

7. **Aliverdieva D.A.**, Efendieva M.H., Mamaev D.V. Pore forming drugs: antimicrobial mechanism and clinical applications. In: "Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms". Ed.: Antonio Mendez Vilas, Publisher: Boca Ratón: Brown Walker Press, USA. – 2016. – P. 302-306.

Статьи:

8. Абрамов Ш.А., Эфендиева Д.А. (**Аливердиева Д.А.**), Котенко С.Ц. Влияние питательной среды на содержание белка в дрожжах *S. cerevisiae* // Прикладная биохимия и микробиология. – 1994. – Т. 30, № 2. – С. 275-279.

9. Абрамов Ш.А., Котенко С.Ц., Эфендиева Д.А. (**Аливердиева Д.А.**), Халилова Э.А., Исламмагомедова Э.А. Новая питательная среда для выращивания дрожжей // Прикладная биохимия и микробиология. – 1995. – Т. 31, № 2. – С. 232-233.

10. Абрамов Ш.А., **Аливердиева Д.А.**, Котенко С.Ц. Морфологические и биохимические свойства нового штамма *Saccharomyces cerevisiae* Y-503 // Прикладная биохимия и микробиология. – 1997. – Т.33, № 3. – С. 325-328.

11. **Аливердиева Д.А.** Сравнительное изучение некоторых параметров энергетического обмена двух штаммов *Saccharomyces cerevisiae* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т. 37, № 1. – С. 90-96.

12. Бондаренко Д.И., **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В., Шольц К.Ф. Определение проницаемости плазматической мембраны дрожжей для амфифильных соединений // Доклады Академии наук. – 2004. – Т. 399, № 5. – С. 693-695.

13. **Аливердиева Д.А.**, Малыгин А.Г., Лагутина Л.С., Шольц К.Ф. Получение клеточных оболочек *Saccharomyces cerevisiae* с целью определения белкового состава // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т.40, № 1. – С. 350-353.
14. **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В., Лагутина Л.С., Шольц К.Ф. Особенности изменения содержания субстратов эндогенного дыхания в клетках *Saccharomyces cerevisiae* при низкой температуре // Биохимия. – 2006. – Т. 71, Вып.1. – С. 50-58.
15. Мамаев Д.В., **Аливердиева Д.А.**, Бондаренко Д.И., Шольц К.Ф. Изучение топографии активного центра дикарбоксилатного транспортера митохондрий печени крыс с помощью липофильных производных его субстратов // Биохимия. – 2006. – Т. 71, Вып. 7. – С. 984-995.
16. **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В., Бондаренко Д.И., Шольц К.Ф. Свойства дикарбоксилатного транспортера плазматической мембраны *Saccharomyces cerevisiae* // Биохимия. – 2006. – Т. 71, Вып. 10. – С. 1430-1440.
17. **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В., Бондаренко Д.И., Шольц К.Ф. Изучение топографии активного центра дикарбоксилатного транспортера плазматической мембраны *Saccharomyces cerevisiae* с помощью липофильных производных его субстратов // Биохимия. – 2007. – Т. 72, Вып. 3. – С. 325-337.
18. **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В., Бондаренко Д.И.. Дикарбоксилатный транспортер плазматической мембраны *Saccharomyces cerevisiae* переносит цитрат и модулируется катионами // Биологические мембраны. – 2008. – Т. 25, № 6. – С. 467-478.
19. **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В., Лагутина Л.С. Транспорт сукцината в клетки *Saccharomyces cerevisiae* после продолжительной холодовой преинкубации // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 5. – С. 577-485.
20. **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В.. Транспорт сукцината в клетку *Saccharomyces cerevisiae* не осуществляется через образование его нейтрального комплекса с 2-х зарядными катионами // Биологические мембраны. – 2011. – Т. 28, № 2. – С. 153-154.
21. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V., Snezhkova L, Sholtz Ch.F. Evaluation of molecularity of rate-limiting step of pore formation by antimicrobial peptides studied using mitochondria as a biosensor // Toxicology in vitro. – 2012. – V. 26. – P. 939-949.
22. Тренделева Т.А., **Аливердиева Д.А.**, Звягильская Р.А. Механизмы определения низкого уровня кислорода у млекопитающих и дрожжей и их адаптационные ответы. // Биохимия. – 2014. – Т. 79, Вып. 8. – С. 944-956.
23. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V. Discrimination of conductance of lower and higher oligomeric alamethicin pores // International Journal of Membrane Science and Technology. – 2015. – № 2. – P. 1-4.
24. Рогов А.Г., Тренделева Т.А., **Аливердиева Д.А.**, Р.А. Звягильская. Еще раз о взаимодействии бутилового эфира родамина 19 с митохондриями печени крысы // Биохимия. – 2016. – Т. 81, Вып. 4. – С. 432-438.
25. Рогов А.Г., Голева Т.Н., Овченкова А.П., **Аливердиева Д.А.**, Звягильская Р.А. Новые данные о действии SkQ1 и SkQT1 на митохондрии печени крысы и клетки дрожжей // Биохимия. – 2018. – Т. 83, Вып. 5. – С. 724-734.

