

ОТЗЫВ официального оппонента
о 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

Работа посвящена изучению механизма Na^+/K^+ -зависимой регуляции гена *FOS* в клетках человека. Известно, что градиент концентрации ионов Na^+ и K^+ во всех типах клеток поддерживается в основном за счет функционирования Na,K -АТРазы, – АТР-зависимого фермента, осуществляющего перенос ионов Na^+ наружу, а ионов K^+ – внутрь клетки. Градиент одновалентных катионов, создаваемый этим ферментом, используется клеткой для многих целей: поддержания мембранныго потенциала, осмолярности клеточной среды и клеточного объема, транспорта органических соединений (нутриентов) в клетку и секреции клеткой широкого спектра различных соединений, в состав которых входят как биологически активные факторы, так и продукты жизнедеятельности. Следует отметить, что помимо активного транспорта ионов, в клетке функционируют многочисленные ионные каналы, являющиеся непосредственными исполнителями процессов транспорта веществ через цитоплазматическую мембрану.

Главным движущим механизмом поддержания ионного гомеостаза в клетке является градиент ионов, позволяющий осуществлять многочисленные клеточные процессы, в том числе контролировать клеточную возбудимость, что имеет решающее значение в функции нервной ткани. Следует отметить, что результате ряда физиологических или патофизиологических состояний внутриклеточное соотношение Na^+/K^+ может меняться.

Относительно недавно было показано, что изменение ионного баланса может оказывать существенное влияние на экспрессию ряда генов. Na^+/K^+ -чувствительные гены в основном являются генами раннего ответа, среди которых выделяется ген *FOS*, кодирующий субъединицу транскрипционного фактора AP-1. Сведения о природе сенсора внутриклеточных концентраций Na^+ или K^+ пока отсутствуют.

Изучению механизмов, опосредующих регуляцию экспрессии гена *Fos* одновалентными катионами при изменении соотношения их внутриклеточных концентраций, и посвящена работа Д.А. Федорова. Свое исследование автор начал с разработки модели эндотелиальных клеток пупочной вены (HUVEC), позволяющей манипулировать клеточным объемом и внутриклеточным ионным составом независимо друг от друга. Используя эту клеточную модель, автор показал, что увеличение осмолярности внеклеточной среды приводит к увеличению внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения и индукции экспрессии *FOS* в клетках HUVEC, однако эти эффекты наблюдаются лишь при наличии Na^+ во внеклеточной среде.

Далее доктором был проведена оценка влияния умеренного увеличения внеклеточной концентрации Na^+ (в физиологическом диапазоне) на внутриклеточный ионный баланс и экспрессию *FOS* в клетках HUVEC. Автор показал, что увеличение внеклеточной концентрации ионов Na^+ от 125 до 140 мМ не приводит к росту его содержания в клетках эндотелия и не индуцирует транскрипцию гена *FOS* в клетках HUVEC.

Отдельное исследование было посвящено выяснению роли специфических и неспецифических эффектов ингибитора Na,K -АТРазы, убацина, на клеточную экспрессию гена *FOS*. Меняя соотношение внеклеточных концентраций Na^+/K^+ , автор показал, что индукция экспрессии *FOS* при ингибировании Na,K -АТРазы скорее всего не связана с

деполяризацией мембранны и не обусловлена неспецифическим влиянием убацина на сигнальные системы клетки.

Весьма существенным фактором, опосредующем экспрессию многих генов, в т.ч. гена *FOS*, является активация МАР-киназ. Это обстоятельство побудило автора к изучению возможного влияния активации/fosфорилирования киназ ERK1/2, JNK и p38 на экспрессию гена *FOS*, в условиях увеличения внутриклеточного соотношения Na^+/K^+ . В этой серии экспериментов автор показал, что, в то время как ингибирование этих киназ снижает базальную величину экспрессии гена *FOS*, степень ее активации при увеличении соотношения концентраций Na^+/K^+ остается неизменной, и следовательно, их активности не являются необходимым условием для обеспечения Na^+/K^+ -зависимой регуляции *FOS*. Анализируя другие возможные механизмы, способные опосредовать влияние на экспрессию гена *FOS* в условиях проводимых экспериментов, автор продемонстрировал, что увеличение соотношения концентраций Na^+/K^+ не приводит к накоплению ионов Ca^{2+} в клетках, а изменения внутриклеточного pH минимально и не оказывает влияния на генерацию активных форм кислорода.

