



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2

Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32

www.fbras.ru, info@fbras.ru

06.12.2023

№ 85-01-19/980-1

На №

от



Г
«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. Директора Федерального
государственного учреждения
«Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН
д.б.н. Федоров А.Н.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» на диссертационную работу Аливердиевой Динары Алиевны «Транспортеры дикарбоксилатов и модельные пороформеры в биологических мембранах» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, выполненную в лаборатории биоэнергетики Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН и лаборатории биохимии и биотехнологии Прикаспийского института биологических ресурсов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Дагестанского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Аливердиева Динара Алиевна окончила с отличием Дагестанский государственный университет 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 ИНБИ РАН по специальности 03.01.04. Биохимия (диплом БЛ № 016040), выполненную в лаборатории биоэнергетики (ранее — лаборатории биологического окисления) 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 ДФИЦ РАН в должности м.н.с., н.с., с.н.с., с 2010 г. по настоящее время – ведущего научного сотрудника, заведующего лабораторией. С 2006 по 2019 г. являлась заместителем директора ПИБР ДФИЦ РАН по научной работе.

Диссертационную работу соискатель Аливердиева Д.А. выполняла в лаборатории биоэнергетики Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» и в лаборатории биохимии и биотехнологии Дагестанского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Научный консультант – доктор биологических наук, профессор Звягильская Рената Александровна, главный научный сотрудник лаборатории биоэнергетики Института биохимии им. А.Н. Баха 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.

Актуальность темы. Наряду с неоспоримыми достоинствами методов изучения качественных показателей трансмембранного транспорта на модельных системах (липосомах и бислойных липидных мембранах (БЛМ)) большинство широко используемых прямых методов количественного исследования транспорта обладает рядом неустраненных до настоящего времени недостатков. Изучению количественных параметров мешает гетерогенность фракции мелких бислойных липосом [Schwarz and Robert, 1992], несоответствие нативному липидного окружения переносчика [Tillman and Cascio, 2003] и вероятность неоднородного распределения реконструированного транспортера в гигантских однослойных липосомах

[Walde et al., 2010].

Метод локальной фиксации потенциала (пэтч-кламп) позволяет применять эффекторы только с внутренней стороны биомембраны. При высоком значении K_M для субстрата транспортера может иметь место неспецифическая сорбция на поверхности клеток и удерживание части субстрата в периплазме, искажающие результаты [Benito and Lagunas, 1992]. Преимущества и недостатки существующих методов изучения трансмембранного транспорта обсуждаются [Schmidt et al., 2022; Lovisolo, 2023; Herianto et al., 2024].

Митохондрии печени крысы (МПК) и дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* признаны удобными модельными объектами исследований. Сукцинатоксидазная ферментативная система МПК включает дикарбоксилатный транспортер (ДКТ), сукцинатдегидрогеназный комплекс и убихинол-цитохром с-оксидоредуктазу (далее убихинолоксидазную систему). Причем активность компонентов в этом ряду возрастает. Величина K_M для сукцината у переносчика более чем на порядок превышает величину K_M для сукцината реакции, катализируемой сукцинатдегидрогеназой, т.е. природа «сконструировала» почти идеальную эндогенную сопряженную систему (ЭСС) для измерения в стационарном режиме концентрации сукцината в митохондриях. Поэтому дыхательную цепь можно рассматривать как ЭСС для измерения транспорта сукцината в митохондрии. При изучении транспорта окисляемых субстратов в клетки *S. cerevisiae* в качестве ЭСС могут быть использованы митохондрии этих клеток. Митохондрии защищены от непроникающих в клетку ингибиторов и находятся в среде (цитоплазме) со стабильным рН и ионным составом, благодаря системам гомеостаза клетки. Это позволяет изучать влияние этих внешних эффекторов только на трансплазмалемный транспорт.

В настоящее время в связи с появлением штаммов патогенных микроорганизмов, резистентных к антибиотикам, увеличивается интерес медиков к давно известным лекарственным препаратам – пороформерам, в том числе аламетицину, мелиттину и мастопарану. Несмотря на многочисленные исследования, механизм антимикробного действия пороформеров не ясен. Показано антибактериальное, антигрибковое, антипаразитарное и противоопухолевое действие аламетицина [Torre et al., 2023; Collins et al., 2023], что связывают с порообразующим действием этих пептидов. Мастопаран

предотвращает метастазирование в модельных экспериментах и индуцирует апоптоз опухолевых клеток мочевого пузыря [Ren et al., 2023]. Мелиттин рассматривается как малотоксичный противоопухолевый препарат [Zhang et al., 2016; Pandey et al., 2023], воздействующий на процессы апоптоза, метастазирования, ангиогенеза [Liu et al., 2016]. Показано антимикробное [Huang et al., 2024; Stephani et al., 2024] и нейропротекторное действие мелиттина [Xing et al., 2024]. Мелиттин ингибирует рост устойчивой к метициллину бактерии *Staphylococcus aureus in vitro* и в сочетании с оксациллином эффективен *in vivo* при лечении инфекций, вызванных *S. aureus* [Pereira et al., 2023]. Мелиттин и грамицидин S *in vitro* показали антивирусную активность в отношении SARS-CoV-2 и рассматриваются в качестве потенциальных противовирусных препаратов [Enayathullah et al., 2022]. Одним из нерешенных вопросов в выяснении механизма порообразования является определение концентрационного порядка лимитирующей стадии этого процесса. Необходимо разработать методические подходы для исследования действия пороформеров на митохондрии в присутствии трансмембранного потенциала ($\Delta\psi$).