26. **Aliverdieva D.A.**, Durzhinskaya M.H., Snezkova L.G., Mamaev D.V. Mastoparan dissipates mitochondrial transmembrane potential in the physiological (ADP-like) range // International Journal of Membrane Science and Technology. – 2019. – V. 6, № 2. – P. 1-4. <http://dx.doi.org/10.15379/2410-1869.2019.06.02.01>.

27. Goleva T.N., Rogov A.G., Korshunova GA, Trendeleva T.A., Mamaev D.V., **Aliverdieva D.A.**, Zvyagilskaya R.A. SkQThy, the novel promising mitochondria-targeted antioxidant // Mitochondrion. 2019. V.49. – P. 206-216.

28. Rogov A. G., Goleva T. N., Suchanova E.I., Ovchenkova A.P., **Aliverdieva D.A.**, Zvyagilskaya R.A. Mitochondrial dysfunctions may be the major causative factors underlying detrimental effects of benzalkonium chloride // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2020:8956504. doi: 10.1155/2020/8956504. eCollection 2020.

Получен 1 патент на изобретение:

1. Абрамов Ш.А., Котенко С.Ц., Далгатова Б.И., Эфендиева Д.А. (**Аливердиева Д.А.**), Халилова Э.А. Способ получения питательной среды для выращивания хлебопекарных дрожжей. 20845519 RU, МКИ6 C12 № 1/18 // Бюллетень изобретений. 1997. № 20. С 270.

Избранные тезисы докладов:

1. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V., Bondarenko D.I., Sholtz K.F. Studies on cell respiration of *Saccharomyces cerevisiae*: physiological significance of dicarboxylate transporter of plasma membrane. // 27th FEBS /PABMB Meeting Materials. PW8-005. Portugal, 30 June – 7 July, 2001 // **European Journal of Biochemistry**. 2001. – V. 269. – P. 222-223.

2. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V., Sholtz K.F. A comparative sequence analysis of proteins encoded in yeast genomes. // Abstracts ESF-EMBO Symposium on Comparative genomics of eukaryotic microorganisms. Eucaryotic genome evolution, approaches with yeasts and fungi, Sant Feliu de Guixols, Spain, 12 – 17 November, 2005. – P. 80.

3. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V., Lagutina L.S., Sholtz K.F. Endogenous respiration substrates level in *Saccharomyces cerevisiae* cells. // 14th European Bioenergetics Conference. Moscow, 22 – 27 July, 2006. // **Biochim. Biophys. Acta. Bioenergetics**. EBEC Short reports. – 2006. – Suppl. V. 14. – P. 326-327.

