

ОТЗЫВ
на автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук Федорова Дмитрия Андреевича
на тему: « Na^+/K^+ -зависимая регуляция экспрессии гена *FOS*»
по специальности 1.5.4. Биохимия

Работы, которые посвящены исследованиям внутри- и межклеточного ионного гомеостаза, включая механизмы его регуляции и участия в различных биохимических процессах, всегда вызывают интерес со стороны разных специалистов обширного медико-биологического сообщества. Очевидный факт, что от регуляции баланса различных ионов зависит функционирование любой клетки на всех уровнях: от регуляции свойств отдельных макромолекул до глобальных биологических процессов. Исследования этих механизмов крайне важны для понимания патологических процессов, поиска новых подходов терапии различных заболеваний. Изменения внутриклеточных концентраций определенных ионов вызывают не только быстрые эффекты, как, например, изменение мембранныго потенциала, но и запускают сложные адаптивные механизмы на уровне транскрипционных ответов и регуляции метаболизма.

В своей работе Дмитрий Андреевич Федоров ставит целью исследовать механизмы влияния ионов Na^+ и K^+ на регуляцию экспрессии гена раннего ответа *FOS* в клетках человека. В ходе проведения своего масштабного исследования автор показывает экспериментально, что увеличение внутриклеточной концентрации Na^+ оказывает влияние на транскрипционный ответ клеток по этому гену. В поисках механизмов, обуславливающих данный эффект, Дмитрий Андреевич комплексно подходит к изучаемому процессу с разных сторон. В частности, на культуре клеток HeLa автор исследования показывает, что индукция экспрессии гена *FOS* не опосредована неспецифическим ингибирированием Na^+/K^+ -АТФ-азы, а также деполяризацией плазматической мембраны. Автор исследует участие сигнального пути MAPK, используя набор селективных ингибиторов,

выключающих отдельные пути с участием ERK, JNK, p38. Данный сигнальный каскад активируется при увеличении внутриклеточного соотношения Na^+/K^+ , однако оказалось, что эта активность не является необходимым условием для регуляции *FOS*. В своем научном поиске автор исследует взаимосвязи Na^+/K^+ -зависимой регуляции гена *FOS* с внутриклеточными редокс-параметрами клеток, динамикой pH, изменением клеточного объема. Отдельно в этой работе стоит выделить подход, направленный на изучение возможности прямой Na^+/K^+ -зависимой регуляции рассматриваемого гена через формирование в его промоторной части структур G-квадруплексов. Проанализировав последовательность промотора гена *FOS*, Дмитрий Андреевич предсказал возможность формирования как минимум трех типов G-квадруплексов, а затем с помощью метода спектроскопии кругового диахроизма доказал экспериментально их наличие в системе *in vitro* при разных соотношениях Na^+/K^+ . В качестве сравнения автором были использованы известные G-квадруплексы из последовательностей промоторов ряда других генов.

В своей диссертационной работе Дмитрий Андреевич не выявил точного механизма, определяющего регуляцию экспрессии гена *FOS* соотношением катионов Na^+/K^+ . Однако автором получен массив ценных экспериментальных данных, который, безусловно, послужит надежным заделом для целого ряда последующих исследований. В своем заключении Дмитрий Андреевич поднимает вопрос существования в клетках сенсора концентраций одновалентных катионов, соотношения которых в зависимости от состояния клеток могут варьировать в определенных диапазонах. В роли такого сенсора для *FOS* как раз и могут выступать G-квадруплексы промоторной области, которые в условиях *in vitro* продемонстрировали разную чувствительностью к одновалентным катионам. Выявление таких сенсоров, определяющих Na^+/K^+ - зависимую регуляцию экспрессии генов, важно как для фундаментальной науки, так и прикладной, в том числе для

коррекции патологических состояний клеток, связанных с нарушениями ион-транспортных систем.