C₄-дикарбоксилаты играют важную роль в метаболизме эукариот. В частности, сукцинат и L-малат являются интермедиатами цикла Кребса и обеспечивают взаимосвязь между обменом в пероксисомах и митохондриях. Показана важная роль транспортеров дикарбоксилатов (ДКТ) в обменных процессах, связанных с возникновением системных патологий, таких как диабет, ожирение печени, а также онкологических заболеваний [Korol et al., 2021; Akhtar et al., 2022; Selim et al., 2023]. Структура активного центра ДКТ не изучена. В зависимости от возможной ориентации трансмембранные сегменты переносчика могут сформировать как гидрофильный, так и в значительной мере липофильный трансмембранный канал. Степень его липофильности не изучена, так как ни для одного из переносчиков дикарбоксилатов эукариот третичная структура не установлена. Моделирование трехмерной структуры Na⁺-зависимого ДКТ человека – NaDC3 [Schlessinger, et al., 2014] на основе переносчика цитрата и глутамата *Vibrio cholera* [Mancusso et al., 2012] позволило предположить, что точки связывания субстратов и Na⁺ локализуются на противоположных доменах молекулы, что было подтверждено проведенным мутагенезом [Colas et al., 2017].

Показано, что точка связывания субстрата в ДКТ МПК экспонирована в просвет канала [Шольц и соавт., 1990]. Это позволяет использовать для оценки степени липофильности канала ингибиторный анализ транспорта с помощью серии алкильных и ацильных производных субстрата разной длины [Sholtz et al., 1993; Бондаренко и соавт., 1996]. Для этой оценки необходимо было отработать или усовершенствовать методы исследования взаимодействия этих амфифильных соединений с митохондриями и клетками без потери интактности ЭСС.

До проведенных исследований представления о транспорте дикарбоксилатов через плазмалемму *S. cerevisiae* были противоречивыми, а его механизм не изучен. Вопрос о существовании возможного транспортера дикарбоксилатов в плазмалемме *S. cerevisiae* оставался нерешенным из-за отсутствия метода измерения низких активностей окисления сукцината и L-малата на фоне активного эндогенного дыхания.

Представляется актуальным изучение структуры и свойств дикарбоксилатных транспортеров и механизмов порообразования модельных пороформеров. А перечисленные преимущества интактных митохондрий и клеток делают перспективным предлагаемое направление – использование ЭСС в количественном изучении трансмембранного транспорта.

Цель работы – изучение особенностей порообразования пептидными индукторами катионной проницаемости с использованием митохондрий печени крысы, а также изучение свойств, кинетических параметров и структуры активного центра нативного транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы дрожжей *S. cerevisiae*.

Научная новизна работы. Получены новые данные, характеризующие первые этапы порообразования для мелиттина, мастопарана и аламетицина в МПК, генерирующих $\Delta\psi$. Показана возможность использования суспензии высокосопряженных митохондрий в оксиметрической ячейке в качестве бесконтактного биосенсора трансмембранного катионного тока, индуцированного пептидами-пороформерами. Доказано, что проводимость, индуцированная во внутренней мембране митохондрий печени крысы, и степень активации окисления ими сукцината связаны линейной зависимостью. Показано, что с помощью такого подхода можно измерить стационарную калиевую проводимость, индуцированную в митохондриях низкоолигомерной

формой аламетицина на фоне проводимости его высокоолигомерных форм при генерации $\Delta\psi$, в условиях низких пептид/липид соотношений и оценить диаметр поры. Определено соотношение степеней активации дыхания аламетицином, мелиттином или мастопараном в монокалийевой и монолитиевой средах при одинаковом значении $\Delta\psi$. Высказано предположение о том, что в присутствии аламетицина и тетраацетилмелиттина проводимость лимитируются реакцией образования поры, а в присутствии мелиттина или мастопарана – стадией, предшествующей порообразованию. На основании обобщения многолетнего экспериментального материала разработана методология использования амфифильных эффекторов и изучения нативных транспортеров в интактных системах, методы измерения кинетических параметров интактных переносчиков *in situ*, основанные на использовании эндогенных систем окисления субстратов в качестве сопряженных систем измерения транспорта этих соединений. Подобраны условия, при которых митохондрии в клетках *S. cerevisiae* могут служить ЭСС для измерения стационарных скоростей транспорта сукцината и пирувата через плазмалемму. 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 уникальными и нетипичными для плазмалеммы грибов свойствами: широкой субстратной специфичностью, оптимумом в области щелочных значений pH, pH-зависимым модулированием транспорта однозарядными катионами; механизм транспорта – неэлектрогенный унипорт. Впервые с помощью непроникающих в клетку конкурентных ингибиторов 2-алкилмалонатов изучена структура канала транспортера вблизи точки связывания субстрата. Скорректированы модели трехмерных структур переносчика дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* и ДКТ МПК с разным механизмом функционирования.