4. Mamaev D.V., **Aliverdieva D.A.**, Bondarenko D.V., Sholtz K.F. The atypical plasmalemmal dicarboxylate transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. // 15th European Bioenergetics Conference. Moscow, 19 – 24 July, 2008. // **Biochim. Biophys. Acta. Bioenergetics**. – 2008. – 1777. EBEC Suppl. – P. 80.

5. **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В., Бондаренко Д.И., Шольц К.Ф. Изучение топографии активных центров дикарбоксилатных транспортеров с помощью липофильных производных субстратов. // Тезисы IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, Новосибирск, 11-15 мая 2008 г. – С. 554.

6. **Аливердиева Д.А.** Методические подходы к изучению дикарбоксилатного транспортера плазмалеммы дрожжей. // Тезисы Пятой Международной научно-практической конференции "Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности", Санкт-Петербург, 28-30 апреля 2008 г. – С. 269-270.

7. **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В. Изучение транспорта дикарбоксилатов в клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с помощью эндогенной сопряженной системы. // Материалы Пятого Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 16-20 марта 2009. – С. 41-42.

8 **Aliverdieva D.A.** A mitochondrial biosensor for studies of rate-limiting step of pore formation by alamethicin. // **J. Microbial. Biochem. Technol.** – 2011. V. 3, Iss. 6. – P. 72.

9. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V., Efendieva M.H., Snezhkova L.G. A mitochondrial biosensor for studies of molecularity of rate-limiting step of pore formation by alamethicin, mastoparan and melittin. Abstracts. 38th FEBS Congress. Saint Petersburg, 6 – 11 July, 2013. // **FEBS Journal.** – 2013. – V. 280, Suppl. 1, SW 03. S14-28. – P. 258-259.

10. **Aliverdieva D.A.**, Efendieva M.H., Mamaev D.V. The mitochondria in testing drug-induced toxicity. Abstracts. 39th FEBS EMBO 2014 Conference. Paris. France, 30 August – 4 September, 2014. // **FEBS Journal.** – 2014. – V. 281, Iss. Suppl. s1, CSIII-03 Mitochondria and mitochondrial disorders. – P. 365.

11. Дуржинская М.Х., **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В. Пороформирующие антимикробные пептиды и митохондрии: тест на токсичность. // Материалы VI Съезда биохимиков России. Симпозиум «Биохимия и молекулярная медицина». IX Российский симпозиум "Белки и пептиды": Инновационные лекарственные средства на основе пептидов и белков. Сочи, Дагомыс, 1 – 6 октября 2019 г. // **Acta Naturae.** – Т.2. – С.137.

12. Джуринская М.Х., **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В. Антимикробный пептид аламетицин: механизм порообразования и перспективы клинического использования. // Научные труды III Объединенного научного форума физиологов, биохимиков и молекулярных биологов, VII Съезда биохимиков России. Сочи, Дагомыс, 3 – 8 октября 2021 г. – Т.2. – С.142-143.

Результаты работы также были представлены на российских и международных конференциях, и опубликованы в материалах этих конференций, в частности: на Симпозиуме ESF-EMBO «Comparative genomics of eukaryotic microorganisms. Eucaryotic genome evolution, approaches with yeasts and fungi» (Каталония, Испания, 2005), III-м и IV-м Съездах Общества биохимиков и молекулярных биологов России (Санкт-Петербург, 2002 и Новосибирск, 2008), Московских международных научных конференциях «Биотехнология – окружающей среде» (Москва, 2004, 2005 и 2006), Московском Международном конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2009), IV-й международной конференции Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2011 (Малага, Испания, 2011), V-ой международной конференции Environmental, Industrial and Applied Microbiology BioMicroWorld2013 (Мадрид, Испания, 2013), 27-ой конференции FEBS/PABMB (Лиссабон, Португалия, 2001), Европейских Биоэнергетических конференциях (ЕВЕС) (Москва, 2006 и Дублин, Ирландия, 2008), 38-ой конференции FEBS (Санкт-Петербург, 2013) и 39-ой конференции FEBS-EMBO (Париж, Франция, 2014), VI конференции Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2015 (Барселона, Испания, 2015), VI Съезде

биохимиков России (Сочи, 2019), VII-м Съезде биохимиков России и X-м Российском симпозиуме "Белки и пептиды" (Сочи–Дагомыс, 2021).

