



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ И ПАТОФИЗИОЛОГИИ»
(ФГБНУ «НИИОПП»)

125315 Москва, ул.Балтийская, д.8
тел: (499) 151-17-56
факс (495) 601-23-66
ИНН 7712029348 КПП 774301001
ОКПО 01898546 ОГРН 1037700256880

E-mail: niiopp@mail.ru
Интернет: www.niiopp.ru

№ 403-01/268

от « 08 » сентября 2025 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор
Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт
общей патологии и патофизиологии»
член-корреспондент РАН
Сергей Георгиевич Морозов



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Кочкиной Екатерины Николаевны «Вклад различных изоформ IP3-рецептора в Ca^{2+} -сигнализацию в клетках НЕК-293» представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. — Биофизика

Актуальность темы диссертационной работы

Исследования внутриклеточных сигнальных процессов на модели иммортализованных клеточных линий незаменимы при изучении ионного гомеостаза в нормальных дифференцированных клетках. Диссертационное исследование Екатерины Николаевны Кочкиной, посвященное изучению вклада изоформ IP3-рецептора в Ca^{2+} -сигнализацию в клетках НЕК-293, является весьма актуальным. Сочетанное применение флуоресцентной микроскопии и фотохимии с методами генетической инженерии и математического моделирования позволили диссертанту охарактеризовать

тонкие различия в кальциевой сигнализации в клетках НЕК-293, опосредованные каждой изоформой инозитолтрифосфатных рецепторов (IP3Rs) эндоплазматического ретикулума (ЭР). Разработанные Е.Н.Кочкиной методические приемы и полученные в итоге уникальные результаты дают важную информацию о внутриклеточном гомеостазе любых эукариотических клеток, в которых IP3Rs являются основным звеном лиганд-управляемого пути поддержания кальциевого баланса между цитозолем и ЭР. Такой комплексный подход, безусловно, является актуальным и будет успешно применен в дальнейших исследованиях внутриклеточной кальциевой сигнализации.

Структура диссертации

При написании диссертационной работы автор придерживался традиционной схемы. Рукопись включает следующие разделы: Введение, Обзор литературы, включающий 117 ссылок, Материалы и методы исследования, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Список сокращений. Материал диссертации изложен на 92 стр., содержит 18 рисунков и 1 таблицу.

Во **Введении** Е.Н.Кочкина описывает основные особенности внутриклеточного сигналинга, запускаемого в эукариотических клетках метаботропными рецепторами, сопряженными с G-белками, вызывающими активацию фосфолипаз C, образование инозитолтрифосфата (IP3) и последующую мобилизацию Ca^{2+} из ЭР через канальную структуру IP3Rs. Далее автор концентрирует внимание на роли изоформ IP3Rs во внутриклеточном кальциевом сигналинге в электроневозбудимых клетках, из чего следует необходимость дальнейших исследований функционирования этих больших и сложно устроенных комплексов. Последовательность изложения логически подводит к формулированию цели исследования и перечня задач, решение которых необходимо для выяснения вклада индивидуальных изоформ IP3Rs в кальциевую сигнализацию на примере активации мускариновых ацетилхолиновых рецепторов в клетках НЕК-293.

Далее автор диссертационного исследования описывает результаты, указывает на их теоретическое и практическое значение и перечисляет объекты и методы исследования. В соответствии с задачами диссертационного исследования изложены основные положения, выносимые на защиту. Их 3 и они выделяют наиболее яркие достижения и личный вклад диссертанта. Введение завершается разделом «Степень достоверности и апробация результатов» с перечислением конференций в период с 2020 по

2025 г.г., на которых Екатерина Николаевна доложила результаты исследований.

В целом Введение грамотно структурировано, оформлено в соответствии с рекомендациями ГОСТ и позволяет получить представление о содержании работы.

Обзор литературы состоит из четырех подразделов и совместно со списком цитированной литературы составляет 40% объема диссертации. В список цитированной литературы включены ссылки на 117 источников, около 30% из которых опубликованы за последние 5 лет. Примерно 60% ссылок приходится на обзоры, а не на оригинальные исследования, что несколько снижает актуальность материала в рассматриваемом разделе. Несколько выпадает параграф о свойствах циклического ГМФ и гуанилатциклаз, поскольку в Главе «Результаты» не говорится об этом мессенджере и ферменте. Довольно редкой особенностью Обзора является отсутствие иллюстраций. Это объясняется, по-видимому, стремлением авторы наполнить обзор фактическим материалом. На наш взгляд, в некоторых случаях, например, представление пространственных структур ацетилхолиновых рецепторов и рецепторов инозитолтрифосфата сделало бы чтение Обзора более интересным и запоминающимся. В целом Обзор литературы дает достаточно полное представление о структуре и функциях IP3Rs, их наличии в разных клетках и тканях и тем обосновывается выбор объекта и направления экспериментальных исследований. Заслуживает упоминания параграф об основах CRISP/Cas9-технологии, использованной для получения клеток, селективно экспрессирующих только одну из 3-х изоформ IP3Rs или полностью лишенных этих рецепторов. Этот параграф свидетельствует, что Екатерина Николаевна не только опиралась на помощь коллег в приготовлении клеточных линий с нокаутированными изоформами, но сама хорошо разобралась в теоретических основах CRISP/Cas9-методологии.

