

## ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу **Епремяна Хорена Хачатуровича** «ПЕРВЫЕ МОДЕЛИ ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA*, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ БЕЛОК ВИРУСА ГЕПАТИТА В НВХ И АМИЛОИД АВ42: ИЗМЕНЕНИЯ В МОРФОЛОГИИ И ФУНКЦИЯХ МИТОХОНДРИЙ», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. - Биохимия

### **Актуальность исследования**

Диссертационная работа Х.Х. Епремяна посвящена изучению влияния вирусного белка НВх гепатита В, укороченной формы этого белка (НВх120), а также амилоидных пептидов Аβ42 и Аβ40 на функционирование митохондрий в дрожжах. Указанные выше белки и пептиды оказывают разнообразные эффекты на клетки млекопитающих, в том числе, на продукцию активных форм кислорода (АФК). Основным источником АФК в клетках млекопитающих, особенно в таких высоко энергопотребляющих, как нейроны, являются митохондрии. Несмотря на многочисленные исследования особенности генерации АФК в клетках разных типов, эта проблема будет еще долго привлекать большое внимание в связи с особенностями образования АФК при патологических состояниях. Необходимо отметить также выбор модели для проведения экспериментов. Дрожжевые клетки аэробного типа обмена *Yarrowia lipolytica*, были выбраны как одна из наиболее релевантных моделей одноклеточных организмов, поскольку они нетоксичны, растут с высокой скоростью на разнообразных средах, их геном установлен и, главное, ферменты дыхательной цепи *Y. lipolytica* во многом сходны с таковыми у млекопитающих. По указанным причинам диссертационное исследование Хорена Хачатуровича Епремяна является безусловно актуальным.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация Х.Х. Епремяна построена по традиционной схеме и состоит из следующих разделов: Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результаты и обсуждения, Заключение, Выводов и Списка литературы. Диссертация изложена на 101 странице, содержит 33 рисунка и 8 таблиц. Список цитируемой литературы включает 307 ссылок. Материал диссертации изложен последовательно, результаты каждого раздела работы взаимно дополняют друг друга. Диссертационная работа носит полноценный и заверченный характер как с точки зрения оформления, так и в вопросе научной целостности. В автореферате приведена информация об апробации работы на российских конференциях с международным участием,

а также список из 3 статей по теме работы, опубликованных в рецензируемых журналах.

### **Обзор литературы**

Обзор публикаций по теме работы достаточно представительен и содержит 307 ссылок, из которых свыше 60% опубликованы в 2017-2022 гг. т.е. в пятилетний период, предшествующий написанию и защите диссертационной работы. Такой акцент на анализ новейших литературных данных встречается в диссертационных работах не часто. Обзор охватывает период от классической работы группы Либермана и Скулачева (Nature, 1969) по механизму генерации митохондриального потенциала до анализа последних литературных данных по применению различных биологических моделей для исследования механизмов действия белка НВх и амилоидных пептидов.

Структурно обзор разбит на 3 секции. В первой автор описывает основные свойства дыхательной цепи митохондрий, кратко излагает что известно об их вкладе в образование АФК и упоминает антиоксиданты с более подробным описанием «ионов Скулачева», защитные свойства одного из которых являются предметом исследований.

Во второй части Обзора литературы Хорен Хачатурович кратко отмечает значимость лечения гепатокарциномы и роль вирусного белка НВх гепатита В в патогенезе заболевания. Автор излагает современные данные о влиянии этого белка на функционирование митохондрий и обосновывает разработку более простых моделей, чем используемые в основном культуры клеток животных. Х.Х. Епремян подводит к мысли, что дрожжи, причем именно *Y. lipolytica*, могут служить адекватной заменой более трудно получаемых и поддерживаемых культур других типов клеток.

В заключительной части Обзора литературы диссертант, используя схему предыдущей части, обосновывает актуальность лечения болезни Альцгеймера. Автор успешно справился с основной трудностью написания этого раздела – фильтрацией избытка литературы для логического обоснования соответствующей части диссертационного исследования, а именно, необходимости создания улучшенной модели дрожжей на основе *Y. lipolytica* для выявления влияния экспрессии Аβ42 на структуру и динамику митохондрий, редокс-статус, биоэнергетику и жизнеспособность клеток.

