



**МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА  
(МГУ)**

Ленинские горы, Москва,  
ГСП-1, 119991  
Телефон: 939-10-00  
Факс: 939-01-26

04.03.2021 № 243-21/с  
На № \_\_\_\_\_

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Проректор МГУ имени М.В. Ломоносова,  
доктор физико-математических наук,  
профессор

  
Олей Анатолевич

04.03.2021 г.

## **ОТЗЫВ**

### **ведущей организации на диссертационную работу**

Пустыльняк Владимира Олеговича

«Молекулярные механизмы активации конститутивного андростанового рецептора и регуляции его генов-мишеней в печени лабораторных животных»,  
представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия

#### Актуальность темы диссертации

Диссертация посвящена выяснению роли ядерного конститутивного андростанового рецептора (CAR) в регуляции детоксикационных и пролиферативных процессов в печени лабораторных животных. Исследование направлено на решение как фундаментальной задачи установления механизмов адаптации организма к действию химических веществ, так и решению практических задач, связанных с выявлением механизмов метаболизма лекарственных препаратов.

Первоначально основной функцией ядерного рецептора CAR считалась индукция в печени ферментов метаболизма ксенобиотиков при воздействии чужеродных соединений. К настоящему времени показано участие этого рецептора в регуляции на транскрипционном уровне многих биохимических и

патологических процессах, протекающих в печени. Особое внимание уделяется регуляции с участием CAR метаболизма глюкозы и пролиферации гепатоцитов. Такое множественное участие данного ядерного рецептора в регуляции генов энергетического обмена и процессах деления клеток делает проблему его изучения актуальной для установления фундаментальных механизмов адаптации. Расширение научных данных, описывающих молекулярные механизмы регуляции биохимических процессов с участием CAR, может позволить сделать выводы о возможности клинического использования агонистов этого рецептора. Актуальность работы не вызывает сомнений.

#### Научная новизна исследования

В работе впервые охарактеризованы эффекты замещенных производных 2,4,6-трифенилдиоксана-1,3 на активацию CAR и его молекулярных мишеней в печени крыс и мышей и показана видоспецифичность исследованных производных. Показано, что введение химического заместителя в четвертом положении второго фенильного радикала в молекуле 2,4,6-трифенилдиоксана-1,3 способно изменять биологическую активность соединения, как внутри одного вида, так и вызывая межвидовые различия. Эти данные существенны, поскольку в настоящее время нет ясного понимания молекулярных механизмов активации данного рецептора, поэтому проведенный сравнительный анализ производных на уровне различных организмов дает важные ориентиры для дальнейших практических разработок как активаторов, так и ингибиторов CAR.

В работе впервые показано, что активация CAR приводит к снижению уровня ингибитора клеточного цикла p21 в клетках печени и установлен молекулярный механизм репрессии транскрипции гена *Cdkn1a* (*p21*), опосредованный CAR-зависимой репрессией транскрипционной активности фактора транскрипции FoxO1.

Автором впервые показано, что CAR-опосредованная активация сигнального пути с участием протеинкиназы Akt приводит к транслокации  $\beta$ -катенина в ядро, что сопровождается активацией транскрипции гена *Cyclin D1* и увеличением пролиферации гепатоцитов.



Автором впервые показано, что активация CAR инициирует транскрипционную программу, направленную на снижение глюконеогенеза и активацию гликолиза, что способствует скоординированным метаболическим действиям, необходимым для активной пролиферации гепатоцитов.

Впервые показана способность агониста CAR снижать уровень микроРНК-122 в печени мышей и показан молекулярный механизм, лежащий в основе снижения уровня этой микроРНК под действием активатора CAR *in vivo*, который заключается в том, что CAR конкурирует с HNF4 $\alpha$  за связывание со специфическим сайтом в промоторе *pri-miR-122* и тем самым блокирует экспрессию. Впервые показано, что CAR регулирует уровень cMyc посредством регуляции транскрипции *pri-miR-122* и последующей активизации E2f1, прямой мишени miR-122. Впервые показано, что PPAR $\gamma$  может ингибировать пролиферацию гепатоцитов, оказывая воздействие на уровень белка cMyc через регуляцию уровня miR-122 на транскрипционном уровне.

Результаты опубликованы в международных рецензируемых журналах, что подтверждает новизну проведенных исследований.

#### Значимость научных результатов для науки и практики

Полученные в работе научные данные расширяют представление о роли CAR в молекулярно-биохимических механизмах метаболической адаптации организма и активации пролиферации гепатоцитов. Результаты диссертационной работы свидетельствуют о том, что активация CAR запускает комплексную транскрипционную программу в гепатоцитах, что вызывает сильный пролиферирующий эффект в печени и перестраивает метаболизм глюкозы. В работе показано, что в основе такого комплексного эффекта лежит способность CAR снижать уровень микроРНК-122. Кроме того, в работе детально описан молекулярный механизм регуляции в гепатоцитах при активации CAR уровня регулятора клеточного цикла p21, ключевого фактора, препятствующего регенерации печени после повреждения. Эта научная информация имеет важное значение для разработки стратегии улучшения регенерации печени при различных повреждениях.

### Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов

Важным достоинством диссертационной работы Пустыльняка В.О. является использование широкого спектра современных методов исследования, которые обеспечили надежность и достоверность полученных данных. Эксперименты были спланированы и проведены на современном научном уровне. Полученные результаты были подвергнуты корректной статистической обработке. Положения, выносимые на защиту, аргументированы результатами, полученными в ходе проведенного исследования. Выводы логически вытекают из результатов исследования. Результаты диссертационного исследования представлены и обсуждены на зарубежных и российских международных конференциях, опубликованы в 29 работах, из них 17 полнотекстовых статей 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.

### Структура и общая характеристика работы

Диссертационная работа Пустыльняка В.О. изложена на 171 странице машинописного текста, иллюстрирована 31 рисунком и 4 таблицами. Диссертация написана в традиционном стиле, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 222 источника.

Во “Введении” автор дает краткий обзор проблемы, на решение которой направлена работа, формулирует цель и задачи исследования. Цель и задачи исследования сформулированы четко, и соответствуют названию и профилю диссертации.



В “Обзоре литературы” отображены современные научные сведения о CAR. В целом обзор литературы содержит достаточно информации необходимой для дальнейшей оценки полученных в диссертационной работе результатов.

В глава “Материалы и методы” достаточно подробно описан комплекс молекулярно-биологических методов.

В главе “Результаты исследования” подробно описываются результаты диссертационной работы. Раздел хорошо структурирован и по своей компоновке соответствует основным положениям диссертационной работы. Логика изложения полученных результатов обосновывает основные выводы работы.

Обсуждение полученных результатов выполнено на основании современных представлений по изучаемой проблеме, в списке использованной литературы хорошо представлены исследования последних годов.

Выводы корректно сформулированы, аргументированы, и следуют непосредственно из фактического материала выполненной работы.

Основные положения диссертации полностью отражены в автореферате.

Особенно хочется отметить четкий и легко читаемый стиль текста написанной диссертации.

Несмотря на высокий методический научный уровень, работа не лишена определенных недостатков:

1. Результаты исследований на уровне организма не могут считаться строгими доказательствами существования внутриклеточных сигнальных связей. Такие связи требуют подтверждения в экспериментах на клеточном уровне. Поэтому, например, не следует писать «наши результаты доказали, что активация CAR положительно влияет на уровень Nedd4-1», а следует использовать слово «показали».
2. В разделе «Обсуждение результатов» много повтора сведений, приведенных в литературном обзоре и введении. В то же время не хватает обсуждения и сопоставления выявленных сигнальных путей с исследованиями на уровне клеток.
3. В исследовании связи miR-122 и PPAR $\gamma$  в качестве активатора PPAR рецепторов в работе использовали агонист росиглитазон, а его способность активировать PPAR $\gamma$  оценивали по экспрессии выбранного гена-маркера. В тоже время есть данные, что росиглитазон обладает также PPAR $\gamma$ -

независимым действием. Этот факт следовало обсудить в литературе, и также отметить почему из всех препаратов группы тиазолидиндионов был выбран именно росиглитазон.

#### 4. Опечатки и мелкие замечания:

- в ряде рисунков литературного обзора в подписях не указаны источники, из которых они взяты. Например, в рис. 3 нужно указать PDB ID, откуда взята структура, даже если обозначения введены самим автором, на рис. 6, откуда взято выравнивание.
- стр. 9 "С использованием технологии RNA-seq установлено, что активация CAR лигандами вызывает изменение экспрессии более, чем 2000 генов (Cui and Klaassen, 2016)," В данной работе исследовался только один лиганд CAR - ТСРОВОР
- стр. 12 "Объем рынка таких лекарств ежегодно составляет более 30 млрд. долларов США." рекомендуется предоставить ссылку на соответствующее экономическое исследование или обзор (или предоставить методику подсчета объема рынка).
- стр. 14 "в 4-ом положение 2-го фенильного радикала" (несогласование слов); стр. 48 -«фенобарнита» вместо фенобарбитала.

Перечисленные замечания не снижают общую положительную оценку работы.

#### Заключение

Таким образом, диссертационная работа Пустыльняка Владимира Олеговича «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, адекватности 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.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании ученого совета НИИ ФХБ. Им. А.Н. Белозерского МГУ протокол № 1 от «1» марта 2021 г.

Ведущий научный сотрудник отдела биокинетики,  
НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ,  
доктор химических наук

  
Сергеева Марина Глебовна

Зам. директора НИИ Ф  
А.Н. Белозерского М  
Академик РАН



  
Богданов Алексей Алексеевич

119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 40. Научно исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова – обособленное структурное подразделение; тел. (8495) 9395359; fxb@genebee.msu.su