

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Епремяна Хорена Хачатуровича «**Первые модели дрожжей *Yarrowia Lipolytica*, экспрессирующие белок вируса гепатита В HBV и амилоид Aβ42: изменения в морфологии и функциях митохондрий**», представленную в диссертационный совет 24.1.233.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность. Активные формы кислорода (АФК) образуются во всех типах про- и эукариотических клеток. Они играют важную роль в регуляции биологических процессов, сигнальных каскадов, а нарушение скоростей их продукции или нейтрализации может приводить к явлению, обозначаемому как окислительный стресс. Повышение уровней продукции АФК может приводить к окислительному повреждению биологических макромолекул: ДНК, белков и липидов, что нарушает биологические процессы в клетке и может приводить к ее гибели. Известно, что окислительный стресс является одним из основных факторов развития патологий печени при вирусных гепатитах В и С, так как уровни его маркеров коррелируют с уровнем воспаления в печени, скоростью развития фиброза и появлением гепатоцеллюлярной карциномы и прогрессией вирус-ассоциированного рака печени. Все это делает крайне актуальным первый объект исследования – белок HBV вируса гепатита В, который, как считается, является мультифункциональным регулятором различных процессов в инфицированной клетке. Хотя в литературе имеются данные о том, что белок HBV способен взаимодействовать с митохондриями и вызывать окислительный стресс, противоположные результаты также имеются. Более того, нет понимания о механизмах усиления продукции АФК белком HBV вируса гепатита В.

Другим объектом исследования являлся пептид амилоид АВ42. Хотя механизмы развития болезни Альцгеймера до сих пор во многом не известны, считается, что этот пептид является основным индуктором бляшек. Крайне немногочисленные работы предлагают, что в патогенезе болезни Альцгеймера тоже играют роль активные формы кислорода, однако механизмы их усиления также во многом не известны. Все это делает крайне актуальным исследование влияния амилоида на митохондрии и их биоэнергетический профиль

Новизна и научная значимость.

Диссертационная работы Х.Х. Епремяна вносит большой вклад в понимание механизмов патогенеза вируса гепатита В и болезни Альцгеймера, так как в ней в модели гиперэкспрессии в клетках дрожжей показано, что и белок НВх, и пептид амилоид вызывают фрагментацию митохондрий и усиливают продукцию активных форм кислорода. Более того, оба белка, как показано диссертантом, вызывают дисфункцию митохондрий и снижают степень сопряженности дыхания и окислительного фосфорилирования, что в конечном итоге способствует гибели клеток. Наконец, одним из наиболее значимых положений диссертации является то, что и уровень окислительного стресса, и фрагментации митохондрий можно снизить обработкой митохондриально-направленного антиоксиданта семейства SkQ – SkQThy. Это открывает возможности к созданию подходов терапии болезни Альцгеймера и заболеваний печени при хроническом гепатите В.

По результатам работы опубликовано 3 статьи в российских и международных рецензируемых научных журналах: Биохимия, Microorganisms и International Journal of Molecular Sciences. Кроме того, диссертация была опробирована на трех конференциях и научных школах.

Структура диссертации. Диссертация построена по классическому плану и содержит следующие разделы: Список сокращений, Введение, в котором ясно сформулированы цели и задачи исследования, Обзор

литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Выводы, Заключение и список литературы. Работа изложена на 113 страницах и включает 29 рисунков, список цитируемой литературы состоит из 307 наименований. Материал диссертации изложен очень подробно, логично и связно, все выводы подтверждены результатами экспериментов, приведенными на рисунках.

Раздел "Обзор литературы" состоит из трех частей, необходимых для понимания диссертационной работы. В первой части литературного обзора рассматриваются основные положения о роли митохондрий в продукции активных форм кислорода, функциях АФК и о митохондриально-направленных антиоксидантах. Во втором подразделе диссертант приводит основную информацию о взаимосвязи вируса гепатита В и его белка НВх в возникновении гепатоцеллюлярной карциномы – вида рака, который в основном связан с гепатитами В и С. Кроме того, в этом же подразделе приводятся данные о влиянии НВх на продукцию АФК в клетке. В третьем подразделе обзора литературы представлены основные сведения о болезни Альцгеймера, роли в ее развитии амилоида Аβ42 и тау-пептида, а также митохондрий. Эта информация дает читателю понимание места диссертационной работы в исследуемой области. Замечаний к разделу нет.