Дмитрий Андреевич применил в своем исследовании широкий арсенал современных биохимических и биофизических методов, включая атомно-абсорбционную спектрометрию, флуоресцентную микроскопию, спектроскопию кругового дихроизма и ряд других. Помимо биохимических методов автор работал с клеточными культурами, моделируя различные их состояния. Владеет автор и методами обработки данных, используя пакеты программного обеспечения MATLAB, Graph Pad Prism 9.0, Origin 2021 и другие. Это свидетельствует о высоком профессиональном уровне специалиста.

В автореферате отмечен личный вклад Федорова Д.А. в анализ и интерпретацию всех полученных результатов. Это согласуется со списком публикаций автора: по теме диссертационной работы опубликовано 4 статьи в научных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science. В одной экспериментальной статье Федорова Д.А. является 1-м автором, еще в одной обзорной – 2-м. Результаты были неоднократно представлены на научных мероприятиях международного и всероссийского уровня. Таким образом, достоверность и ценность результатов не вызывает сомнений.

В ходе ознакомления с авторефератом диссертации Федорова Д.А. у меня возник ряд комментариев и вопросов:

1. Автор работал с двумя клеточными культурами: клетками эндотелия пупочной вены человека (HUVEC) и распространенными в исследованиях клетками HeLa. При этом часть данных была получена на HUVEC, а часть на HeLa. На мой взгляд, работа могла бы существенно выиграть, если одинаковые эксперименты поставить на обоих типах клеток в контексте сравнения. Исследуемый ген *FOS* относится кprotoонкогенам. Клетки HeLa относятся к онкотипу. Было бы интересно получить результаты аналогичных экспериментов,

которые были сделаны на культуре HeLa, на клетках с физиологическим метаболизмом и сигналингом. Так, например, для клеток HeLa характерна повышенная активность Trx-зависимой системы в цитозоле по сравнению со многими другими клетками. Поэтому крайне интересно было бы также сравнить редокс-параметры в разных клетках в используемой автором модели экспериментов.

2. Известен механизм активации гена *FOS* через сигнальные пути с участием Ca^{2+} - зависимых киназ. В своих выводах автор заключает, что наблюдаемый эффект не зависит от повышения концентраций ионов Ca^{2+} . Действительно, чтобы исключить влияние Ca^{2+} при деполяризации мембранны автор проводит эксперименты в безкальциевой среде и в присутствии хелатора. Однако важно учитывать вклад внутриклеточных депо Ca^{2+} . В качестве контрольного эксперимента следовало применить эту же модель в безкальциевой среде и с хелатором, но дополнительно с использованием тапсигаргина (ингибитора SERCA), истощающего Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме. Кроме того, в своем исследовании автор применял флуоресцентную микроскопию клеток. Для более точного анализа влияния Ca^{2+} следовало применить какой-либо инструмент для Ca^{2+} -визуализации. Современная коллекция таких сенсоров насчитывает несколько десятков версий с разными свойствами. Серия подобных экспериментов позволила бы напрямую исключить отсутствие динамики Ca^{2+} в используемой модели.

3. Автор отмечает, что увеличение внутриклеточного Na^+/K^+ сопровождается повышением pH, которое затем «сменяется закислением цитоплазмы». Данные на рисунке 5 автореферата следовало бы представить не в виде флуоресцентного сигнала сенсора, а в виде конкретных значений pH. Существуют точные подходы перевода значений сигнала $\text{F}_{490}/\text{F}_{395}$ в единицы pH с использованием калибровочных кривых. Это позволило бы установить, насколько

сильно изменяется данный параметр в системе. Судя по динамике сигнала, изменения скорее всего крайне небольшие, чтобы делать вывод о формировании эффекта ацидоза.

Все комментарии носят исключительно рекомендательный характер. 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.

Доктор биологических наук (спец. 1.5.3. – Молекулярная биология),
ведущий научный сотрудник,
руководитель группы метаболических основ патологии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Государственного Научного Центра Российской Федерации
Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова Российской академии наук
117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

Билан Дмитрий Сергеевич
e-mail: d.s.bilan@ibch.ru

28.11.2025 г.

Подпись Билана Д.С. заверяю
Ученый секретарь ГНЦ ИБХ РАН
д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович