

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

ПУСТЫЛЬНЯКА ВЛАДИМИРА ОЛЕГОВИЧА

«Молекулярные механизмы активации конститутивного андростанового рецептора и регуляции его генов-мишеней в печени лабораторных животных»,

представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Актуальность темы выполненной работы

В результате взаимодействий с факторами окружающей среды живые организмы развили способность к биохимической адаптации, в том числе и механизм защиты от неблагоприятных воздействий химических факторов. Центральное место среди таких механизмов занимает ферментативная система детоксификации чужеродных соединений или ксенобиотиков, которая позволяет живым организмам успешно преодолевать токсические эффекты многих химических соединений. В состав таких ферментативных систем входят уникальные белковые «проводники» химических сигналов, так называемых ксеносенсоры.

Центральным органом детоксификации ксенобиотиков является печень, где и осуществляется активация ксеносенсоров. На сегодня установлено, что в поддержании функции этого важного органа одну из ключевых ролей играет конститутивный андростановый рецептор (CAR). CAR выступает в роли фактора транскрипции, который под воздействием химических соединений регулирует экспрессию генов, кодирующих ферменты 1-ой фазы и 2-ой фазы метаболизма ксенобиотиков, и белки-транспортеры. Этот рецептор способен активироваться различными по структуре химическими соединениями, и эффективность активации определяется видо- и тканеспецифичностью, типом соединения и количеством генов, экспрессия которых меняется при активации CAR, что является частью адаптационного механизма в ответ на внешние стимулы. В настоящее время накапливается все больше доказательств, что CAR является ключевым регулятором регенеративных и пролиферативных процессов в

печени. Однако, точные молекулярные механизмы CAR-опосредованной регенерации печени остаются неизвестными.

Таким образом, глубокое изучение процессов, происходящих при активации CAR, представляет большой интерес с точки зрения понимания метаболизма ксенобиотиков с одной стороны и сохранения регенераторного и детоксификационного потенциала печени, с другой стороны.

Работа Пустыльняк В.О. посвящена изучению роли ядерного конститутивного андростанового рецептора в регуляции детоксификационных и пролиферативных процессов в печени на модели лабораторных животных, и учитывая сказанное выше, является крайне актуальной.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа Пустыльняк В.О. построена по традиционной схеме и состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов исследований, Результатов исследования, Обсуждения, Выводов и Списка литературы. Работа изложена на 171 странице, содержит 31 рисунок и 4 таблицы. Список цитируемой литературы включает 222 источника.

Во введении автор формулирует цели и задачи своей работы, обосновывает актуальность исследования, оценивает научную новизну и потенциальную практическую значимость результатов, формулирует положения, выносимые на защиту.

Глава 1, содержащая обзор литературы, посвящена рассмотрению истории открытия андростанового рецептора, особенностям его транскрипции и строения. Особое внимание уделено химическим соединениям, участвующим в активации и ингибировании CAR. Подробно рассмотрено участие CAR в метаболизме и элиминации ксенобиотиков и эндогенных соединений, гомеостазе гормонов, регуляции глюконеогенеза и липидном обмене, а также в регуляции пролиферации гепатоцитов и гепатоканцерогенезе.

Глава 2, содержащая описание материалов и методов исследования, подробно описывает научно-методологические подходы, примененные автором для решения поставленных задач и достижения цели исследования.

В исследовании используется широкий спектр методов молекулярной и клеточной биологии, биохимии и иммунохимии. Все методики, использованные в исследовании, детально прописаны и пояснены, что предоставляет возможность воспроизведения экспериментов по приведенным протоколам.

Глава 3 посвящена выявлению и обсуждению результатов исследования закономерности видоспецифичных особенностей активации CAR. Автором выявлены видоспецифические различия в активации CAR химическими соединениями в зависимости от типа их модификации. Впервые показана роль CAR в активации сигнального пути Akt, что приводит к снижению уровня ингибитора клеточного цикла p21, транслокации β -катенина в ядра гепатоцитов и активацией транскрипции гена *Cyclin D1*. Показано, что активация CAR инициирует транскрипционную программу генов гликолиза и глюконеогенеза, что способствует активной пролиферации гепатоцитов. Выявлены новые эпигенетические механизмы пролиферации гепатоцитов мышей, основанные на непрямах регуляторных взаимоотношениях CAR и miR-122.

Описанные результаты хорошо демонстрируют логику исследования и проиллюстрированы многочисленными рисунками, которые облегчают восприятие материала.

