

**ОТЗЫВ официального оппонента  
о диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук Федорова Дмитрия Андреевича  
на тему: « $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -зависимая регуляция экспрессии гена *FOS*»  
по специальности 1.5.4. Биохимия**

**Актуальность темы**

Диссертационная работа Федорова Дмитрия Андреевича посвящена изучению участия  $\text{Na,K}$ -АТФазы и создаваемого ею трансмембранного градиента ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в регуляции экспрессии гена *FOS*, кодирующего транскрипционный фактор c-Fos. Учитывая, что ионный баланс живых клеток – это сложно регулируемый многофакторный процесс, в работе детально и подробно проверено участие различных компонентов ионного гомеостаза в регуляции обнаруженного феномена регуляции экспрессии гена *FOS*. Работа представляется актуальной, поскольку нарушения ионного гомеостаза клеток приводят к целому ряду серьезных социально-значимых заболеваний. Поддержание возбудимости нейронов и мышечной ткани критически важно для их нормального функционирования, трансмембранная разница концентраций ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  лежит в основе ключевых механизмов транспорта веществ через плазматическую мембрану, поддержания объема клеток и ответа на изменение осмотического давления вне и внутри клетки.

**Научная новизна работы**

В диссертационной работе Дмитрия Андреевича впервые детально исследован вклад отдельных факторов, на которые влияет ингибирование  $\text{Na,K}$ -АТФазы кардиотоническим стероидом убаином, на активацию экспрессии гена *FOS*. Проверен вклад изменения соотношения концентраций ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  как вне, так и внутри клетки, а также вклад изменения концентрации отдельных ионов. Кроме того, проверено участие эффектов убаина, не связанных с ингибированием активности  $\text{Na,K}$ -АТФазы, участие убаина и самой  $\text{Na,K}$ -АТФазы в активации внутриклеточных сигнальных каскадов.

## **Апробация результатов**

По теме диссертации автором опубликовано 8 печатных работ: 4 статьи в специализированных высокорейтинговых научных журналах, индексируемых в РИНЦ и международных базах данных WoS/Scopus и 4 тезисов в сборниках трудов конференции. Результаты работы апробированы на 5 научных конференциях всероссийского и международного уровня.

## **Структура и содержание диссертационной работы**

Диссертация имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, результатов исследования, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, содержащего 175 ссылок на первоисточники. Работа изложена на 138 страницах, содержит 22 рисунка.

## **Введение**

Во «Введении» автор кратко излагает актуальность темы и степень ее изученности, показывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость исследования, четко формулирует цель и задачи исследования, а также положения, выносимые на защиту. Также описаны методология работы, личный вклад соискателя, степень достоверности и апробация результатов.

## **Цель, задачи работы и положения, выносимые на защиту**

Цель исследования и задачи сформулированы достаточно корректно и отражают различные аспекты комплексного исследования. При этом стоит отметить, что некоторые задачи сформулированы чрезмерно прицельно, что, с одной стороны, позволяет судить о степени выполнения работы и достижении поставленных задач, но, с другой, несколько занижает объем проведенной работы.

## Обзор литературы

Раздел «Обзор литературы» подробно и ясно описан. В Обзоре литературы приведено достаточно развернутое описание механизмов формирования трансмембранного градиента одновалентных катионов, механизмов трансмембранного транспорта ионов и роль этих процессов в функционировании клетки. Описаны принципы работы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, ее участие в регуляции клеточных процессов. Кроме того, детально разобраны механизмы регуляции экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы, входящие в транскрипционный комплекс AP1.

Процессы выстроены в логичную и последовательную картину, четко показано, какие аспекты процессов понятны на сегодняшний день, а по каким из них остаются вопросы. Изложение данных логично подводит к вопросам, поставленным в данной диссертационной работе. Автор обращает внимание на сложность и нелинейность механизмов поддержания и изменения трансмембранного градиента ионов, что обосновывает необходимость детального дальнейшего изучения этой проблемы.

В Обзоре литературы достаточное количество иллюстративного материала, при этом все изображения полностью соответствуют излагаемому материалу. Изображения достаточно понятные, информативные и аккуратные. Обзор литературы написан хорошим, понятным языком.