Глава **Материалы и Методы исследования** свидетельствует о профессиональном владении Е.Н.Кочкиной методами, использованными в диссертационном исследовании. Описаны линии клеток HEK-293 и их подготовка к измерениям на флуоресцентно-микроскопической установке. Детально перечислены основные элементы установки, включая светофильтры, и их сочетание для одновременного мониторинга зеленого и красного сигналов Fluo-8 и R-CePIA1er. На наш взгляд, эту главу украсило бы изображение и краткое описание оптической схемы системы освещения

образца, которая является оригинальной разработкой с участием коллектива, руководимого проф. С.С. Колесниковым.

Удачным завершением главы Материалы и Методы служит таблица, в которой не только перечислены использованные реагенты, но и приведены справочные данные, позволяющие воспользоваться текстом диссертации для аналогичных исследований в других лабораториях.

Глава **Результаты и Обсуждение** включает 5 основных разделов. Диссертант выявила тип метаботропных рецепторов, сопряженных с мобилизацией Ca^{2+} из ЭР, присутствующий в клеточной линии НЕК-293, которую они использовали как контрольную (названную WT-НЕК). Показав, что доминируют Ca^{2+} -ответы при стимулировании ацетилхолиновых мускариновых рецепторов (mAChRs), Екатерина Николаевна проанализировала зависимость $[\text{Ca}^{2+}]_i$ от концентрации ацетилхолина (ACh). Обнаружена пороговая концентрация агониста, при которой рост $[\text{Ca}^{2+}]_i$ происходит скачкообразно и сразу до максимальной величины. Большие концентрации ACh влияют лишь на латентный период начала Ca^{2+} -ответа, на профиль сигнала и длительность подъема $[\text{Ca}^{2+}]_i$, но не амплитуду. Принципиально важно, что это феномен оказался присущим и для других типов клеток (МСК и СНО) при стимуляции иных метаботропных рецепторов. Интересным разделом работы, хотя и вынесенным в Приложение, является теоретическое объяснение феномена «Всё-или-Ничего» в Ca^{2+} -ответах на стимуляцию метаботропных рецепторов. Можно надеяться, что дальнейшее сочетание экспериментальных подходов с математическим моделированием позволит прояснить роль кальциевого обмена между ЭР, митохондриями и другими органеллами, способными накапливать в своем просвете Ca^{2+} , в функционировании клеток.

Интересной находкой является обнаружение того, что экспрессия в мембране ЭР только одного из трех типов IP3-рецепторов (IP3R1 или IP3R2, или IP3R3) в клетках НЕК-293 влияет не только на кинетику высвобождения Ca^{2+} из люмена ЭР, но и на восполнение Ca^{2+} за счет его поступления из внеклеточной среды. Это расширяет представления о взаимодействии таких макромолекулярных структур, как мембранные комплексы IP3Rs, с другими мембранами, в частности плазматическими.

В заключение нельзя не отметить изящные эксперименты с применением трансфекции НЕК-293 и адресной доставкой в люмен ЭР флуоресцентного белкового сенсора R-CEPIA1er. Такой подход позволил синхронно измерить изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в цитозоле с помощью синтетического Ca^{2+} -индикатора Fluo-8 и в люмене ЭР посредством R-CEPIA1er, показать

различия в динамике изменений $[Ca^{2+}]$ в цитозоле и ЭР и обнаружить, что степень опустошения ЭР зависит от изоформы IP3Rs, экспрессируемой клетками.

Личный вклад автора

Судя по объему и детальности изложения условий проведения и подготовки экспериментов, глубокому анализу результатов, количеству публикаций в рецензируемых высокорейтинговых журналах и выступлениях на конференциях, личный вклад Кочкиной Е.Н. в диссертационную работу является доминирующим и заслуживает высокой оценки.

Новизна полученных результатов и выводов

Все основные результаты получены автором впервые. Наиболее значимыми и интересными, на наш взгляд, являются следующие: (1) спонтанная активность IP3-рецепторов, особенно IP3R2, может вносить заметный вклад в утечку Ca^{2+} из ЭР в клетках НЕК-293 даже в отсутствие стимуляции GPCR-рецепторов; (2) клетки, в которых отсутствуют все 3 подтипа IP3Rs, также показывают спонтанную утечку Ca^{2+} из ЭР. Этот результат открывает совершенно новые возможности для изучения функционирования многих других трансмембранных белковых комплексов в мембране ЭР, значение которых для регуляции внутриклеточного Ca^{2+} гомеостаза не уступает роли самих IP3Rs.