Основным перспективным кандидатом на роль сенсора одновалентных катионов, в плане модуляции экспрессии генов при увеличении соотношения концентраций Na^+/K^+ являются так называемые G-квадруплексы (G4). Проведенный автором биоинформационический анализ промоторной области гена *FOS* человека обнаружил по крайней мере 3 последовательности, потенциально способных формировать G4. Анализ структуры синтетических олигонуклеотидов, соответствующих последовательности нуклеотидов PQS в промоторе гена *FOS*, методом спектроскопии кругового диахроизма показал, что все эти молекулы способны формировать характерные G4 структуры *in vitro*.

Вышеизложенное характеризует **высокую актуальность и несомненную новизну работы**, проделанной диссидентом и находящейся на переднем крае науки в той области, в которой проведено исследование.

Диссертационная работа изложена по стандартной схеме и состоит из введения, обзора литературы, раздела «Материалы и методы» исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитированной литературы, включающего 175 библиографических ссылок. Работа изложена на 138 страницах и проиллюстрирована 22 рисунками и 5 таблицами. Материалы работы опубликованы в четырех статьях в рецензируемых отечественных и зарубежных изданиях с достаточно высоким рейтингом и представлены на пяти международных и всероссийских конференциях. Публикационная активность автора с наилучшей стороны характеризует качество выполненного диссертационного исследования

Положения, выносимые автором на защиту, а также выводы, сделанные автором, представляются тщательно обоснованными логикой исследования и его исполнением.

Достоверность полученных данных является результатом тщательно организованного исследования, скрупулезным проведением исследования с использованием современных инструментальных методов, а также использованием современных методов статистики при анализе полученных данных.

Вопросы и предложения диссиденту.

1. В работе не проводилась оценка мембранного потенциала клеток и его динамики в ходе эксперимента. Имеются ли у автора соображения о возможности участия мембранного потенциала как такового в индукции экспрессии рассматриваемого гена при изменении внутриклеточного ионного состава?

2. В проведенных экспериментах использовались 2 типа клеток. Является ли это условием использования более физиологической модели (клетки HUVEC) или обусловлено особенностями проводимых экспериментов?
3. Автор подробно описывает детали экспериментов в разделе «Материалы и Методы» и дает достаточно адекватные ссылки на них в подписях к рисункам, однако в некоторых подписях такие указания не приведены.
4. В дальнейшей работе над рукописями автору желательно указывать DOI работ в списке литературы с тем, чтобы читателю было удобнее их найти в Интернете.

В целом, диссертационная работа Д.А. Федорова, по изложению литературных сведений в исследуемой области, знакомству с современными методами исследования и их использованию в эксперименте, тщательному анализу полученных данных (включая их достоинства и ограничения), обоснованности сделанных выводов характеризует автора как высококвалифицированного специалиста в области биохимии, клеточной биологии и биоинформатики.

Указанные вопросы носят дискуссионный характер и не умаляют значимости диссертационного исследования. В целом, работа Д.А. Федорова, по изложению литературных сведений в исследуемой области, знакомству с современными методами исследования и их использованию в эксперименте, тщательному анализу полученных данных (включая их достоинства и ограничения), обоснованности сделанных выводов характеризует автора как высококвалифицированного специалиста в области биохимии, клеточной биологии и биоинформатики.

Заключение.

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 кандидата 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,
ведущий научный сотрудник лаборатории ангиогенеза Института экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Меньшиков Михаил Юрьевич

15 декабря 2025 г.

Контактные данные:

тел.: , e-mail:

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.00.04 – Биохимия

Адрес места работы:

121552, г. Москва, ул. Академика Чазова, д. 15А,
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, институт экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова
Тел.: ; e-mail:

Подпись сотрудника ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» д.б.н. М.Ю. Меньшикова
удостоверяю:

Д.м.н., ученый секретарь Института экспериментальной кардиологии имени академика В.Н.Смирнова
ФГБУ НМИЦ кардиологии имени академика Е.И.Чазова

О.С.Плеханова