При прочтении Обзора литературы возникло несколько замечаний и вопросов:

1. Стр. 24. "Вошедший в клетку  $\text{Ca}^{2+}$  может активировать ряд протеинкиназ, в том числе кальмодулин-зависимую киназу, протеинкиназу С (PKC) и опосредованно MAPK". Каким образом вошедший через плазматическую мембрану  $\text{Ca}^{2+}$  может активировать PKC? PKC активируется DAG, а  $\text{Ca}^{2+}$  только приводит ее к мембране. Кроме того, хотелось бы кратких комментариев про опосредованную активацию MAPK. Каким образом она осуществляется за счет входа кальция извне клетки.

2. Стр. 25 "В изоосмотических условиях Na,K-АТРаза обменивает  $\text{Na}^+$  на  $\text{K}^+$ , создавая химический градиент  $\text{K}^+$ , направленный из клетки, и градиент  $\text{Na}^+$ , направленный внутрь клетки." Предлагаю не писать про направление градиента, поскольку согласно математическому определению, направление градиента – это путь от меньшего к большему. В биологии используется понятие градиента как в значении от меньшего к большему (например, хемотаксис, движение по градиенту хемоаттрактанта), так и от большего к меньшему, как в данном случае или при описании градиента протонов в митохондриях.

3.

### **Материалы и методы**

Раздел «Материалы и методы» содержит достаточно подробное для понимания экспериментов описание методов, примененных в работе, используемых клеточных культур и подходов к обработке полученных результатов. Для решения поставленных задач автором был освоен большой спектр биохимических и клеточно-биологических методов. Методы адекватны поставленным задачам, позволили ответить на большинство поставленных вопросов.

### **Результаты экспериментов**

Раздел «Результаты» состоит из 7 основных частей, соответствующих последовательным этапам исследования, и хорошо иллюстрирован. В целом, раздел Результаты выстроен логично. В нем постепенно и доказательно проводится исследование поставленных вопросов, решение предыдущих задач приводит к логичной постановке новых. Некоторые недостатки полученных при помощи отдельных методов результатов хорошо компенсируются широким методическим арсеналом и разнообразием примененных методов, результаты которых сходятся в целостную картину.

1. Термин "изоосмотическое сжатие" (стр. 75) кажется не очень удачным. Сжатие как действие, совершенное над объектом, обычно означает приложенную силу или давление, здесь же клетки сперва переводились в гипотоническую среду, а после включения компенсаторных механизмов - в изотоническую. В данном случае, после включения компенсаторных механизмов условно изотонической средой для клетки делалась гипотоническая, а изотоническая, соответственно - гипертонической. В результате этого клетки сжимались.
2. Из результатов, полученных в подразделе 1 раздела Результаты, Автор делает вывод, что соотношение  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  может быть связано с индукцией гена *FOS*. Однако, на наш взгляд, полученные данные достаточно явно указывают, что повышение экспрессии гена *FOS* может быть связано не с соотношением  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , а с внутриклеточным уровнем  $\text{Na}^+$ . При добавлении убаина уровень  $\text{K}^+$  падает практически вдвое, соотношение  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  во втором и четвертом столбиках различается практически в два раза, а уровень экспрессии *FOS* одинаковый.
3. Описанная автором гипотетическая модель снижения внутриклеточного уровня  $\text{Na}^+$  в ответ на его небольшое повышение вне клетки (подраздел 2 Результаты) остается не очень понятной. Автор пишет, что в ответ на повышение уровня  $\text{Na}^+$  вне клетки он усиленно входит в цитоплазму за счет активности *ENaC* (эндотелиального натриевого канала). Это приводит к усилению активности  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -АТФазы, что регистрируется как понижение уровня  $\text{Na}^+$  в цитоплазме. Однако Автор в работе видит только понижение уровня  $\text{Na}^+$  в цитоплазме, начальное повышение не регистрируется. С другой стороны, как Автор пишет в Обзоре литературы (например, Рис.1), физиологическая концентрация  $\text{Na}^+$  вне клеток составляет 140 мМ, как раз то значение, до которого Автор повышает уровень иона в эксперименте. Не может ли наблюдаемое усиление активности  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -АТФазы на 10% быть следствием того, что этот фермент помещен в более оптимальные условия работы?

