

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки

**«Федеральный исследовательский центр
«Пущинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук»
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)»**

142290, Московской обл., г. Серпухов, г. Пущино,
проспект Науки, д.3.
Тел./факс: (4967)73-26-36,
e-mail: info@pncbi.ru, <https://www.pbcra.ru>
ОКПО 02699688, ОГРН 1025007768983, ИНН/КПП
5039002841/503901001

“УТВЕРЖДАЮ”

Директор ФИЦ ПНЦБИ РАН

д.ф.-м.н. Грабарник П.Я.



19.06.2025 № 191-01-2115/559
На № _____ от _____

Заключение

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

**«Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр
биологических исследований Российской академии наук»»**

Диссертация «Вклад различных изоформ IP₃-рецептора в Ca²⁺-сигнализацию в клетках НЕК-293» выполнена в лаборатории «Молекулярной физиологии клетки» института биофизики клетки Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН).

Кочкина Екатерина Николаевна в 2016 г. окончила бакалавриат Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина» по специальности 06.03.01 «Биология». В 2018 г. Кочкина Е.Н. окончила с отличием магистратуру Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пущинский государственный естественно-научный институт» по специальности 06.04.01 «Биология». С 2018 по 2022 соискатель обучалась в очной аспирантуре Российской академии наук по специальности 03.01.02 «Биофизика».

Справка о сданных кандидатских экзаменах выдана в 2025 г. Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

В период подготовки диссертации с 2018 по 2019 Кочкина Е.Н. работала в лаборатории «Молекулярной физиологии клетки» ФИЦ ПНЦБИ РАН в должностях старшего лаборанта и инженера. С 2019 по настоящее время работает в группе геномного редактирования и трансгенеза ФИЦ ПНЦБИ РАН в должности младшего научного сотрудника.

Научный руководитель – Колесников Станислав Сергеевич, академик РАН, профессор, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории «Молекулярной физиологии клетки» ФИЦ ПНЦБИ РАН.

По итогам рассмотрения диссертации «Вклад различных изоформ IP_3 -рецептора в Ca^{2+} -сигнализацию в клетках НЕК-293» принято следующее **заключение**:

Диссертация Кочкиной Екатерины Николаевны является законченной научно-квалификационной работой, которая посвящена изучению вклада изоформ IP_3 -рецептора в генерацию агонист- и тапсигаргин-индуцированных Ca^{2+} -сигналов в клетках линии НЕК-293 и её производных. Работа выполнена на высоком научном и методическом уровне, результаты, представленные в диссертации, в полном объеме отражены в публикациях в рецензируемых научных изданиях.

Результаты, полученные в диссертации Кочкиной Е.Н., актуальны как для прикладных, так и фундаментальных исследований системы Ca^{2+} -гомеостаза и механизмах генерации агонист-индуцированных Ca^{2+} -сигналов в клетках млекопитающих.

Актуальность темы

Среди разнообразных процессов, инициируемых внешними стимулами в цитозоле клеток, мобилизация внутриклеточного Ca^{2+} играет центральную роль в трансдукции многих первичных медиаторов, которые действуют через GPCR-рецепторы, сопряжённые G-белками с фосфоинозитидным каскадом и приводящие к последующему выбросу Ca^{2+} из депо через IP_3 -рецепторы.

IP_3 -рецепторы представляют собой гомо- или гетеротетрамерные каналные комплексы субъединиц IP_3R1 , IP_3R2 и IP_3R3 . Клетки большинства типов экспрессируют два или все три гена IP_3 -рецепторов. Это указывает на то, что одна конкретная изоформа IP_3 -рецептора не способна обеспечить все аспекты агонист-индуцируемой Ca^{2+} -сигнализации. Профиль экспрессии индивидуальных изоформ IP_3 -рецепторов в разных тканях и типах клеток различается, что предполагает специфическую роль отдельных подтипов IP_3 -рецепторов или их комбинаций в физиологии клеток.

Многие клетки, как и НЕК-293, отвечают на различные агонисты GPCR-рецепторов, мобилизующие внутриклеточный Ca^{2+} , по принципу «всё или ничего». Конечным событием в цепи трансдукции многих агонистов является Ca^{2+} -индуцируемый выброс депонированного Ca^{2+} (CICR) через IP_3 -рецепторы. В клетках НЕК-293 экспрессируются все три изоформы IP_3 -рецепторов. Поэтому оставалось неясным, может ли каждая изоформа IP_3 -рецепторов обеспечивать CICR со свойствами, необходимыми для генерации Ca^{2+} -ответов по механизму «всё или ничего», или на это способна лишь определенные изоформы IP_3 -рецепторов и/или их комбинации.

