

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертацию Владимира Олеговича Пустыльняка на тему: «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

Ядерные рецепторы относятся к семейству транскрипционных факторов, контролирующих важнейшие физиологические функции живых организмов. Это обуславливает острый интерес к исследованию их молекулярных механизмов в нормальных и патофизиологических процессах, в том числе с целью фармакологической коррекции последних. Одним из таких транскрипционных факторов является конститутивный андростановый рецептор (CAR), локализованный преимущественно в печени. Первоначально CAR рассматривался как «ксеносенсор», регулирующий экспрессию генов цитохрома P450, однако в дальнейшем была показана его роль в регуляции метаболизма эндогенных веществ (гормонов, желчных кислот, глюкозы), а также в процессах пролиферации и апоптоза клеток печени.

В настоящее время установлено, что CAR влияет на транскрипционную активность более 2000 генов, связываясь преимущественно с чувствительными регуляторными элементами в их промоторах. Вместе с тем, до сих пор не достаточно изучены закономерности связывания структурно различных лигандов с аминокислотными остатками в основном гидрофобном кармане рецептора, влияние аллостерических факторов и видовых различий на эти взаимоотношения. Также требуют дальнейшего изучения внутриклеточные молекулярные механизмы активации CAR, определяющие транскрипционную активность его генов-мишеней и ее связь с физиологическими и патологическими эффектами в макро-организме. Особенно актуальны эти исследования в отношении регенеративных и пролиферативных процессов в печени, в связи с острой

необходимостью разработки лекарственных средств купирования печеночной недостаточности, возникающей при резекции или трансплантации органа. Считается, что риск развития печеночной недостаточности связан с синдромом недостаточного размера остаточной массы печени (SFSS), возникающего после резекции. В настоящее время ведется разработка эффективных методов профилактики этого синдрома. Диссертационное исследование В.О. Пустыльняка, посвященное исследованию механизмов функционирования конститутивного андростанового рецептора в печени животных, затрагивает целый ряд актуальных проблем фундаментальной медицины и, вследствие этого, имеет высокую научную значимость.

Оценка содержания диссертации и ее завершенности в целом.

Целью работы соискателя являлось изучение роли ядерного конститутивного андростанового рецептора в регуляции детоксикационных и пролиферативных процессов в печени лабораторных животных. Успешной реализации поставленной цели способствовал выбор экспериментальной модели, в которой экспрессия таргетных CAR генов достигалась в путем активации рецептора специфическими лигандами, вызывающими целевой физиологический ответ. В качестве таких лигандов были взяты синтетические индукторы ТСРОВОР и СИТСО, непосредственно связывающиеся с активным центром CAR. Несомненной ценностью диссертационной работы является то, что исследование выполнено *in vivo* с привлечением широкого арсенала современных молекулярных методов анализа биологического материала, что позволило получить автору результаты, раскрывающие сложную картину перекрестных взаимодействия в сигнальных сетях гепатоцитов, многие из которых выявлены впервые.

Диссертационная работа В.О. Пустыльняка, объемом 171 страниц, выполнена по классической схеме с введением, обзором литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждением, выводами и списком литературы, включающим 222 источника, в том числе 221 публикаций

иностранных авторов. Работа содержит 31 рисунок и 4 таблицы. Структура и объем диссертации, общая методология работы представляются адекватными цели исследования, сформулированные автором задачи логично связаны между собой.

Обзор литературы состоит из нескольких разделов, в которых приводятся сведения о строении и функции CAR, в том числе о молекулярных аспектах его взаимодействия с лигандами, участия в метаболических процессах (глюконеогенезе, липидном обмене), регуляции пролиферации и канцерогенеза в печени. Литературные данные свидетельствуют в целом о недостаточной разработанности проблемы, касающейся понимания молекулярных механизмов функционирования CAR как регулятора экспрессии генов участвующих в метаболизме эндогенных соединений и пролиферативных процессах, в том числе злокачественном.

Глава «Материалы и методы» содержит подробное описание использованных реактивов, протоколы опытов на животных, методы обработки ткани печени для биохимического, гистологического и иммуногистохимического анализа. В работе также использовался целый ряд современных молекулярно-биологических методов, в том числе Вестерн-блот анализ, методы иммунопреципитации хроматина, ОТ-ПЦР с детекцией в режиме реального времени, иммуофлюоресцентный анализ тканей.

Содержание главы «Результаты» включает две части, посвященные исследованию различных проблем. В первой из них В.О. Пустыльник исследует специфичность связывания ксенобиотиков в активном центре андростанового рецептора для грызунов разных видов. Данная проблема имеет значение при выборе как активных индукторов CAR, так и обоснованного выбора лабораторных животных. При изучении влияния на активацию CAR его агониста - 2,4,6-трифенилдиоксана-1,3 и его производных у крыс и мышей, автором показано, что ее видоспецифический характер зависит от структуры и положения заместителей в молекуле лиганда. Несмотря на то, что в работе не было изучено прямое взаимодействие лигандов с активным центром рецептора, полученные

данные свидетельствуют о том, что видовые особенности связаны с различиями в аминокислотных последовательностях в лиганд-связывающем домене CAR. Данное предположение экспериментально поддержано результатами диссертанта, выявившим экспрессию различных изоформ CYP2B в печени крыс и мышей (*CYP2B1/2* и *Cyp2b10* соответственно).

Основная часть диссертационного исследования В.О. Пустыльняка касается изучения влияния индуцированного CAR на пролиферативные процессы в печени животных. Для этого в экспериментах на мышах с введением индуктора андростанового рецептора ТСРОВОР автором установлена временная зависимость активации экспрессии его гена-мишени *Cyp2b10*, оценено влияние его активации на изменение размера печени при краткосрочном и долгосрочном воздействии ТСРОВОР. С помощью методов гистологического анализа и иммуноцитохимического окрашивания с маркером пролиферации Ki67, автор показал, что при активации CAR его лигандом ТСРОВОР размеры печени увеличиваются как путем гиперплазии, так и гипертрофии, что свидетельствует о вовлеченности различных молекулярных механизмов в пролиферацию гепатоцитов.

Наиболее важные результаты, полученные в диссертационном исследовании, касаются определения роли ключевых сигнальных каскадов, регулирующих усиление пролиферативных процессов в печени под влиянием активации CAR. Основное внимание автор уделил сигнальному пути Akt, играющему важную роль в пролиферации и метаболизме клеток. С помощью метода вестерн-блотинга им показано, что введение мышам агониста CAR способствует повышению активности сигнального пути Akt благодаря снижению уровня его негативного регулятора PTEN. При этом Владимиру Олеговичу удалось экспериментально доказать, что снижение активности PTEN происходит не в результате негативного влияния на экспрессию, а опосредовано активностью его убиквитин-лигазы Nedd4-1, которая сама является мишенью сигнального

пути CAR-cMyc-FoxM1. Эти данные свидетельствуют о том, что активация CAR может вызывать пролиферацию гепатоцитов через FoxM1-Nedd4-опосредованную репрессию PTEN и активацию пути Akt. Другим важным следствием влияния индуцированного CAR на этот сигнальный путь можно считать снижение уровня белка Foxo1, который является нижележащей мишенью Akt. В.О. Пустыльняком установлено, что убиквитинизация Foxo1 сопровождается снижением экспрессии его мишени - гена *Cdkn1a (p21)*, функция которого состоит в аресте цикла деления клеток. Таким образом, соискателем экспериментально доказана роль индукции сигнального пути CAR-Akt-Foxo1 в поддержании пролиферации гепатоцитов через репрессию регулятора клеточного цикла *Cdkn1a (p21)*. Учитывая, что активированный *Cdkn1a (p21)* способствует развитию синдрома SFSS, то указанные выше результаты автора могут способствовать разработке рациональных терапевтических стратегий недостаточности печени.

Одним из ключевых факторов, играющих существенную роль в регенерации печени, является β -катенин, индукция которого наблюдается при активации сигнального пути Akt. В диссертационной работе установлено, что активация Akt, вызванная воздействием агониста CAR ТСРОВОР, приводит к транслокации β -катенина в ядра гепатоцитов и усилению их пролиферации. В дополнительных экспериментах с одновременным введением агониста CAR и ингибитора Akt автор показал, что активация β -катенина критична для регулятора клеточного цикла *Cyclin D1*, но не cMyc. Полученные данные позволили сделать вывод о том, что активация андростанового рецептора вызывает пролиферацию гепатоцитов через сигнальный путь CAR-Akt- β -catenin, который опосредуется, по крайней мере частично, активацией *Cyclin D1*. В свою очередь увеличение уровня cMyc в печени животных, вызванное активацией CAR, как показано В.О. Пустыльняком, вызывает экспрессию гликолитических генов, включая гены-транспортёры глюкозы. Эти данные, впервые полученные на большой панели гликолитических генов, свидетельствуют о том, что гликолиз, являющийся основным

энергетическим субстратом делящихся клеток, является биохимической платформой пролиферации печени.