К некоторым недочетам Обзора литературы можно отнести то, что обоснование собственных экспериментальных исследований, логично ожидаемых в конце каждого раздела, сформулированы только в финале Обзора и только для болезни Альцгеймера.

## **Материалы и Методы**

В этом разделе Хорен Хачатурович указал, что самостоятельно осуществлял дизайн праймеров для ПЦР и секвенирования, создавал генетические конструкции изучаемых белков, проводил трансфекцию дрожжей *Y. Lipolytica*, и производил отбор и культивирование созданных мутантов дрожжей с последующим их изучением и интерпретацией полученных данных. Дополнительно к этому в диссертационной работе описаны методы оптического спектрального анализа (спектрофотометрия и спектрофлуориметрия), амперометрические измерения поглощения кислорода, подробно описаны условия измерений на двух проточных цитофлуориметрах. Методы флуоресцентной микроскопии использованы не только в традиционной версии, так называемой, широкопольной микроскопии, но и в довольно редком варианте флуоресцентной микроскопии структурированного освещения. Описание методов показывает, что диссертант довольно глубоко теоретически разбирается в возможностях указанных методов.

## **Основные результаты работы**

В ходе работы впервые созданы системы гетерологической экспрессии белков НВх, НВх120 и пептидов Аβ42 и Аβ40 на основе дрожжей *Y. Lipolytica*. Необходимо подчеркнуть, что Хорену Хачатуровичу удалось получить аналоги НВх и Аβ42, конъюгированные с зеленым флуоресцентным белком (eGFP), что позволило выполнить флуоресцентно-микроскопические измерения с высоким разрешением по локализации указанных белков в дрожжевых клетках. Это дало возможность исследовать воздействие этих патогенных белков и пептидов на митохондрии в достаточно простой и в то же время адекватной и стабильной клеточной модели. Сочетание флуоресцентного окрашивания митохондрий Митотрекером Красным с экспрессией конъюгатов (фьюжен-белков) НВх и Аβ42 показало, что экспрессия белков НВх и Аβ42 вызывает фрагментацию митохондрий, а экспрессируемые белки образуют агрегаты.

Экспрессия НВх и Аβ42 повышала уровень окислительного стресса и клеточной гибели. Любопытно, что, судя по перекрыванию изображений митохондрий, окрашенных Митотрекером Красным, и флуоресцентных агрегатов НВх-eGFP и Аβ42-eGFP, эти флуоресцентные аналоги НВх и Аβ42 взаимодействовали с небольшой долей митохондрий. Тем не менее, той небольшой доли митохондрий которые провзаимодействовали с НВх-eGFP и Аβ42-eGFP, по-видимому, оказалось достаточным, чтобы эта доля митохондрий запустила гибель клеток (см. Рис. 11, 12 и 13). Возможно, именно

поэтому дрожжевые клетки, экспрессирующие НВх и Аβ42, отличались повышенным уровнем окислительного стресса и клеточной смерти, пониженной устойчивостью к окислительному стрессу, индуцированному прооксидантом, сниженным сопряжением дыхания и фосфорилирования, меньшей скоростью синтеза АТР, повышенным уровнем АФК.

Очень важно с практической точки зрения подтверждение на созданной модели, что митохондриально-направленный антиоксидант SkQThy в низких концентрациях частично обращал фрагментацию митохондрий, снижал окислительный стресс и, возможно, благодаря этому, увеличивал выживаемость дрожжевых клеток.

### **Достоверность и обоснованность сделанных выводов**

Проделан внушительный объем работы, исследование проведено на высоком методологическом уровне. Надежность и достоверность полученных результатов обеспечивается квалифицированным применением современных молекулярно-биологических, амперометрических, спектроскопических и флуоресцентно-микроскопических методов исследования. Выводы диссертации основаны на полученных результатах и корректно сформулированы, содержание автореферата полностью отражает основные результаты и выводы диссертации.