Практическая значимость. Научно-практическую ценность имеют разработанные или усовершенствованные методы использования амфифильных эффекторов и методология изучения нативных транспортеров в интактных системах. Методы, разработанные при изучении транспортера *S. cerevisiae*, применимы для изучения и поиска малоактивных переносчиков окисляемых субстратов дрожжей. Проведенное автором зондирование активных центров переносчиков дикарбоксилатов с использованием линейки производных

субстратов с монотонно увеличивающимся алифатическим заместителем в отсутствие рентгеноструктурных данных о третичной структуре транспортеров дикарбоксилатов является в настоящее время единственным источником детальной 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 автором при изучении четырех 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 (Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств) находятся на второй стадии клинических испытаний. Эффективность использованного подхода подтверждена возможностью измерения стационарной калиевой проводимости, индуцированной в митохондриях низкоолигомерной формой аламетицина на фоне проводимости его высокоолигомерных форм при генерации $\Delta\psi$ при низких пептид/липидных соотношениях и оценки диаметра поры. Полученные результаты расширяют представление о механизмах возможного токсического действия пептидов-пороформеров и должны учитываться при разработке на их основе препаратов медицинского назначения.

Методология и методы исследования. Работа выполнена с привлечением комплекса методов молекулярной биологии (ПЦР, секвенирование, молекулярное кариотипирование), микробиологии (культивирование микроорганизмов, микроскопия), биохимии (спектрофотометрия, флуорометрия, амперометрия). В процессе работы были также использованы методы ферментативной кинетики и молекулярного моделирования. Многие из используемых методов были разработаны или оптимизированы в лаборатории при непосредственном участии соискателя.

Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов обусловлена репрезентативным объемом экспериментального материала, подтверждается воспроизводимостью результатов, полученных разными методами, соответствующим поставленным задачам.

Личный вклад соискателя заключался в выборе направления исследований, постановке задач, разработке и развитии новых методических

подходов, анализе и обобщении экспериментальных данных, полученных лично автором или при его непосредственном участии, а также в подготовке и оформлении материалов научных публикаций, в т.ч. при выполнении под его руководством работ по проектам РФФИ

Апробация работы. Результаты и основные положения диссертации доложены и обсуждены на 25 российских и международных конференциях, конгрессах и симпозиумах, в том числе, Симпозиуме ESF-EMBO «Comparative genomics of eukaryotic microorganisms. Eucaryotic genome evolution, approaches with yeasts and fungi» (Испания, 2005), III-м и IV-м Съездах Общества биохимиков и молекулярных биологов России (2002 и 2008), Московских международных научных конференциях «Биотехнология – окружающей среде» (Москва, 2004, 2005 и 2006), Московском Международном конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2009), 2-м Международном конгрессе Биотехнология – 2011 (Филадельфия, США), IV-й международной конференции Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2011 (Испания, 2011), V-ой международной конференции Environmental, Industrial and Applied Microbiology BioMicroWorld2013 (Испания, 2013), 27-ой конференции FEBS/PABMB (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 (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), Всероссийской конференции «Теоретические и практические аспекты действия естественной и искусственной гипотермии на организм» (Махачкала, 2023).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 47 работ, в т.ч. 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 в 5 статьях, включенных в книги зарубежных издательств, в т.ч. в качестве глав: “Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology” выпущенной издательством “Formatex Research

Center”, Spain, 2010; “Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges”, издательством World Scientific Publishing Co., USA, UK, 2012, “Industrial, medical and environmental applications of microorganisms. Current status and trends”, издательством Wageningen Academic Publishers, the Netherlands, 2014, "Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms", издательством BrownWalker Press, 2016.

Работа была поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№№ 04-04-49670а, 07-04-00225а (рук. Д.А. Аливердиева), 06-04-03078б, 07-04-05024б, 08-04-05002б (рук. член-корреспондент РАН М-Р.Д. Магомедов).

Место проведения работы. Работа проводилась в лаборатории биоэнергетики Института биохимии им. А.Н. Баха РАН и в лаборатории биохимии и биотехнологии ПИБР ДФИЦ РАН.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, трех основных глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение), заключения, выводов, и списка литературы, изложена на 271 страницах машинописного текста и содержит 60 рисунков, 9 таблиц и 465 источников литературы.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем учёной степени.