Достоверность полученных результатов подтверждается статистической обработкой данных с использованием корректно подобранных критериев и тестов. Выводы основываются на фактически полученном автором материале и отражают суть проведенного экспериментального исследования. Автор выносит на защиту шесть научных положений, логично вытекающих из анализа результатов исследования и в достаточной степени аргументированные полученными результатами. Обоснованность научных положений и выводов, таким образом, не вызывает сомнений. Материал, представленный в диссертации, получен и проанализирован автором исследования лично либо при его непосредственном участии.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

В работе проведено комплексное всестороннее исследование молекулярных механизмов активации конститутивного андростанового рецептора и регуляции его генов-мишеней в печени лабораторных животных. Автором впервые охарактеризованы эффекты замещенных производных 2,4,6-трифенилдиоксана-1,3 на способность к активации CAR. Показано, что введение заместителя в 4-ом положение 2-го фенильного радикала в молекуле 2,4,6-трифенилдиоксана-1,3 способно значительно изменять биологическую активность, как внутри одного вида, так и вызывая межвидовые различия. Впервые показано, что активация CAR запускает сигнальный путь Akt через снижение уровня ключевого регулятора PTEN.

Впервые показано, что при активации CAR происходит снижение уровня ингибитора клеточного цикла *Cdkn1a* (*p21*) на транскрипционном уровне за счет репрессии транскрипционной активности фактора транскрипции FoxO1, опосредованной активацией сигнального пути Akt. Интересным результатом исследования является обнаружение увеличения пролиферации гепатоцитов при CAR-зависимой активации пути Akt, сопровождающейся транслокацией β -катенина в ядро, CAR-зависимом снижении глюконеогенеза и активации гликолиза. Впервые показана сложная регуляторная связь между активацией CAR и снижением уровня miR-122 в печени мышей: CAR конкурирует с HNF4 α за связывание со специфическим сайтом в промоторе pri-miR-122 и тем самым блокирует экспрессию miR-122, что приводит к регуляции прямых мишеней miR-122 cMyc и E2f1.

Достоверность и обоснованность результатов исследований

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием широкого спектра современных биохимических и молекулярно-биологических методов исследований, детальным анализом полученных данных и корректными способами статистической обработки. Результаты диссертационной работы опубликованы в 17 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК, доложены и обсуждены на 11 международных научных форумах и конференциях.

В работе можно отметить некоторое количество замечаний.

Так, в разделе Материалы и Методы. Раздел 2.2.1. «Эксперименты проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с

использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. N 755).» Существует обновленная директива по работе с экспериментальными животными ЕС Directive 2010/63/EU от 2010 г., на которую и следует ссылаться.

Следует отметить решительную краткость описания некоторых разделов результатов. Присутствует некоторое количество сленговых терминов, повторов и не удачных выражений, неправильных падежей. Встречаются глаголы в форме «...вводились», «...инкубировались». Более приемлемый стиль - «...вводили», «...инкубировали».

Тем не менее, сделанные замечания имеют дискуссионный характер, не снижают научной ценности полученных результатов и сделанных выводов и ни в коей мере не умаляют хорошего впечатления от работы.

При прочтении работы возникли следующие вопросы:

Как стало очевидно после прочтения обзора литературы и раздела Результаты, видоспецифичность CAR-активирующих лигандов зависит от строения лиганд-связывающего кармана андростанового рецептора. Какова степень гомологии в последовательности и структуре CAR человека и мыши? Настолько ли значительны межвидовые пространственные различия в структуре CAR, что они определяют не просто межвидовые отличия в аффинности лиганда (межвидовыми различиями могли бы быть и разные константы связывания лигандов с CAR), а полное связывание лиганда ТСРОВОР с CAR мыши, и полное отсутствие его связывания с CAR человека?

Заключение

В целом, диссертационная работа Пустыльяка В.О. «Молекулярные механизмы активации конститутивного андростанового рецептора и регуляции его генов-мишеней в печени лабораторных животных», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – *биохимия*, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение современной актуальной проблемы. По своей актуальности, научной новизне и практической значимости, набором методических подходов, объему выполненных исследований и достоверности полученных результатов диссертационная

работа Пустыльняка В.О. полностью соответствует паспорту специальности «Биохимия» и требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. Постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 г. №723, от 21.04.2016 г. №335, от 02.08.2016 г. №748, от 29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. №1024, от 01.10.2018 г. №1168), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Пустыльняк В.О. заслуживает присуждения степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Официальный оппонент,
Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН).

Н.Л. Миронова



Адрес организации: Федеральное государственное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук
Адрес: 630090, Россия, г. Новосибирск
www.niboch.nsc.ru, e-mail: mironova@niboch.nsc.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины

№ 8424

Подпись д.б.н. Н.Л. Мироновой заверяю:

А.А. Местряков
Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН,
Кандидат химических наук

10.03.2022г.