В перечисленных публикациях адекватно отражены результаты экспериментальной работы, проведенной в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, профессора **Калебиной Татьяны Сергеевны** (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

1. В формулировке цели работы фразы: "...изучение особенностей порообразования..., а также....сравнительное изучение свойств..." несколько снижают фундаментальную значимость проделанной работы.

2. 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. Из описания раздела молекулярно-генетически методы не ясно, сам ли автор проводил секвенирование. Раздел написан излишне кратко. Сожаление вызывает излишне краткое описание экспериментальной процедуры в разделе 2.4.2. "Выделение митохондрий *S. cerevisiae*", одной из ключевых экспериментальных процедур работы. Следующий за этим разделом раздел 2.4.3. "Выделение митохондрий печени крысы" в значительной степени лишен этого недостатка. Тем не менее, раздел 2.4.6., посвященный описанию процедуры получения митохондрий с поврежденной внешней мембраной, снова описан весьма кратко. Следует отметить, что ссылки в отмеченных разделах на соответствующие публикации присутствуют и, тем не менее, желательно было бы видеть в диссертации более подробное описание указанных методов. Тем более, что теоретическая часть работы занимает 130 страниц, что составляет половину от экспериментальной части, если исключить раздел "Список литературы", что, безусловно, дает автору возможность расширить материал экспериментальной части. Особенно важно высказанное замечание в свете того, что сам автор, как было сказано ранее, 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. Не совсем ясно, зачем автор проводил столь объемную процедуру идентификации дрожжей *S. cerevisiae*. Желательно прояснить этот вопрос.

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. Начинается этот раздел с главы, название которой более подходит для обзора литературы "Митохондрии печени крысы – биосенсоры трансмембранного тока", однако далее автор переходит на язык экспериментального изложения. 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.

3. Следует отметить, что фраза из формулировки задачи "изучить скорость-лимитирующую стадию...." представляется мне излишне расплывчатой и неконкретной, однако на этой стадии работы были получены важные результаты, что нашло отражение в выводах 2 и 3. Изучены свойства, в том числе кинетические характеристики переносчика дикарбоксилатов плазмалеммы дрожжей. Результаты этой части исследований были использованы автором при формулировании выводов 5 и 6, что хотя и не противоречит логике исследования, однако несколько нечетко сформулировано в выводах. Хотелось бы получить ответ на вопрос и уточнить, как соотносятся задача 2 и положение 5.

Автореферат написан логично, хорошим языком и, в целом, достаточно полно представляет содержание диссертации. Список сокращений в автореферате приведен на странице 7, непосредственно перед содержательной частью работы, а следовало его привести на странице 3. Отмечается, что выводы, сделанные Аливердиевой Д.А., являются именно выводами из работы, а не переписыванием полученных результатов, что производит весьма хорошее впечатление.

В отзыве отмечается, что высказанные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают суть полученных результатов и являются пожеланием автору для дальнейшего развития направления исследований.

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук **Шугаева Александра Григорьевича** (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

Литературный обзор несколько перегружен детальной информацией о структуре и механизмах функционирования транспортеров дикарбоксилатов из самых различных объектов.

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

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.

В отзыве отмечается, что высказанные замечания не рассматриваются как принципиальные и являются пожеланием автору для дальнейшего развития предлагаемого им направления исследований.

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук **Белослудцева Константина Николаевича** (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

1. В разделе «Результаты и обсуждение» автор несколько раз переходит с результатов по митохондриальным переносчикам на результаты по пороформерам. Сюда же можно отнести и то, что рисунки и таблицы не всегда расположены по месту их упоминания. Кроме того, автору бы следовало в подписях к рисунку упоминать составы сред, а не называть их СИ1-СИ9. Особенно там, где это является ключевым фактором.