Статьи в рецензируемых изданиях, индексируемых в Web of Science или Scopus. :

1. 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.

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

3. 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.

4. **Аливердиева Д.А.** Сравнительное изучение некоторых параметров энергетического обмена двух штаммов *Saccharomyces cerevisiae* // **Прикладная биохимия и микробиология.** – 2001. – Т. 37, № 1. – С. 90-96.
5. 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.
6. **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.
7. **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.
8. 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.
9. **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.
10. **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.
11. **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.
12. **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.
13. **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.

14. **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.

15. **Aliverdieva D.A.,** Mamaev D.V., Snezhkova L.G., 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.

16. 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.

17. 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.

18. **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. doi:10.15379/2410-1869.2015.02.01.1.

19. 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.

20. 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.

21. **Aliverdieva D.A.,** Durzhinskaya M.H., Snezhkova 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. doi.: 10.15379/2410-1869.2019.06.02.01.

22. 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.

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

24. Rogov A.G., Goleva T.N., **Aliverdieva D.A.**, Zvyagilskaya R.A. SkQ3 exhibits the most pronounced antioxidant effect on isolated rat liver mitochondria and yeast cells. // **Int. J. Mol. Sci.** – 2024. – V.25, Iss.1. 1107. doi.org/10.3390/ijms25021107. eCollection 2024.

Главы и статьи в книгах:

1. **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.

2. **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.

3. **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.

4. **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.

5. **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.

Патенты:

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. Патент РФ № 2084519, Гос. реестр изобретений РФ, 20.07.1997 // Бюл. № 20., 1997.

2. Халилова Э.А., Исламмагомедова Э.А., Абакарова А.А., **Аливердиева Д.А.** Питательная среда для культивирования дрожжей *Saccharomyces*. Патент РФ № 2804446. Гос. реестр изобретений РФ, 29.09. 2023 // Бюл. № 28, 2023.

Избранные публикации в материалах конференций:

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. **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В., Бондаренко Д.И., Шольц К.Ф. Роль дикарбоксилатного транспортера плазматической мембраны *Saccharomyces cerevisiae*. // Материалы III съезда Биохимического общества, Санкт-Петербург, 26 июня – 2 июля 2002. – С. 237-238.

3. **Аливердиева Д.А.** Определение содержания общего белка в концентрированных суспензиях митохондрий. // Тезисы второй международной научной конференции «Биотехнология – окружающей среде», Москва, 25-27 мая 2004 г. // Научные труды международного биотехнологического центра МГУ, 2004. – С. 93.

4. **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.

5. **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.

6. Mamaev D.V., **Aliverdieva D.A.**, Bondarenko D.V., Sholtz K.F. Inhibitory analysis of the rat liver mitochondrial dicarboxylate transporter by means of

lipophilic derivatives of substrates. // 14th European Bioenergetics Conference. Moscow, 22 – 27 July, 2006. // **Biochim. Biophys. Acta. Bioenergetics**. EBEC Short reports. – 2006 – Suppl.V. 14. – P. 325.

7. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V., Bondarenko D.V., Sholtz K.F., Zvyagil'skaya R.A. 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.

8. **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.

9. **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.

10. **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.

11. **Aliverdieva D.A.** A mitochondrial biosensor for studies of rate-limiting step of pore formation by alamethicin. Abstracts. 2nd World Congress on Biotechnology, Philadelphia, USA, 29 November – 1 December 2011 // **J. Microbial. Biochem. Technol.** – 2011. V. 3, Iss. 6. – P. 72.

12. **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.

13. **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.

14. Дуржинская М.Х., Аливердиева Д.А., Мамаев Д.В. Пороформирующие антимикробные пептиды и митохондрии: тест на токсичность. // Научные труды II Объединенного научного форума, VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России, IX Российский симпозиум «Белки и пептиды». Сочи, Дагомыс, 1 – 6 октября 2019 г. // *Acta Naturae*. – Т.2. – С.137.

15. Дуржинская 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 Съезд биохимиков России, X Российский симпозиум «Белки и пептиды», VII Съезд физиологов СНГ. Сочи, Дагомыс, 3 – 8 октября 2021 г. – Т.2. – С.142-143.

16. Аливердиева Д.А. Антимикробные пороформирующие полипептиды: механизм действия на митохондрии, перспективы клинического применения. // Тезисы докладов II Всероссийской конференции с международным участием «Теоретические и практические аспекты действия естественной и искусственной гипотермии на организм», Махачкала, 27-30 сентября 2023 г. – С. 70-71.

Рекомендуемые оппоненты:

Шугаев Александр Григорьевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева Российской академии наук, лаборатория дыхания растений и механизмов его регуляции, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией.

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.

