

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
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 08 июня 2023 г. № 14
о присуждении Епремяну Хорену Хачатуровичу, гражданство Российская Федерация,
ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация «Первые модели дрожжей *Yarrowia lipolytica*, экспрессирующие белок вируса гепатита В НВх и амилоид Аβ42: изменения в морфологии и функциях митохондрий» по специальности 1.5.4 Биохимия принята к защите 14 марта 2013 г. (протокол № 6) 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, 13 марта 2019 года № 222/нк, от 03.06.2021 №561/нк. и от 22 марта 2023 г. № 501/нк.

Соискатель

Епремян Хорен Хачатурович (1994 года рождения) в июне 2017 г. окончил лечебный факультет Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова по специальности 31.05.01 «Лечебное дело» (диплом специалиста 107731 0087514). В 2017 г. поступил в очную аспирантуру Института биохимии имени А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН и окончил в 2021 г. с присвоением квалификации Исследователь. Преподаватель-исследователь по

направлению 06.06.01 Биологические науки (диплом об окончании аспирантуры 107705 0013956).

Диссертационную работу соискатель Епремян Х.Х. выполнял в лаборатории биоэнергетики Института биохимии имени А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, где с 2017 года и по настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника.

Научные руководители:

Звягильская Рената Александровна, доктор биологических наук, профессор, г.н.с. лаборатории биоэнергетики ФИЦ Биотехнологии РАН

Зиновкин Роман Алексеевич, кандидат биологических наук зав. лаб. электронного транспорта НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

Официальные оппоненты:

Сурин Александр Михайлович, доктор биологических наук главный научный сотрудник лаборатории фундаментальных и прикладных проблем боли Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Иванов Александр Владимирович, доктор биологических наук заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук»

Выбор официальных оппонентов был обусловлен:

тем, что доктор биологических наук, Сурин Александр Михайлович является одним из ведущих отечественных специалистов в области изучения нарушений гомеостаза нейронов и нейротоксических эффектов, связанных с митохондриями;

тем, что доктор биологических наук, Иванов Александр Владимирович является одним из ведущих отечественных специалистов в области исследования редокс-биологии вирусных инфекций;

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Епремяна Х.Х.

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» (МФТИ) в своем положительном отзыве, подписанном Мануховым И.В., доктором биологических наук, профессором, главным научным сотрудником и заведующим лабораторией молекулярной генетики, и утвержденном проректором по научной работе МФТИ Баганом В.А., кандидатом физико-математических наук, указало, что диссертационная работа Епремяна Х.Х. является самостоятельной научно-квалификационной работой, которая соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. к кандидатским диссертациям, а ее автор Епремян Х.Х. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук специальности – 1.5.4. Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен с тем, что МФТИ является признанным отечественным научным центром в области биохимии и молекулярной биологии, имея в своем составе 8 лабораторий Центра исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, специализирующихся на исследованиях структуры и функции белков, протеомики, биофизики, молекулярной и клеточной биологии, биоинформатики, структурной, функциональной и эволюционной геномики, молекулярной генетики, а также конструировании лекарственных препаратов. Таким образом, сотрудники МФТИ и, в частности, лаборатории молекулярной генетики являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования, непосредственно связанные с тематикой диссертационной работы Епремяна Х.Х.

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

Публикации.

Основные результаты диссертационной работы Епремяна Х.Х. изложены в 3 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в список изданий рекомендованных ВАК РФ, что соответствует требованиям п. 11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842:

1. Епремян Х.Х., Голева Т.Н., Звягильская Р.А. Влияние Tau-белка на функции митохондрий // Биохимия. – 2022. – Т. 87(6). – С. 1014–1029.

2. Epremyan K.K., Goleva T.N., Rogov A.G., Lavrushkina S.V., Zinovkin R.A., Zvyagilskaya R.A. The First *Yarrowia lipolytica* Yeast Models Expressing Hepatitis B Virus X Protein: Changes in Mitochondrial Morphology and Functions // Microorganisms. – 2022. – Vol. 10(9). – P. 1817.

3. Epremyan K.K., Rogov A.G., Goleva T.N., Lavrushkina S.V., Zinovkin R.A., Zvyagilskaya R.A. Altered Mitochondrial Morphology and Bioenergetics in a New Yeast Model Expressing A β 42 // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24(2). – P. 900.

Результаты работы также были представлены на 1 международной и 2 всероссийских конференциях (и опубликованы в материалах этих конференций), в частности: на XXXI Зимней молодёжной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» – 2019, Москва; 3rd International Conference «Homo Sapiens Liberatus» – 2020, Москва; VII Молодёжной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН – 2020, Санкт-Петербург.

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

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, Сурина Александра Михайловича (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и 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 Pо1f клеток и для дрожжей Pо1f-Z-НВх 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 HBx и A β 42 повлиять на взаимодействие ядра с митохондриями.

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Иванова Александра Владимировича (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

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 отсутствие 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 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?

Отзыв ведущей организации Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

1. В разделе 3.1. Создание и первичная характеристика дрожжевых моделей, экспрессирующих НВх и Аβ42, главы 3 Результаты и обсуждение, несколько избыточно описание и процесс создания экспрессионных плазмид. Часть этой информации можно перенести в соответствующий раздел главы 2 Материалы и методы.
2. Соискателю имело смысл сделать обсуждение результатов более всесторонним, т.к. материал имеет более широкое значение. Возможно стоило попробовать проследить связь между фенотипом митохондрий в дрожжах, экспрессирующих патологические маркеры гепатоцеллюлярной карциномы и болезни Альцгеймера с имеющимися в литературе данными о митохондриальной патологии при вышеуказанных заболеваниях.
3. Несмотря на завершенность данного диссертационного исследования, имеет смысл подтвердить полученные результаты на более сложных клеточных и животных моделях. Однако это замечание носит рекомендательный характер, не касается результатов работы и не снижает ее ценность.