2. 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?

3. 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.

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

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

6. В работе автор говорит о сукцинатоксидазе митохондрий. В начале диссертационной работы автор, конечно, упоминает, что он под этим термином подразумевает несколько белков митохондрий. Я считаю, что правильней говорить о сукцинат-оксидазной системе митохондрий.

В отзыве отмечено, что диссертационная работа Аливердиевой Д.А. является добротной работой в области современной митохондриологии и содержит серьезные научные результаты, имеющие важное значение для развития биохимии, клеточной биологии и биомедицины. Несмотря на высказанные замечания, диссертационная работа в целом заслуживает положительной оценки, а критические комментарии вызваны интересом к представленным материалам и предложенным объяснениям.

Отзыв ведущей организации Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

1. В работе предложено использовать ферментативные системы окисления субстратов

в препаратах митохондрий и клеток качестве эндогенных сопряженных систем для изучения трансмембранного транспорта моно-, ди- и трикарбоновых кислот. Очевидно, что предложенный подход имеет ограничения. Какие именно ограничения, по мнению автора, имеет предложенный подход при изучении транспортеров митохондрий и плазмалеммы? Возможно ли изучение других переносчиков плазматической мембраны дрожжей с использованием этого подхода?

2. Интересно мнение автора о перспективе применения ингибиторного анализа при изучении структуры каналов нативных переносчиков в биологических мембранах.

В отзыве отмечается, что высказанные замечания и вопросы не носят принципиального характера, не затрагивают основных результатов и выводов диссертации, и не снижают общего положительного впечатления от работы. Отмечено, что все экспериментальные результаты диссертационной работы получены с применением надежных и эффективных экспериментальных методов. Все выводы диссертации Д.А. Аливердиевой сделаны на основе результатов большого количества тщательно подготовленных и проведенных экспериментов.

На автореферат поступили положительные отзывы от

Мирошникова Анатолия Ивановича, доктора химических наук, академика РАН, заведующего отделом Биотехнологии Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, замечаний нет.

Захарова-Гезехуса Ильи Артемьевича, доктора биологических наук, члена-корреспондента РАН, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, замечаний нет.

Поповой Татьяны Николаевны, доктора биологических наук, профессора, заведующей кафедрой медицинской биохимии и микробиологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», замечаний нет.

Сербы Елены Михайловны, доктора биологических наук, члена-корреспондента РАН, заместителя директора по научной работе Всероссийского научно-исследовательского института пищевой биотехнологии, филиала ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии». В отзыве есть следующее замечание: отмечено обстоятельное описание методов и результатов исследований, однако отсутствие списка сокращений немного затрудняет восприятие материала.

Терёшиной Веры Михайловны, доктора биологических наук, руководителя группы «Экспериментальной микологии» Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук. Отзыв не имеет замечаний, но содержит вопрос: проверялась ли жизнеспособность клеток дрожжей в ходе их длительной преинкубации при 0°C?

Цугкиева Бориса Георгиевича, доктора биологических наук, профессора, заведующего кафедрой «Биотехнология и стандартизация», ФГБОУ ВО «Горский

государственный аграрный университет», замечаний нет.

Думачевой Елены Владимировны, доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории физиологии сельскохозяйственных растений ФГБНУ «Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса», замечаний нет.

Кличханова Нисреда Кадиновича, доктора биологических наук, профессора кафедры биохимии и биофизики ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет». Отзыв не содержит замечания, затрагивающие содержательную часть работы. Отмечено наглядное и обстоятельное описание результатов, при этом большое количество сокращений несколько затрудняет чтение автореферата. Отзыв содержит вопрос: хотелось бы уточнить, есть ли в настоящее время пороформирующие антибиотики, официально разрешенные в мировой клинической практике и каковы перспективы их применения?