Ранее в лаборатории на основе линии клеток НЕК-293 были получены моноклональные клеточные линии IP_3R1 -НЕК, IP_3R2 -НЕК, IP_3R3 -НЕК, в клетках которых функционирует только IP_3R1 , IP_3R2 или IP_3R3 изоформа, соответственно, а также линия ТКО-НЕК, в клетках которой полностью отсутствуют функционирующие IP_3 -рецепторы. Наличие клеток, в которых функциональны IP_3 -рецепторы только одного типа, обеспечивает возможность ответить на вопрос, сформулированный выше, а также на ряд других, относящихся к анализу механизмов регуляции индивидуальных изоформ IP_3 -рецепторов и их роли в Ca^{2+} -гомеостазе и агонист-индуцируемой Ca^{2+} -сигнализации.

Научная новизна

В настоящей работе с использованием впервые полученных в России моноклональных линий НЕК-293 с единственной функциональной изоформой IP_3 -

рецептора (IP₃R1-НЕК, IP₃R2-НЕК, IP₃R3-НЕК) и экспрессирующих генетически-кодированный Ca²⁺-сенсор R-CEPIA1er с ретикулярной локализацией, а также клеток ТКО-НЕК, лишённых функциональных IP₃-рецепторов, на примере холинергической системы продемонстрирована ключевая роль индивидуальных изоформ IP₃-рецептора в трансдукции сигнала по фосфоинозитидному пути.

Впервые показано, что клетки линий с единственной изоформой, как и клетки дикого типа, генерируют полноценные Ca²⁺-ответы на ACh по принципу «всё или ничего», что свидетельствует о способности каждой изоформы поддерживать выброс депонированного Ca²⁺ по механизму CICR (Ca²⁺-индуцированный выброс Ca²⁺ из депо).

Впервые показано, что в покое клетки спонтанная активность IP₃-рецепторов, особенно изоформы IP₃R2, вносит заметный вклад в Ca²⁺-проницаемость мембран ретикулума и в утечку Ca²⁺ из депо.

В результате одновременного мониторинга изменения концентрации Ca²⁺ в цитозоле и ретикулуме в клетках с единственной изоформой IP₃-рецептора с использованием генетически-кодированного сенсора R-CEPIA1er впервые получено экспериментальное свидетельство того, что уровень Ca²⁺ в ЭР в покое коррелирует с Ca²⁺-утечкой.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведённые в данной работе исследования вклада различных изоформ IP₃-рецептора в Ca²⁺-сигнализацию расширяют современные представления о системе Ca²⁺-гомеостаза и механизмах генерации агонист-индуцированных Ca²⁺-сигналов в клетках человека. Для клеток с единственной функциональной изоформой IP₃-рецептора установлен принцип «всё или ничего» при стимуляции ACh.

Разработана методология на основе тапсигаргинового теста и интерпретирующей его математической модели, позволяющая оценивать относительную Ca²⁺-проницаемость мембран ЭР в клетках человека.

Физиологические исследования линий IP₃R1-НЕК, IP₃R2-НЕК и IP₃R3-НЕК в сочетании с генетически-кодированными сенсорами продемонстрировали их перспективность в качестве тест-систем для изучения фармакологических и биофизических характеристик индивидуальных IP₃-рецепторов, а также для уточнения механизмов их регуляции. Например, анализ Ca²⁺-гомеостаза и индуцированной Ca²⁺-сигнализации в клетках IP₃R3-НЕК может способствовать пониманию причин, по которым вкусовые клетки типа II используют исключительно эту изоформу для трансдукции сигналов вкусовых стимулов.

Линия ТКО-НЕК, клетки которой не способны генерировать Ca²⁺-сигналы в ответ на активацию GPCR-рецепторов, представляет ценность для изучения агонист-зависимого переключения GPCR-рецепторов с фосфоинозитидного каскада на другие внутриклеточные сигнальные пути.

Связь темы с планом основным научных работ учреждения

Результаты, представленные в работе, получены при выполнении государственного задания ФИЦ ПНЦБИ РАН по темам № ААА-А20-120101390067-0 (2020-2021) и № 122041300005-4 (2022-2024). Часть работы выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-14-00031 «Анализ механизмов регуляции индивидуальных изоформ IP₃-рецепторов и их вклада в генерацию агонист-индуцированных Ca²⁺ сигналов»

(2022–2024) и гранта РНФ 18-14-00347 «Внутриклеточная Ca^{2+} сигнализация в клетках с триггерными ответами на агонисты» (2018-2020).