В главе «Материалы и методы» детально описаны все использованные в работе материалы и их источники, даны методики работы с дрожжами, крайне подробно описаны методы выделения и исследования различных параметров митохондрий (структуры, дыхательной активности, потенциала, продукции активных форм кислорода). Наконец, в разделе описаны и применяемые диссертантом методы статистического анализа данных, чего часто нет в диссертационных работах. Полнота и понятность изложения методик делает эксперименты полностью воспроизводимыми, а их технические условия понятными.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из двух подразделов, посвященных белку НВх вируса гепатита В и пептиду амилоиду. В первом

продемонстрировано, что белок HBx, но не его делеционная форма вызывает фрагментацию митохондрий в клетках дрожжей *Yarrowia lipolytica*, усиливает продукцию супероксид-аниона и, главное, чувствительности клеток к прооксидантам (на примере трет-бутилгидропероксида). Кроме того, показано, что экспрессия HBx приводит к набуханию митохондрий, к снижению их респираторной активности и, главное, сопряженности дыхания с синтезом АТФ. Диссертант представил и данные о том, что этот белок вируса гепатита В не влияет на активность респираторных комплексов I и III. Наконец, в работе продемонстрировано, что все эти нарушения можно ослабить/предотвратить обработкой клеток митохондриально-направленным антиоксидантом SkQThy.

Второй подраздел «Результатов и обсуждения» показывает сходное исследование для пептида амилоида. Как и в случае белка HBx, он нарушает митохондриальную сеть, ингибирует дыхательную активность митохондрий и усиливает продукцию супероксид-анионов в клетках. Кроме того, продемонстрировано, что амилоид разобщает митохондрии. Еще одним отличием амилоида от белка HBx вируса гепатита С является способность первого усиливать продукцию пероксида водорода митохондриями.

В разделах «Заключение» и «Выводы» кратко суммированы полученные в работе научные результаты.

Заключение. Диссертационная работа Х.Х. Епремяна выполнена на очень высоком научном и техническом уровне. Она существенно расширяет представления о роли двух белков, играющих роль в развитии болезни Альцгеймера и патологии печени при хроническом гепатите В, в нарушении функций митохондрий и усилении продукции активных форм кислорода. Работа очень логично выстроена. Достоверность всех представленных результатов полностью подтверждается представленными экспериментальными данными и наличием всех необходимых контролей. Выводы работы соответствуют ее результатам, публикации и автореферат

отражают основное содержание диссертации и выносимые на защиту положения.

По сути работы замечаний нет, есть скорее вопросы, касающиеся результатов и отчасти формы их представления:

1. На рисунке 13 показаны гистограммы окрашивания клеток супероксид анион-чувствительным красителем дигидроксиэтидием (DHE) с анализом проточной цитометрией, а также результаты обработки данных. Однако они представляют процент клеток в гейте, положительном на DHE (и отрицательном на краситель нежизнеспособных клеток Sytox Green). Автор сравнивает процент клеток с признаками окислительного стресса в отсутствии нормальных клетках и в клетках, гиперэкспрессирующих белок HBx в отсутствие и в присутствии митохондриально-направленного антиоксиданта. А был ли проведен анализ изменений общего уровня флуоресценции DHE в популяции? И было ли проведено сравнение процента клеток с признаками стресса и процента клеток с фрагментированными митохондриями? И с чем по мнению автора связан не очень высокий процент клеток, окрашиваемый DHE?
2. В работе показано, что делеционная форма белка HBx не вызывает фрагментации митохондрий. А исследовалось ли влияние этой формы на продукцию АФК и дыхательную активность митохондрий, или это по мнению диссертанта не имеет большого смысла.
3. Из диссертации следует, что амилоид является более сильным индуктором окислительного стресса, чем белок HBx вируса гепатита В. С чем это может быть связано? Пробовал ли автор сравнить уровни экспрессии обоих белков в клетках дрожжей (в количестве копий), чтобы оценить возможность зависимости силы эффектов от уровня накопления гетерологичного белка?
4. Почему для оценки продукции супероксид-аниона в митохондриях использовался краситель DHE, а не его митохондриально-направленный аналог MitoSOX?

Тем не менее, стоит отметить, что все эти вопросы не ставят под сомнение ни одного вывода диссертационной работы.

Диссертационная работа Епремяна Хорена Хачатуровича «Первые модели дрожжей *Yarrowia lipolytica*, экспрессирующие белок вируса гепатита В НВХ и амилоид АВ42: изменения в морфологии и функциях митохондрий», представленная к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук и установленным «Положениям о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,

доктор биологических наук

1.5.3. молекулярная биология

 Иванов Александр Владимирович

Контактная информация

ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

e-mail: aivanov@yandex.ru

тел.: +79250683630

19 мая 2023 г.

Подпись руки Иванова А.В. удостоверяю,

Ученый секретарь ИМБ РАН, к.в.н.
Бочаров

Александр Анатольевич

