

**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**

Неравномерное распределение  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  между цитоплазмой и внеклеточной средой является ключевым признаком клеток животных и поддерживается активностью  $\text{Na},\text{K}$ -АТФазы. Градиент этих катионов обеспечивает стабильность мембранного потенциала, осмотический контроль и работу систем активного транспорта. Известно, что при ряде физиологических и патологических состояний отношение внутриклеточных концентраций натрия и калия может существенно меняться. Например, в опухолевых клетках его повышение может достигать многократных величин и сопровождаться перестройкой программы экспрессии генов. Показано, что к наиболее чувствительным относятся гены раннего ответа, однако молекулярная природа сенсора внутриклеточных концентраций  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  остаётся неясной. Отсутствие чёткого понимания того, какие клеточные элементы фиксируют изменения  $\text{Na}_i^+/\text{K}_i^+$  и как они транслируются в изменение экспрессии генов, делает данное направление актуальным как для фундаментальной биологии, так и для разработки подходов к коррекции патологических состояний, сопровождающихся ионным дисбалансом.

Диссертационная работа выполнена на высоком методическом и экспериментальном уровне. В ней сопоставлены результаты, полученные на двух клеточных линиях, а основные выводы подтверждены воспроизводимыми экспериментальными данными. Формулировки в обсуждении результатов логичны и непротиворечивы. Достоверность полученных данных обеспечена применением современных методов исследования, их воспроизводимостью и согласованностью. Основные результаты диссертации были представлены на нескольких всероссийских и

международных конференциях и опубликованы в четырёх статьях в рецензируемых научных журналах.

Диссертационная работа изложена в соответствии со стандартной схемой. Она состоит из введения, обзора литературы, раздела «Материалы и методы», изложения основных результатов, и их отдельного обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающего 175 библиографических ссылок. Работа изложена на 138 страницах и проиллюстрирована 22 рисунками и 5 таблицами.

Обзор литературы выполнен развёрнуто и структурирован таким образом, что читатель получает последовательное и логичное представление обо всех аспектах проблемы. Автор охватывает широкий круг вопросов — от механизмов транспорта одновалентных катионов и их связи с ключевыми физиологическими параметрами клетки до феномена  $\text{Na}_i^+/\text{K}_i^+$ -зависимой регуляции транскрипции. Подробно рассмотрены функции и механизмы регуляции гена FOS, а также существующие гипотезы о роли Na<sub>i</sub>,K-АТФазы и G-квадруплексов в восприятии изменений ионного баланса. Такое построение обзора формирует целостную картину современного состояния области исследования и обеспечивает необходимую теоретическую основу для интерпретации полученных в работе результатов.

Методическая часть работы описана почти на двадцати страницах и отражает глубокое понимание методических аспектов проводимых экспериментов, включая использование необходимых положительных и отрицательных контролей. Она содержит подробные описания современных методов исследования и свидетельствует о том, что автор является квалифицированным специалистом в области клеточной биологии и биохимии. Высокий уровень применённых методов усиливает достоверность полученных результатов.

Основное содержание работы изложено последовательно и внятно, проиллюстрировано необходимыми рисунками, что обеспечивает хорошую

читаемость и позволяет без труда проследить логику экспериментального замысла.

Полученные данные показывают, что повышение внеклеточного натрия в пределах физиологической нормы усиливает вход  $\text{Na}^+$  через ENaC и активирует Na,K-АТФазу, однако не приводит к изменению экспрессии FOS в эндотелиальных клетках. Индукция FOS наблюдается только при увеличении внутриклеточного отношения  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , включая ситуацию изменения клеточного объёма, что подчёркивает определяющее значение именно внутриклеточного ионного сдвига.

Опыт с уабаином в клетках HeLa демонстрирует, что рост экспрессии FOS связан с увеличением внутриклеточного  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , а не с неспецифическими эффектами ингибитора или деполяризацией мембраны. Повышение  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  сопровождается фосфорилированием ERK1/2, JNK и p38, однако блокирование этих киназ не подавляет активацию FOS, что исключает их обязательное участие в механизме ион-зависимой транскрипционной индукции.