К приоритетным результатам работы В. О. Пустыльняка относится впервые выявленная способность агониста CAR снижать уровень микроРНК-122 в печени мышей. Показано, что молекулярный механизм связан с конкуренцией CAR с ядерным фактором HNF4 α за связывание со специфическим сайтом в промоторе *pri-miR-122*, что приводит к блокированию экспрессии. Автором установлено, что CAR регулирует уровень сMyc посредством регуляции транскрипции *pri-miR-122* и последующей активизации E2f1, прямой мишени miR-122. При этом PPAR γ может ингибировать пролиферацию гепатоцитов, оказывая воздействие на уровень белка сMyc через регуляцию уровня miR-122 на транскрипционном уровне.

Обобщая вышесказанное, можно заключить, что автором диссертационного исследования впервые установлено, что в результате активации ксенобиотиками конститутивного андростанового рецептора в гепатоцитах реализуется комплексная транскрипционная программа активации генов различных сигнальных путей, связанных с пролиферативными и метаболическими процессами, обеспечивающая детоксикацию и регенерацию печени.

Следует отметить, что большинство результатов исследования получены В.О. Пустыльняком впервые, имеют фундаментальный характер и соответствуют мировому уровню. Достоверность данных не вызывают сомнений, так как подтверждается использованием большого арсенала современных молекулярно-биологических, биохимических и иммуногистохимических методов исследования. Биологические испытания выполнены на конвенциональных лабораторных животных разных видов. Статистическая обработка данных проведена согласно современным требованиям. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

С точки зрения раскрытия темы и реализации поставленных соискателем задач

структура и объем диссертации представляются адекватными заявленным целям, выводы соответствуют содержанию. Результаты исследования прошли апробацию на 11 международных научных конференциях. По профилю диссертации опубликовано 29 работ, из них 17 полнотекстовых статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации и входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования Scopus и WoS.

Результаты имеют теоретическое значение, связанное с получением новых знаний о роли конститутивного андростанового рецептора в молекулярно-биохимических механизмах метаболической адаптации организма и активации пролиферации гепатоцитов.

Практическая значимость определяется возможностью использования результатов исследования для разработки стратегии улучшения регенерации печени и профилактики синдрома недостаточного размера оставшейся части при гепатэктомии, а также для обоснования рационального дизайна при создании целевых фармакологических агентов.

Замечания. Принципиальных замечаний к работе нет. В тексте отмечены незначительные опечатки и отдельные некорректные выражения в описании цели и задач, не умаляющие ее значимости. Например, в выражении «...на модели лабораторных животных» слово «модель» является лишним, либо необходимо указать название модели. В задаче 2 выражение «отношение структура-активность» обычно применяются по отношению к веществам (лигандам), а не к механизму действия.

В ходе знакомства с диссертацией также возникли вопросы: почему при изучении влияния конститутивного андростанового рецептора на печень его индукторы вводились животным внутривенно, чем обусловлен выбор их доз, имеются ли данные о токсичности индукторов CAR? Чем можно объяснить, что при декларируемой широкой специфичности андростанового рецептора, в работе указано лишь два лиганда, способных

связываться с его LBD? Имеются ли у рецептора другие, аллостерические центры связывания? Большинство молекулярных механизмов действия CAR, выявленных в работе, опосредуются активацией сигнального пути Akt. Означает ли, что он является внутриклеточным модулятором (возможно аллостерическим) Akt?

Заключение. Диссертационная работа Пустыльняка Владимира Олеговича «Молекулярные механизмы активации конститутивного андростанового рецептора и регуляции его генов-мишеней в печени лабораторных животных», является законченным исследованием, которое по содержанию, актуальности выбранной темы, научной новизне и практической значимости полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции Постановления Правительства РФ №1168 от 01.10.2018 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Пустыльняк Владимир Олегович, заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия.

Официальный оппонент:

ведущий научный сотрудник лаборатории
фармакологических исследований
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Новосибирского института
органической химии им. Н.Н.Ворожцова
Сибирского отделения Российской академии наук,
доктор биологических наук

Сорокина Ирина Васильевна

Адрес учреждения:
630090, г. Новосибирск, проспек
Лаврентьева, 9. Тел. (383)330 0
e-mail: sorokina@nioch.nsc.ru
« 10 » марта 2021

Подпись Сорокиной И.В. заве
Ученый секретарь НИОХ СО



Бредихин Р.А.