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

Рекомендуемая ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

Диссертация «Транспортеры дикарбоксилатов и модельные пороформеры в биологических мембранах» Аливердиевой Динары Алиевны на основании проведенного семинара рекомендуется к защите на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Заключение принято на заседании совместного семинара лабораторий биоэнергетики, биохимии стрессов микроорганизмов, биохимии азотфиксации и метаболизма азота, экологической и эволюционной биохимии, иммунобиохимии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» путем открытого голосования. Присутствовало на семинаре 20 человек. Результаты голосования: «за» – 20 человек, «против» - нет, «воздержалось» - нет. Протокол №1 от 29 ноября 2023 г.

Председатель совместного семинара лабораторий
заведующий лабораторией
биохимии азотфиксации и метаболизма азота,
профессор, доктор биологических наук

 А.Ф.Топунов

Секретарь совместного семинара лабораторий
заведующий лабораторией
биохимии стрессов микроорганизмов,
доктор биологических наук

Подпись Топунов А.Ф.
ЗАВЕРЯЕТСЯ
Заведующий канцелярией
«06» 12 2023 г.



 М.О. Шлеева

Подпись Шлеева М.О.
ЗАВЕРЯЕТСЯ
Заведующий канцелярией
«06» 12 2023 г.

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

**ДАГЕСТАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

367000, г. Махачкала, ул. М. Гаджиева, 45
тел. (8722) 67-06-20, 67-49-65
факс (8722) 67-49-65
e-mail: dncran@mail.ru

27.12.23г. № 17200-1489

На № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Дагестанского
федерального исследовательского
центра Российской академии наук
член-корреспондент РАН



А.К. Муртазаев

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Дагестанского федерального исследовательского центра Российской академии наук на диссертационную работу Аливердиевой Динары Алиевны «Транспортеры дикарбоксилатов и модельные пороформеры в биологических мембранах» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, выполненную в лаборатории биоэнергетики Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» и лаборатории биохимии и биотехнологии Прикаспийского института биологических ресурсов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Дагестанского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Аливердиева Динара Алиевна окончила с отличием Дагестанский государственный университет 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 ИНБИ РАН по специальности 03.01.04. Биохимия (диплом БЛ № 016040), выполненную в лаборатории биоэнергетики (ранее - лаборатории биологического окисления) 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 ДФИЦ РАН в должности м.н.с., н.с., с.н.с., с 2010 г. по настоящее время – ведущего научного сотрудника, заведующего лабораторией. С 2006 по 2019 г. являлась заместителем директора ПИБР ДФИЦ РАН по научной работе.

Научный консультант – доктор биологических наук, профессор Звягильская Рената Александровна, главный научный сотрудник лаборатории биоэнергетики Института биохимии им. А.Н. Баха 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.

Актуальность темы. Наряду с неоспоримыми достоинствами методов изучения качественных показателей трансмембранного транспорта на модельных системах (липосомах и бислойных липидных мембранах (БЛМ)) большинство широко используемых прямых методов количественного исследования транспорта обладает рядом неустранимых до настоящего времени недостатков. Изучению количественных параметров мешает гетерогенность фракции мелких бислойных липосом [Schwarz and Robert, 1992], несоответствие нативному липидному окружению переносчика [Tillman and Cascio, 2003] и вероятность неоднородного распределения реконструированного транспортера в гигантских однослойных липосомах [Walde et al., 2010]. Метод локальной фиксации потенциала (пэтч-кламп) позволяет применять эффекторы только с внутренней стороны биомембраны. При высоком значении K_M для субстрата транспортера может иметь место неспецифическая сорбция на поверхности клеток и удерживание части субстрата в периплазме, искажающие результаты [Benito and Lagunas, 1992]. Преимущества и недостатки существующих методов изучения

трансмембранного транспорта обсуждаются [Herianto et al., 2024]. Митохондрии печени крысы и дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* признаны удобными модельными объектами исследований. Сукцинатоксидазная ферментативная система МПК включает дикарбоксилатный транспортер (ДКТ), сукцинатдегидрогеназный комплекс и убихинол-цитохром с-оксидоредуктазу (далее убихинолоксидазную систему). Причем активность компонентов в этом ряду возрастает. Величина K_M для сукцината у переносчика более чем на порядок превышает величину K_M для сукцината реакции, катализируемой сукцинатдегидрогеназой, т.е. природа «сконструировала» почти идеальную эндогенную сопряженную систему (ЭСС) для измерения в стационарном режиме концентрации сукцината в митохондриях. Поэтому дыхательную цепь можно рассматривать как ЭСС для измерения транспорта сукцината в митохондрии. При изучении транспорта окисляемых субстратов в клетки *S. cerevisiae* в качестве ЭСС могут быть использованы митохондрии этих клеток.