На автореферат поступили положительные отзывы от:

Галкиной Ксении Викторовны, кандидата биологических наук, научного сотрудника отдела биоэнергетики НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ, замечаний и вопросов к работе нет.

Нестерова Семена Валерьевича, кандидата биологических наук, научного сотрудника отдела биотехнологий и биоэнергетики НИЦ «Курчатовский институт». **В отзыве имеются следующие вопросы:**

1. Так, к сожалению, в автореферате не приводится параметр ADP/O, который вместе с параметром дыхательного контроля дал бы более полную информацию о степени сопряжения системы окислительного фосфорилирования (ОКСФОС). В то время как показано снижение скорости работы АТР-синтазы и максимальной активности дыхательной цепи, это само по себе не означает худшего сопряжения всей системы, так как скорость дыхания в состоянии 4 (отражающая скорость утечек потенциала) не отличалась от контроля. Таким образом, система ОКСФОС в мутантных дрожжах рZ-НВх может работать медленнее, но с не меньшей эффективностью.

Однозначный ответ на этот вопрос по уже имеющимся данным может дать расчёт параметра ADP/O. Если он снизился, то система, действительно, стала работать менее эффективно, если же не изменился, то это говорит о переходе системы ОКСФОС в другой режим работы – с меньшей скоростью и, возможно, большей устойчивостью к гибели от окислительного стресса.

2. На рис.6 видно, что уровень гибели клеток P₀1f pZ-NBx при воздействии прооксиданта оказался ниже, чем в контроле, несмотря на возросшее число клеток, испытывающих окислительный стресс. Это очевидно связано с активацией каких-то процессов адаптации, обеспечивающих выживание при окислительном стрессе. Не исключено, что одним из таких механизмов адаптации и является снижение скорости работы системы ОКСФОС. Было бы интересно подробнее исследовать и обсудить этот феномен.

3. На рисунке 14, по-видимому, при вёрстке автореферата случайно ошибочно приведен и с правой и с левой стороны один и тот же график поглощения кислорода.

Фенюка Бориса Александровича, доктора биологических наук, доцента факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ, замечаний и вопросов к работе нет.

С вопросами выступали:

д.б.н. Агафонов М.О., д.б.н., проф. Левицкий Д.И., д.б.н. Федоров А.Н., д.б.н., проф. Юрина Н.П., д.б.н. Терешина В.М., д.б.н. Кушниров В.В., д.х.н., проф. Дзантиев Б.Б., д.х.н., проф., академик РАН Попов В.О.

В дискуссии приняли участие:

д.б.н., проф. Левицкий Д.И., д.б.н., проф. Юрина Н.П., д.б.н. Кушниров В.В.

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

1. Впервые созданы дрожжевые модели гетерологической экспрессии белков NBx, NBx120 и пептидов A β 42 и A β 40 на основе дрожжей *Y. lipolytica*, моделирующие их воздействие на митохондрии.

2. Экспрессия белков NBx и A β 42 в клетках дрожжей *Y. lipolytica* вызывает фрагментацию митохондрий, а экспрессируемые белки образуют агрегаты.

3. Экспрессия NBx и A β 42 повышает уровень общего окислительного стресса и клеточной гибели.

4. Экспрессия НВх и Аβ42 вызывает дисфункцию митохондрий дрожжей, которые имеют пониженные величины дыхательного контроля (степень сопряженности дыхания и фосфорилирования) и скорость синтеза АТФ, повышенный уровень образования АФК и/или сниженную устойчивость к воздействию прооксидантов.

5. Митохондриально-направленный антиоксидант SkQThy в низких концентрациях частично обращал фрагментацию митохондрий, снижал окислительный стресс, увеличивая выживаемость клеток дрожжей.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что:

Полученные результаты свидетельствуют о прямом патологическом действии НВх и Аβ42 на митохондрии клеток, что должно учитываться в дальнейших исследованиях и при поиске перспективных средств терапии социально-значимых заболеваний, связанных с активностью этих пептидов.

Практическая значимость работы заключается в том, что:

Митохондриально-направленные антиоксиданты семейства SkQ могут быть эффективными агентами, снижающими проявления, характерные для экспрессии НВх и Аβ42, связанные с дисфункцией митохондрий и окислительным стрессом.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты работы.

Личный вклад соискателя состоит:

- в получении основных результатов работы либо лично автором, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов;
- в обработке, интерпретации и анализе экспериментальных данных;
- в подготовке публикаций по выполненной работе.

Заключение.

Диссертация Епремяна Х.Х. соискателя является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение важной биомедицинской задачи, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием большого

набора современных методов, постановкой логически обоснованных задач, взаимосвязанностью выводов и результатов, а также публикациями в рецензируемых журналах (3 статьи). Таким образом, из представленных материалов следует, что данная работа выполнена на высоком методическом уровне и направлена на решение фундаментальных и прикладных задач, связанных с участием митохондрий в развитии гепатоцеллюлярной карциномы и болезни Альцгеймера.

На заседании 08 июня 2023 года диссертационный совет принял решение присудить Епремяну Хорену Хачатуровичу ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 11 докторов биологических наук, 8 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в состав совета 24.1.233.01.

«За» присуждение ученой степени – 20,

«Против» – нет,

Недействительных бюллетеней – нет.

Председатель

диссертационного совета

ФИЦ биотехнологии РАН, д.х.н., профессор

академик РАН



В.О.Попов

Ученый секретарь диссертационного совета

ФИЦ биотехнологии РАН

кандидат биологических наук

А.Ф.Орловский

«08» июня 2023 г.