С вопросами выступили:

д.б.н., профессор Юрина Н.П., д.б.н., профессор Шумянцева В.В., д.б.н. Шлеева М.О.

В дискуссии приняли участие:

д.б.н., профессор Топунов А.Ф., д.б.н., профессор Юрина Н.П.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований, получены следующие **основные результаты**:

1. Впервые показано, что суспензия митохондрий в оксиметрической ячейке может быть использована в качестве бесконтактного биосенсора трансмембранного катионного тока. Проводимость, индуцированная во внутренней мембране митохондрий печени крыс, и степень активации окисления ими сукцината связаны линейной зависимостью.

2. Установлено, что существуют два механизма самоассоциации пороформеров в мембране митохондрий: с замедлением образования непроводящей предпоры (для мелиттина и мастопарана) и с замедлением образования транспортирующего канала (для аламетицина и тетраацетилмелиттина). Эти механизмы отличаются медленным стабилизирующимся и быстрым не стабилизирующимся характером уменьшения величины трансмембранного потенциала, соответственно.

3. Впервые показано, что стационарную калиевую проводимость, индуцированную в митохондриях низкоолигомерной формой аламетицина, можно измерить на фоне проводимости его высокоолигомерных форм. Порядок реакции, лимитирующей низкоолигомерную проводимость, близок к двум. Это свидетельствует о том, что образованная алметицином пора, по-видимому, содержит димеризованный пептид и липид. Аналогичным способом показано, что предпора мастопарана также является димером.

4. Сформулированы, теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены методологические принципы измерения активности нативных транспортеров в интактных системах.

5. Разработаны методы измерения кинетических параметров интактных переносчиков

in situ, основанные на использовании эндогенных систем окисления моно- ди- и трикарбоксилатов в качестве сопряженных систем измерения транспорта этих соединений. С применением этого подхода впервые показано существование О-пальмитоил-L-малат-чувствительного транспортера плазмалеммы *S. cerevisiae*.

6. Впервые показаны нехарактерные для транспортеров плазмалеммы грибов особенности: независимость транспорта от электрохимического градиента, способность транспортировать как сукцинат, так и цитрат, причем в дианионной форме, рН оптимум в щелочной области и рН-зависимое модулирование активности однозарядными катионами (Na^+ , K^+ , Tris^+). Предполагаемый механизм транспорта – неэлектрогенный унипорт. Показана широкая субстратная специфичность переносчика (сукцинат, цитрат, фумарат, итаконат, малонат, L- и D-малат).

7. Впервые для изучения активного центра нативного дикарбоксилатного транспортера плазмалеммы *S. cerevisiae* применен метод зондирования с использованием двух рядов непроникающих конкурентных ингибиторов (2-алкилмалонатов и О-ацил-L-малатов). Выявлена протяженная (1,7 нм) липофильная область вблизи точки связывания двухзарядной головки ингибитора. Для внешнего полуканала дикарбоксилатного антипортера митохондрий печени крыс выявлена липофильная зона (1,2 нм), разделенная гидрофильной площадкой (0,4 нм). С использованием бифункциональных α,ω -алкилендималонатов показано, что малат и малонат в митохондриальном переносчике имеют единую точку связывания.

Теоретическая значимость работы

Получены новые данные, характеризующие первые этапы порообразования для мелиттина, мастопарана и аламетицина в энергизованных митохондриях печени крысы. Показана возможность использования суспензии высокосопряженных митохондрий в оксиметрической ячейке в качестве бесконтактного биосенсора трансмембранного катионного тока, индуцированного пептидами-пороформерами. 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 трансмембранного потенциала при низких пептид/липидных соотношениях, и оценить диаметр поры. Определено соотношение величин активации дыхания аламетицином, мелиттином или мастопараном в монокалиевой и монокальциевой средах при одинаковом значении мембранного потенциала. Сделано предположение о том, что в присутствии аламетицина проводимость лимитируется реакцией образования поры, а в присутствии мелиттина или мастопарана – стадией, предшествующей порообразованию. Разработаны методические подходы измерения кинетических параметров дикарбоксилатных переносчиков *in situ*, основанные на использовании эндогенных сопряженных систем окисления их субстратов. Подобраны условия, при которых митохондрии в клетках *S. cerevisiae* могут служить