В настоящее время в связи с появлением штаммов патогенных микроорганизмов, резистентных к антибиотикам, увеличивается интерес медиков к давно известным лекарственным препаратам – пороформерам, в том числе аламетицину, мелиттину и мастопарану. Несмотря на многочисленные исследования, механизм антимикробного действия пороформеров не ясен. Мастопаран предотвращает метастазирование в модельных экспериментах и индуцирует апоптоз опухолевых клеток мочевого пузыря [Ren et al., 2023]. Мелиттин рассматривается как малотоксичный противоопухолевый препарат [Pandey et al., 2023], воздействующий на процессы апоптоза, метастазирования, ангиогенеза [Liu et al., 2016]. Показано антимикробное и нейропротекторное действие мелиттина [Xing et al., 2024]. Мелиттин ингибирует рост устойчивой к метициллину бактерии *Staphylococcus aureus in vitro* и в сочетании с оксациллином эффективен *in vivo* при лечении инфекций, вызванных *S. aureus* [Pereira et al., 2023]. Мелиттин и грамицидин *S in vitro* показали антивирусную активность в отношении SARS-CoV-2 и рассматриваются в качестве потенциальных противовирусных препаратов [Enayathullah et al., 2022]. Необходимо разработать методические подходы для исследования

действия пороформеров на митохондрии в присутствии трансмембранного потенциала ($\Delta\psi$).

S_4 -дикарбоксилаты играют важную роль в метаболизме эукариот. В частности, сукцинат и L-малат являются интермедиатами цикла Кребса и обеспечивают взаимосвязь между обменом в пероксисомах и митохондриях. Структура активного центра ДКТ не изучена. В зависимости от возможной ориентации трансмембранные сегменты переносчика могут сформировать как гидрофильный, так и в значительной мере липофильный трансмембранный канал. Степень его липофильности не изучена, так как ни для одного из переносчиков дикарбоксилатов эукариот третичная структура не установлена. Моделирование трехмерной структуры Na^+ -зависимого ДКТ человека – NaDC3 [Schlessinger, et al., 2014] на основе переносчика цитрата и глутамата *Vibrio cholera* [Mancusso et al., 2012] позволило предположить, что точки связывания субстратов и Na^+ локализуются на противоположных доменах молекулы, что было подтверждено мутагенезом [Colas et al., 2017].

До исследований, проведенных в данной работе, представления о транспорте дикарбоксилатов через плазмалемму *S. cerevisiae* были противоречивыми, а его механизм не изучен. Вопрос о существовании возможного транспортера дикарбоксилатов в плазмалемме *S. cerevisiae* оставался нерешенным из-за отсутствия метода измерения низких активностей окисления сукцината и L-малата на фоне активного эндогенного дыхания. Представляется актуальным изучение структуры и свойств дикарбоксилатных транспортеров и механизмов порообразования модельных пороформеров. А перечисленные преимущества интактных митохондрий и клеток делают перспективным предлагаемое направление – использование ЭСС в количественном изучении трансмембранного транспорта.

Цель работы – изучение особенностей порообразования пептидными индукторами катионной проницаемости с использованием митохондрий печени крысы, а также изучение свойств, кинетических параметров и структуры активного центра нативного транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы дрожжей *S. cerevisiae*.

Научная новизна работы. Получены новые данные, характеризующие первые этапы порообразования для мелиттина, мастопарана и аламетицина в МПК, генерирующих $\Delta\psi$. Показана

возможность использования суспензии высокосопряженных митохондрий в оксиметрической ячейке в качестве бесконтактного биосенсора трансмембранного катионного тока, индуцированного пептидами-пороформерами. Доказано, что проводимость, индуцированная во внутренней мембране митохондрий печени крысы, и степень активации окисления ими сукцината связаны линейной зависимостью. Показано, что с помощью такого подхода можно измерить стационарную калиевую проводимость, индуцированную в митохондриях низкоолигомерной формой аламетицина на фоне проводимости его высокоолигомерных форм при генерации $\Delta\psi$, в условиях низких пептид/липид соотношений и оценить диаметр поры. Определено соотношение степеней активации дыхания аламетицином, мелиттином или мастопараном в монокалиевой и монолитиевой средах при одинаковом значении $\Delta\psi$. Высказано предположение о том, что в присутствии аламетицина и тетраацетилмелиттина проводимость лимитируются реакцией образования поры, а в присутствии мелиттина или мастопарана – стадией, предшествующей порообразованию. На основании обобщения многолетнего экспериментального материала разработана методология использования амфифильных эффекторов и изучения нативных транспортеров в интактных системах, методы измерения кинетических параметров интактных переносчиков *in situ*, основанные на использовании эндогенных систем окисления субстратов в качестве сопряженных систем измерения транспорта этих соединений. Подобраны условия, при которых митохондрии в клетках *S. cerevisiae* могут служить ЭСС для измерения стационарных скоростей транспорта сукцината и пирувата через плазмалемму. Показано, что в диапазоне от pH 5,5 до pH 7,5, транспорт сукцината через плазмалемму *S. cerevisiae* опосредован O-пальмитоил-L-малат чувствительным транспортером с уникальными и нетипичными для плазмалеммы грибов свойствами: широкой субстратной специфичностью, оптимумом в области щелочных значений pH, pH-зависимым модулированием транспорта однозарядными катионами; механизм транспорта – неэлектрогенный унипорт. Впервые с помощью непроникающих в клетку конкурентных ингибиторов 2-алкилмалонатов изучена структура канала транспортера вблизи точки связывания субстрата. Скорректированы модели трехмерных структур

переносчика дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* и ДКТ МПК с разным механизмом функционирования.