### **Замечания**

1. **Введение (Личный вклад).** Недостаточно ясно отмечен важный, на наш взгляд, момент, а именно, все ли описанные методы были применены Х.Х. Епремяном самостоятельно или ему ассистировали коллеги. Признание помощи не умалило бы достоинств такой сложной многогранной работы.
2. **Обзор литературы** содержит неточности в оформлении рисунков:
  - 2.1 На схеме дыхательной цепи (Рис. 1) показан NADH, а в подписи к рисунку фигурирует НАДН. Невольно возникает вопрос, почему в аббревиатуре «НАДН» первая буква “Н” соответствует латинской “N”, а последняя буква “Н” соответствует латинской “H”?
  - 2.2 Цитохром с оксидоредуктаза окисляет не убихинон, а убихинол, поэтому корректное название «убихинол-цитохром с оксидоредуктаза».
  - 2.3 Рис.3. В тексте нет аббревиатуры ROS. Если везде используется аббревиатура АФК, то следовало привести в соответствие содержание рисунка с подписью к нему.
3. В главе **Материалы и методы** указаны фирмы-производители приборов и белковых препаратов (антител), но не указаны источники

приобретения низкомолекулярных компонентов, служивших для приготовления растворов.

4. В работе применен один из вариантов микроскопии сверхвысокого разрешения, т.н. микроскопия структурированного освещения (structured-illumination microscopy, SIM), которая не относится к категории широко распространенных методов микроскопии клеток. Было бы логично в главе **Материалы и методы** привести ссылки на обзоры, наиболее адекватно излагающие основы этого метода, если упоминание этих обзоров не укладывалось в общую канву Обзора литературы.

5. В самом начале главы **Результаты** (Рис. 1) диссертант выделяет как одно из основных достоинств дрожжей *Y. lipolitica* их уникальную способность переносить экстремальные условия. С другой стороны, именно эта экстремальная устойчивость могла оказать «медвежью услугу» значительно нивелировав те эффекты, которые патогены, испытанные в исследовании Х.Х. Епремяна, могут оказывать на другие типы клеток, не отличающиеся уникальной стабильностью *Y. lipolitica*.

6. На Рис. 16 видно, что скорости поглощения кислорода заметно отличаются для контрольных Polf клеток и для дрожжей Polf-Z-NBx при селективном ингибировании комплексов I и III дыхательной цепи, однако в тексте к этому рисунку сделан противоположный вывод. Необходимо было привести статистическую обработку этих экспериментов в подтверждение изложенного вывода.

7. Митохондрии в дрожжах *Y. lipolitica* рассматривают, как достаточно адекватную модель митохондрий в других клетках, в частности в нейронах. Вместе с тем, хорошо известно, что в нейронах митохондрии локализованы в перинуклеарной зоне и аксональном холмике. Понятно, что в дрожжах нет смысла говорить об аксональном холмике, однако SIM-изображения митохондрий на рисунках 11, 12, 21 и 22 не дают представления о том, как локализованы митохондрии относительно ядра, что не может не сказываться на энергообеспечении внутриядерных процессов и транспорте в ядро и из него. Было бы желательно указать локализацию митохондрий в *Y. lipolitica* относительно ядра и обсудить могут ли экспрессия NBx и Aβ42 повлиять на взаимодействие ядра с митохондриями.

## **Заключение**

Высказанные замечания имеют не принципиальный, а рекомендательный характер и диссертационная работа Епремяна Хорена Хачатуровича заслуживает положительной оценки. Работа выполнена на актуальную тему, содержит новые теоретически и практически значимые научные результаты, имеющие важное значение для развития биохимии дрожжевых клеток и митохондриологии. Критические комментарии вызваны интересом к представленным материалам и предложенным объяснениям. Содержание автореферата и опубликованных статей полностью отражает содержание диссертации. Считаю, что диссертационная работа Епремяна Хорена Хачатуровича «Первые модели дрожжей *Yarrowia lipolytica*, экспрессирующие белок вируса гепатита В НВХ и амилоид Аβ42: изменения в морфологии и функциях митохондрий», полностью соответствует требованиям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426), а сам диссертант заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 - Биохимия.

Официальный оппонент

Главный научный сотрудник лаборатории  
фундаментальных и прикладных проблем боли  
ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»  
доктор биологических наук , специальность 14.03.03. патологическая  
физиология

Сурин Александр Михайлович

Адрес: Россия, 125315 Москва, Балтийская ул., 8

Тел: 8(916)498-9413

e-mail: [surin\\_am@mail.ru](mailto:surin_am@mail.ru)

Подпись Сурина А.М. заверяю

И.о. Ученого секретаря ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»  
к.м.н. Кожевникова Е.Н.



« 19 »  2023г.