Измерения внутриклеточных параметров показывают, что увеличение  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  не сопровождается генерацией активных форм кислорода, но вызывает кратковременное повышение pH с последующим развитием ацидоза. Эти результаты указывают, что ни окислительный стресс, ни активация МАРК-каскадов не являются необходимыми звеньями в передаче сигнала от изменения  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  к транскрипционной активации FOS.

Интересное предположение роли неканонических структур ДНК способных образовываться в промоторной области гена FOS развито в диссертационной работе. Обнаружены три олигонуклеотидные последовательности, потенциально способные изменять конформацию в присутствии различного соотношения ионов натрия и калия, что было продемонстрировано на олигонуклеотидных моделях, методом кругового дихроизма. Несмотря на то, что формирование неканонических структур не подтверждено на геномной ДНК данная гипотеза может рассматриваться как

один из механизмов регуляции экспрессии гена FOS при изменении внутриклеточной концентрации натрия.

Автореферат диссертации полностью соответствует основным результатам и выводам, изложенным в тексте работы.

При анализе работы появились несколько вопросов и замечаний, которые несут дискуссионный и редакторский характер.

1. На Рисунке 19 показано влияние полной замены внеклеточных ионов  $\text{Na}^+$  на ионы  $\text{Li}^+$ . Продемонстрировано, что снижение внутриклеточной концентрации натрия отражается на уровне экспрессии мРНК гена FOS. Из рисунка видно, что уменьшается внутриклеточная концентрация как  $\text{K}^+$ , так и  $\text{Na}^+$ . Сохраняется ли при этом соотношение  $\text{Na}/\text{K}$ , и какая величина является ключевой для регуляции экспрессии — абсолютная концентрация натрия или именно соотношение  $\text{Na}/\text{K}$ ? Как замещение  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  ионами лития влияло на выживаемость клеток в условиях эксперимента?

2. В работе проанализированы последовательности, потенциально способные образовывать неполные G-квадруплексные структуры, состоящие только из трёх гуаниновых повторов, что отличается от классических PQS-последовательностей с четырьмя гуаниновыми повторами. Какова стабильность и молекулярная организация структур, образованных исследованными олигонуклеотидами? Как положение найденных последовательностей относится с уабайн-чувствительной областью промотора гена FOS?

3. Чем может объясняться различный эффект на уровень экспрессии гена MYC, известного тем, что его транскрипция регулируется образованием G-квадруплексной структуры в промоторе, и изучаемого гена FOS при изменении внутриклеточной концентрации натрия?

4. В качестве редакторских замечаний можно отметить смесь русского и английского языка в названиях ферментов:  $\text{Na}, \text{K}$ -АТРаза, ГТРаза. В тексте встречаются опечатки например: «В таблице Таблица 1 приведены основные стимулы», «полный состав сред см. в таблице Таблица 2», «Состав сред

представлен в таблице Таблица 3.». В тексте указано, что уровень мРНК FOS увеличивался в 42 раза, тогда как по данным, приведённым на Рисунке 12, увеличение не превышает 40 раз.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости докторской диссертационного исследования. Докторская диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание докторской 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. Докторская диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите докторских 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 физико-математических наук,  
ведущий научный сотрудник лаборатории ДНК-белковых взаимодействий  
ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта»  
Российской академии наук  
Калюжный Дмитрий Николаевич

15 декабря 2025 г.

Контактные данные: тел.: ; e-mail:

Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена докторская диссертация: 1.5.3 – молекулярная биология (физ.-мат. науки)  
Адрес места работы: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32,  
ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта»  
Российской академии наук, Тел.: ; e-mail:

Подпись Калюжного Дмитрия Николаевича удостоверяю

Ученый секретарь ИМБ РАН, к.ф.-м.н.

Коновалова Елизавета Владимировна

Коновалова Е.В.

«15»декабря 2025 г.