Практическая значимость. Научно-практическую ценность имеют разработанные или усовершенствованные методы использования амфифильных эффекторов и методология изучения нативных транспортеров в интактных системах. Методы, разработанные при изучении транспортера *S. cerevisiae*, применимы для изучения и поиска малоактивных переносчиков окисляемых субстратов дрожжей. Проведенное в работе зондирование активных центров переносчиков дикарбоксилатов с использованием линейки производных субстратов с монотонно увеличивающимся алифатическим заместителем в отсутствие рентгеноструктурных данных о третичной структуре транспортеров дикарбоксилатов является в настоящее время единственным источником детальной 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 в работе при изучении четырех 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 (Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств) находятся на второй стадии клинических испытаний. Эффективность использованного подхода подтверждена возможностью измерения стационарной калиевой проводимости, индуцированной в митохондриях низкоолигомерной формой аламетицина на фоне проводимости его высокоолигомерных форм при генерации $\Delta\psi$ при низких пептид/липидных соотношениях и оценки диаметра поры. Полученные результаты расширяют представление о механизмах возможного токсического действия пептидов-пороформеров и должны учитываться при разработке на их основе препаратов медицинского назначения.

Личный вклад соискателя заключался в выборе направления исследований, постановке задач, разработке и развитии новых методических подходов, анализе и обобщении экспериментальных данных, полученных лично автором или при его непосредственном участии, а также в подготовке

и оформлении материалов научных публикаций, в т.ч. при выполнении под его руководством работ по проектам РФФИ.

Апробация работы. Результаты и основные положения диссертации доложены и обсуждены на 25 российских и международных конференциях, конгрессах и симпозиумах, в том числе, 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), 2-м Международном конгрессе Биотехнология – 2011 (Филадельфия, США), 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), Всероссийской конференции с международным участием «Теоретические и практические аспекты действия естественной и искусственной гипотермии на организм» (Махачкала, 2023).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 47 работ, в т.ч. 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 в 5 статьях, включенных в книги зарубежных издательств, в т.ч. в качестве глав.

Работа была поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№№ 04-04-49670а, 07-04-00225а (рук. Д.А. Аливердиева), 06-04-03078б, 07-04-05024б, 08-04-05002б (рук. член-корреспондент РАН. М-Р.Д. Магомедов)).

Место проведения работы. Работа проводилась в лаборатории биоэнергетики Института биохимии им. А.Н. Баха РАН и в лаборатории биохимии и биотехнологии ПИБР ДФИЦ РАН.

Степень достоверности результатов проведённых соискателем учёной степени исследований. Выводы диссертации Аливердиевой Д.А. обоснованы и подтверждены экспериментальными данными. Достоверность результатов не вызывает сомнений.

Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендуется к защите. Содержание диссертационной работы и опубликованные по ее результатам материалы соответствуют специальности 1.5.4. Биохимия.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, трех основных глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение), заключения, выводов, и списка литературы, изложена на 271 странице машинописного текста и содержит 60 рисунков, 9 таблиц и 465 источников литературы.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем учёной степени.

Статьи в рецензируемых изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus:

1. 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.

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

3. 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.

4. Аливердиева Д.А. Сравнительное изучение некоторых параметров энергетического обмена двух штаммов *Saccharomyces cerevisiae* // **Прикладная биохимия и микробиология.** – 2001. – Т. 37, № 1. – С. 90-96.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Аливердиева Д.А., Мамаев Д.В., Лагутина Л.С. Транспорт сукцината в клетки *Saccharomyces cerevisiae* после продолжительной холодной преинкубации // **Прикладная биохимия и микробиология.** – 2009. – Т. 45, № 5. – С. 577-485.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. 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.

18. 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. doi:10.15379/2410-1869.2015.02.01.1.

19. 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.

20. 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.

21. Aliverdieva D.A., Durzhinskaya M.H., Snezhkova 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. doi.: 10.15379/2410-1869.2019.06.02.01.

22. 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.

23. Rogov A. G., Goleva T. N., Suchanova E.I., Ovchenkova A.P., Aliverdieva D.A., Zvyagilskaya R.A. Mitochondrial disfunctions may be one of the major causative factors underlying detrimental effects of benzalkonium

chloride // **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. – 2020:8956504. doi: 10.1155/2020/8956504. eCollection 2020.