Научно-практическое значение работы

Результаты работы, такие как измерение активности отдельных подтипов рецепторов по регистрации кальциевых сигналов, могут быть использованы в совершенствовании методов флуоресцентной микроскопии. Более того, клетки линий IP3R1-, IP3R2- и IP3R3-НЕК, а также их варианты, экспрессирующие генетически кодируемый флуоресцентный сенсор Ca^{2+} в люмене ЭР, могут послужить инструментом для создания системы поиска фармакологических средств воздействия на IP3-рецепторы. Методические приемы, отработанные Е.Н. Кочкиной по регистрации изменений $[Ca^{2+}]$ одновременно в ЭР и в цитозоле, могут быть применены при исследованиях внутриклеточной Ca^{2+} сигнализации в лабораториях родственного профиля.

Вопросы и замечания

1. Наблюдалось ли фоторазложение Fluo-8 при облучении УФ-лазером, когда активировали фоточувствительный аналог IP3, и, если фотовыгорание происходило, то как его корректировали?
2. Почему диссертант выбрала внеклеточную концентрацию Ca^{2+} , равную 260 нМ? Для предотвращения входа Ca^{2+} по SOCE-каналам

- логичнее выбрать примерно 100 нМ (50-150 нМ; см. например, Surin et al., 2007). Или диссертант опиралась на данные литературы о $[Ca^{2+}]_i$, в которых фигурирует 260 нМ ?
3. Не ясно, смену растворов проводили в режиме непрерывного потока или растворы добавляли порциями. Это важно в дальнейшем для понимания того, как от какого момента отсчитывали задержку кальциевого ответа клеток на добавку ацетилхолина.
 4. Не описана методика трансфекции клеток плазмидой, несущей ген кальциевого сенсора R-CER1Aer. Не указано, доставляли плазмиду в клетки с помощью липофектамина или электропорации, или вируса и каков был протокол(ы).
 5. В разделе «2.2. Подготовка клеток к эксперименту» следовало указать: (1) на какой день после посадки использовали культуру для флуоресцентно-микроскопических измерений, (2) какое значение pH буферного раствора, в котором проводили эти измерения, 3) каким образом происходило переключение возбуждающего света и регистрация эмиссии для отдельной детекции сигналов Fluo-8 и R-CER1A1er.

Считаем необходимым подчеркнуть, что отмеченные выше замечания носят чисто технический характер, являются скорее советами по улучшению, чем констатацией серьезных ошибок и не влияют на научную ценность диссертационной работы. В целом, диссертационная работа Кочкиной Е.Н. представляет собой полноценное, грамотно спланированное и проведенное научное исследование на актуальную тему, имеющую как практическое, так и фундаментальное значение.

Заключение

Диссертация Кочкиной Екатерины Николаевны «Вклад различных изоформ IP₃-рецептора в Ca^{2+} -сигнализацию в клетках HEK-293», выполненная под руководством чл.-корр. РАН, д.б.н., проф. С.С.Колесникова, является завершенной научно-квалификационной работой. На основании выполненных автором исследований получены новые данные о IP₃Rs-зависимых механизмах Ca^{2+} -сигнализации, развиты методические направления, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, важное для исследований в области биофизики, клеточной биологии и смежных наук: физиология клетки нормальная и патологическая физиология. Достоверность полученных научных результатов не вызывает сомнения. Выводы диссертационной работы лаконичны, понятны, сформулированы на основании интерпретации экспериментальных данных и

полностью отражают их суть. Все поставленные в исследовании задачи успешно выполнены.

Автореферат Кочкиной Е.Н. удачно иллюстрирован и даёт убедительное представление о новизне и актуальности диссертационной работы, о методах и объектах исследования, основных результатах и выводах, об объеме выполненной работы, публикационной активности диссертанта и умении излагать полученные результаты перед научной аудиторией.

Отзыв обсужден на совместном семинаре лаб. хронического воспаления и микроциркуляции (Зав. лаб. д.м.н. Л.М. Кожевникова), Центра коллективного пользования научным оборудованием (Рук. к.м.н. А.А. Московцев) и лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли (Зав. лаб. д.м.н., проф. М.Л. Кукушкин). Все подразделения входят в состав ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии».

Диссертационная работа Кочкиной Екатерины Николаевны соответствует всем критериям, предъявляемым к диссертациям на степень кандидата наук, в том числе п. 9, «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – «Биофизика»

Кожевникова Любовь Михайловна

доктор медицинских наук, главный научный сотрудник
заведующая лабораторией хронического воспаления и микроциркуляции
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»
Адрес: Россия, 125315 Москва, Балтийская ул., 8

Тел: +7(916)783-74-22; e-mail: lubovmih@yandex.ru