Конкретное личное участие автора в получении результатов

Автор принимала непосредственное участие в постановке физиологических экспериментов, их выполнении, обработке и анализе полученных результатов, а также в подготовке научных публикаций. Материалы, вошедшие в работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, содержащихся в диссертации

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием современных методов исследования, апробированных и верифицированных ранее, воспроизводимостью измеряемых параметров в многочисленных измерениях и их статистической значимостью. Полученные в работе данные находятся в согласии с опубликованными результатами исследований в области, соответствующей проблематике диссертации.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем учёной степени

Материалы диссертации в полном объёме отражены в публикациях Кочкиной Е.Н.

Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендована к защите

Диссертационная работа Кочкиной Е.Н. соответствует пункту 5 (изучение трансдукции Ca^{2+} -сигнала и IP_3 -рецепторов) Паспорта научной специальности 1.5.2. – «Биофизика» (биологические науки).

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на российских и международных конференциях: 24 Международная Пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология – Наука XXI века» (2020, стендовый доклад), VII Съезд физиологов СНГ (2022, устный доклад), 26 Международная Пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология – Наука XXI века» (2023, стендовый доклад), XXIV съезд физиологического общества им. И.П. Павлова (2023, стендовый доклад), 27 Международная Пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология – Наука XXI века» (2024, стендовый доклад), 28 Международная Пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология – Наука XXI века» (2025, устный доклад).

Публикации по теме диссертационной работы

Материалы, изложенные в диссертации, в полной мере отражены в научных работах, опубликованных в соавторстве с Кочкиной Е.Н. Приведённые в работе экспериментальные данные отражены в 4 статьях рецензируемых изданий, в том числе международных, 1 главу в книге “Calcium and Signal Transduction”, а также представлены на профильных российских и международных конференциях в виде устных и стендовых докладов.

Статьи в рецензируемых периодических изданиях

1. **Kochkina E.N.**, Kopylova E.E., Rogachevskaja O.A., Kovalenko N.P., Kabanova N.V., Kotova P.D., Bystrova M.F., Kolesnikov S.S. Agonist-Induced Ca^{2+} Signaling in HEK-293-Derived Cells Expressing a Single IP_3 Receptor Isoform. // Cells, Special Issue: Advances in Dissecting Calcium Signaling Pathways in Health and Diseases. 2024, 13(7), 562.

2. Быстрова М.Ф., Рогачевская О.А., **Кочкина Е.Н.**, Копылова Е.Е., Коваленко Н.П., Колесников С.С. IP_3 -рецептор второго типа является доминантной изоформой в клетках HEK-293. // Биологические мембраны. 2020. Т.37 (6). С.434-441.

3. Kaimachnikov N.P., Kotova P.D., **Kochkina E.N.**, Rogachevskaja O.A., Khokhlov A.A., Bystrova M.F., Kolesnikov S.S. (2021) Modeling of Ca^{2+} transients initiated by GPCR agonists in mesenchymal stromal cells BBA Advances 1, 100012.

4. **Кочкина Е.Н.**, Котова П.Д., Енукашвили Н.И., Колесников С.С. (2019) cGMP-зависимая протеинкиназа модулирует чувствительность мезенхимных стромальных клеток к пуринаргическим агонистам. Биологические мембраны Т.36(4), 296-300.

Глава в книге

5. Kotova P.D., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., **Kochkina E.N.**, Ivashin D.S., Kolesnikov S.S. Calcium signaling initiated by agonists in mesenchymal stromal cells from the human adipose tissue. In: Calcium and Signal Transduction. Ed. Buchholz J.N., Intech Open, London, 2018, pp 139-163.

Текст диссертации был проверен на использование заимствованного материала без ссылки на авторов и источники заимствования. После исключения всех корректных совпадений, иных заимствований не обнаружено.

Диссертация «Вклад различных изоформ IP_3 -рецептора в Ca^{2+} -сигнализацию в клетках НЕК-293» Кочкиной Екатерина Николаевна соответствует критериям, установленным в соответствии с п. 2.1. Федерального закона от 23 августа 1996 г. № 127 «О науке и государственной научно-технической политике» и требованиям ВАК, предъявляемым к диссертационным работам на соискание учёной степени кандидата биологических наук, отражённым в «Положении о присуждении учёных степеней» пп. 9–14, утверждённом постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями и дополнениями) и рекомендуется к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. — Биофизика.

Заключение принято на Научном семинаре Института биофизики клетки Российской академии наук — обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

На заседании присутствовало 33 человека.

Результаты голосования: «ЗА» — 33 чел., «ПРОТИВ» — 0 чел., «ВОЗДЕРЖАЛОСЬ» — 0 чел.

Протокол № 33 от 16 мая 2025 г.

председатель Научного семинара
д.б.н., проф.
главный научный сотрудник
лаборатории механизмов рецепции
Института биофизики клетки Российской
академии наук — обособленного подразделения
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
«Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук
тел. +7(4967)739418
эл. почта: novoselov-vi@rambler.ru

Новоселов Владимир Иванович