24. Rogov A.G., Goleva T.N., **Aliverdieva D.A.**, Zvyagil'skaya R.A. SkQ3 exhibits the most pronounced antioxidant effect on isolated rat liver mitochondria and yeast cells. // **Int. J. Mol. Sci.** – 2024. – V.25, Iss.1 (принята в печать) eCollection 2024.

Патенты:

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. Патент РФ № 2084519, Гос. реестр изобретений РФ, 20.07.1997 // Бюл. № 20., 1997.

2. Халилова Э.А., Исламмагомедова Э.А., Абакарова А.А., **Аливердиева Д.А.** Питательная среда для культивирования дрожжей *Saccharomyces*. Патент РФ № 2804446. Гос. реестр изобретений РФ, 29.09.2023 // Бюл. № 28, 2023.

Главы и статьи в книгах:

1. **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.

2. **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.

3. **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.

4. **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.

5. **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.

Избранные публикации в материалах конференций:

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. **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В., Бондаренко Д.И., Шольц К.Ф. Роль дикарбоксилатного транспортера плазматической мембраны *Saccharomyces cerevisiae*. // Материалы III съезда Биохимического общества, Санкт-Петербург, 26 июня – 2 июля 2002. – С. 237-238.

3. **Аливердиева Д.А.** Определение содержания общего белка в концентрированных суспензиях митохондрий. // Тезисы второй международной научной конференции «Биотехнология – окружающей среде», Москва, 25-27 мая 2004 г. // Научные труды международного биотехнологического центра МГУ, 2004. – С. 93.

4. **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.

5. **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.

6. Mamaev D.V., **Aliverdieva D.A.**, Bondarenko D.V., Sholtz K.F. Inhibitory analysis of the rat liver mitochondrial dicarboxylate transporter by means of lipophilic derivatives of substrates. // 14th European Bioenergetics Conference. Moscow, 22 – 27 July, 2006. // **Biochim. Biophys. Acta. Bioenergetics**. EBEC Short reports. – 2006 – Suppl.V. 14. – P. 325.

7. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V., Bondarenko D.V., Sholtz K.F., Zvyagilskaya R.A. 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.

8. **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.

9. **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.

10. **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.

11. **Aliverdieva D.A.** A mitochondrial biosensor for studies of rate-limiting step of pore formation by alamethicin. Abstracts. 2nd World Congress on Biotechnology, Philadelphia, USA, 29 November – 1 December 2011 // **J. Microbial. Biochem. Technol.** – 2011. V. 3, Iss. 6. – P. 72.

12. **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.

13. **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.

14. Дуржинская М.Х., **Аливердиева Д.А.,** Мамаев Д.В. Пороформирующие антимикробные пептиды и митохондрии: тест на токсичность. // Научные труды II Объединенного научного форума, VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России, IX Российский симпозиум «Белки и пептиды». Сочи, Дагомыс, 1 – 6 октября 2019 г. // **Acta Naturae.** – Т.2. – С.137.

15. Дуржинская 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 Съезд биохимиков России, X Российский симпозиум «Белки и пептиды», VII Съезд физиологов СНГ. Сочи, Дагомыс, 3 – 8 октября 2021 г. – Т.2. – С.142-143.

16. **Аливердиева Д.А.** Антимикробные пороформирующие полипептиды: механизм действия на митохондрии, перспективы клинического применения. // Тезисы докладов II Всероссийской конференции с международным участием «Теоретические и практические аспекты действия естественной и искусственной гипотермии на организм», Махачкала, 27-30 сентября 2023 г. – С. 70-71.

Рекомендуемые оппоненты:

Шугаев Александр Григорьевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева Российской академии наук, лаборатория дыхания растений и механизмов его регуляции, заведующий лабораторией.

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.

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

Рекомендуемая ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

Диссертация «Транспортеры дикарбоксилатов и модельные пороформеры в биологических мембранах» Аливердиевой Динары Алиевны на основании проведенного семинара рекомендуется к защите на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Заключение принято на заседании совместного семинара лабораторий биохимии и биотехнологии, экологии животных, морской биологии,

почвенных и растительных ресурсов, группы экологической биофизики Прикаспийского института биологических ресурсов Дагестанского федерального исследовательского центра Российской академии наук путем открытого голосования. Присутствовало на семинаре 25 человек. Результаты голосования: «за» – 25 человек, «против» – нет, «воздержалось» – нет. Протокол №1 от 20 декабря 2023 г.

Председатель совместного семинара лабораторий

Главный научный сотрудник
лаборатории экологии животных
ПИБР ДФИЦ РАН,
член-корреспондент РАН

М-Р.Д. Магомедов

Секретарь

старший научный сотрудник
лаборатории биохимии и биотехнологии
кандидат биологических наук

З.К. Бахмулаева