4. В ключевых экспериментах в качестве ингибитора  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы использовался только убаин. Однако, как справедливо указано в работе, убаин может иметь отличные от  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы мишени в клетке, и это не только активация сигнальных каскадов. Было бы полезно в качестве контроля использовать и отличные от кардиотонических стероидов ингибиторы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы. Они тоже будут иметь неспецифическую активность, но она будет отличаться от таковой для убаина.
5. Автор различные эксперименты проводил в средах с отличающимся внеклеточным содержанием  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . Так, в Обзоре литературы указано, что нормальная внеклеточная концентрация для  $\text{Na}^+$  составляет 140мМ, а для  $\text{K}^+$  - 5мМ. В экспериментах по изоосмотическому сжатию использовались концентрации  $\text{Na}^+$  - 135мМ,  $\text{K}^+$  - 5мМ. Эксперименты на HUVES проводились при концентрациях  $\text{Na}^+$  - 125мМ. Эксперименты на HeLa проводились при концентрациях  $\text{Na}^+$  - 92мМ,  $\text{K}^+$  - 8мМ. Как показано в подразделе 2 Результаты, изменение внеклеточной концентрации Na даже на 15мМ приводит к значимым изменениям в активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, а в данном случае разница в базальных условиях экспериментов составляла 48 мМ.
6. Рис. 16. Указано, что уровень экспрессии при добавлении ингибиторов MAP-киназ снижается, а амплитуда активации экспрессии гена нет. Что означает амплитуда активации экспрессии гена *FOS*? Чем эта величина отличается от уровня экспрессии (которую не вполне корректно Автор называет еще количеством мРНК)? Почему в этом эксперименте повышение экспрессии гена *FOS* составляет менее чем 2,5 раза, тогда как в предыдущем эксперименте повышение составляло (то ли 42 раза, как написано в тексте, то ли 36 раз, как представлено на диаграмме Рис. 15Б)? Были ли дополнительно изменены условия контрольного эксперимента по сравнению с Рис. 15?

7. Для данных, представленных на Рис. 17, необходима статистическая обработка. Автор заявляет о "значительном увеличении амплитуды изменения флуоресценции по сравнению с контрольными образцами (4 против 1,4 раза)" (стр 87), но не приводит статистическую обработку данных. Индивидуальных клеток, попавших в поле зрения микроскопа, в данном эксперименте было обработано много, но не указано, сколько независимых экспериментов было произведено.

### **Обсуждение**

В разделе «Обсуждение» автор суммирует полученные данные в предполагаемый механизм регуляции уровня экспрессии гена FOS под действием изменяющегося соотношения  $Na^+/K^+$  в цитоплазме. Автор предполагает, что в этом ключевую роль играют располагающиеся в регуляторной области гена G-квадруплексы.

### **Заключение и выводы**

Разделы «Заключение» и «Выводы» кратко и емко суммируют полученные в данной работе результаты.

Выводы в полной мере отражают полученные результаты работы и соответствуют поставленным задачам.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.4. Биохимия (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание

ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Федоров Дмитрий Андреевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,  
доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

\_\_\_\_\_Петр Алексеевич Тюрин-Кузьмин

«5» декабря 2025 г.

Контактные данные:

тел.: \_\_\_\_\_, e-mail: tyurinkuzminpa@my.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

1.5.5 - Физиология человека и животных (биол. науки)

Адрес места работы:

119234, г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27, корп. 1,  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»,  
Факультет фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института

Тел.: \_\_\_\_\_; e-mail: tyurinkuzminpa@my.msu.ru

Подпись сотрудника Тюрина-Кузьмина П.А. удостоверяю:

Ученый секретарь факультета

Фундаментальной медицины МНОИ

МГУ имени М.В. Ломоносова

\_\_\_\_\_ Лия Ниязовна Щербакова

Декан ФФМ МНОИ

МГУ имени М.В. Ломоносова

Академик РАН

\_\_\_\_\_ Всеволод Арсеньевич Ткачук