эндогенной сопряженной системой для измерения стационарных скоростей транспорта сукцината и пирувата через плазмалемму. Впервые показано, что в диапазоне от pH 5,5 до pH 7,5, транспорт сукцината через плазмалемму *S. cerevisiae* опосредован О-пальмитоил-L-малат чувствительным транспортером с нетипичными для плазмалеммы грибов свойствами. Для двух транспортеров (митохондрий и плазмалеммы) с разным механизмом изучена структура их каналов вблизи точки связывания субстрата.

Практическую значимость имеют разработанные или усовершенствованные в ходе выполнения работы методы использования амфифильных эффекторов и предложенные методические подходы к изучению нативных транспортеров в интактных органеллах и клетках, которые применимы для изучения и поиска малоактивных переносчиков окисляемых субстратов дрожжей. В отсутствие рентгеноструктурных данных о третичной структуре транспортеров дикарбоксилатов митохондрий печени крыс и плазмалеммы дрожжей, изучение активных центров переносчиков дикарбоксилатов с использованием линейки производных субстратов с монотонно увеличивающимся алифатическим заместителем может быть в настоящее время единственным источником информации о структуре их активных центров.

Методический подход, основанный на использовании суспензии высокосопряженных митохондрий в оксиметрической ячейке в качестве бесконтактного биосенсора трансмембранного катионного тока, примененный при изучении 4-х пептидов-пороформеров, можно в перспективе применить для изучения побочных эффектов 10-ти широко используемых в современной медицине пороформеров-антибиотиков и двух десятков пороформеров, которые по данным FDA находятся на второй стадии клинических испытаний. Предложенный подход позволяет выявить калиевую проводимость, индуцированную в митохондриях низкоолигомерной формой аламетицина на фоне проводимости его высокоолигомерных форм в присутствии мембранного потенциала при низких пептид/липидных соотношениях и оценить диаметр поры. Полученные результаты расширяют представление о механизмах возможного токсического действия пептидов-пороформеров и могут учитываться при разработке на их основе препаратов медицинского назначения.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений
- выводы диссертационной работы обоснованы, подтверждены экспериментальными данными и отражают наиболее значимые результаты работы.

Личный вклад соискателя состоит:

в постановке задач диссертационного исследования; в планировании и проведении исследований; в развитии экспериментальных подходов; в получении основных результатов работы либо лично автором, либо под его руководством; анализе и

обсуждении полученных результатов; написании и подготовке материалов к публикациям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Аливердиевой Д.А. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием детального плана исследования, использованием широкого арсенала методов исследования, соответствующих поставленным задачам, большим объемом проведенных исследований, их новизной и практической значимостью. Выводы и положения диссертации, выносимые на защиту, вполне обоснованы и логически вытекают из представленных результатов, что подтверждается публикациями в ведущих рецензируемых журналах (23 статьи). Таким образом, данная работа выполнена на высоком методическом уровне, является актуальной как в области фундаментальных исследований в биохимии и микробиологии, так и для практического применения в биомедицине.

На заседании 06 апреля 2023 года Диссертационный совет принял решение присудить Аливердиевой Динаре Алиевне ученую степень доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человек, из них 11 докторов биологических наук, 9 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в состав совета 24.1.233.01.

«За» присуждения ученой степени – 21

«Против» – нет.

Недействительных бюллетеней нет.

Председатель диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН

доктор химических наук, профессор, академик РАН

В.О. Попов

Ученый секретарь диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН

кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский



06.04.2023