

Отзыв оппонента

на диссертацию Кочкиной Екатерины Николаевны

на тему: «Вклад различных изоформ IP3-рецептора в Ca^{2+} -сигнализацию в клетках НЕК-293»,

представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук

по специальности 1.5.2 — Биофизика

Актуальность темы исследования.

Работа посвящена изучению вклада индивидуальных изоформ IP3-рецепторов в формирование внутриклеточных кальциевых сигналов. Актуальность темы обусловлена ключевой ролью Ca^{2+} - сигнализации в регуляции широкого спектра клеточных функций и недостаточной изученностью дифференциального вклада различных изоформ IP3-рецепторов в эти процессы.

Важной и интересной находкой представленного исследования является использование клеточных линий НЕК-293 с единственной функциональной изоформой IP3-рецептора. Такая модель перспективна для точного изучения специфических свойств каждой изоформы, их вклада в Ca^{2+} -сигнализацию и регуляцию гомеостаза, что открывает широкие возможности для фундаментальных и фармакологических исследований.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций.

Выводы автора основаны на большом объёме экспериментальных данных, полученных с использованием современных методов клеточной биофизики, флуоресцентной микрофотометрии, генно-инженерных сенсоров и точных подходов к редактированию генома. Проведённое сравнение Ca^{2+} -сигналов в клетках НЕК-293, экспрессирующих отдельные изоформы IP3-рецепторов, а также в клетках без IP3-рецепторов, позволило обоснованно выявить специфические свойства каждой изоформы и их вклад в мобилизацию кальция из внутриклеточных депо. Полученные результаты достоверны, статистически обоснованы и находятся в согласии с современными представлениями в данной области.

Методический подход, основанный на вычислении производных от кривых кальциевых сигналов является весьма удачным, хотя и относительно редко используется. Такой подход, безусловно, является информативным инструментом при анализе тонкой динамики кальциевых процессов.

Научная новизна.

Впервые показано, что каждая из трёх изоформ IP3-рецепторов способна обеспечивать генерацию Ca^{2+} -сигналов по механизму «всё или ничего», ранее описанному преимущественно для смешанной экспрессии. Установлена дифференциальная роль изоформ в поддержании базального уровня проницаемости мембраны эндоплазматического ретикула и утечке кальция в покоящихся клетках. Впервые экспериментально показана корреляция между уровнем Ca^{2+} в ЭР и активностью IP3-рецепторов с использованием генетически кодируемого сенсора R-CEPIA1er. Применение сенсора R-CEPIA1er, локализованного в ЭР, позволяет в реальном времени отслеживать изменения уровня Ca^{2+} в депо, раскрывая новые детали их опустошения и утечки, включая вклад спонтанной активности IP3-рецепторов.

Практическая значимость.

Созданные автором клеточные линии НЕК-293 с экспрессией только одной изоформы IP $\square$ -рецептора являются ценным инструментом для изучения механизмов Ca^{2+} -сигнализации и перспективной платформой для фармакологического скрининга. Разработанная методология оценки кальциевой проницаемости мембраны ЭР может использоваться в прикладных исследованиях, связанных с нарушениями Ca^{2+} -гомеостаза.

Кроме того, использование ацетилхолина как агониста обеспечивает специфическую и воспроизводимую активацию фосфоинозитидного каскада и выброс Ca^{2+} через IP3-рецепторы, что делает его удобным для применения в широком круге исследований на НЕК293.

Структура и оформление диссертации.

Работа логично структурирована, изложение материала последовательное, стиль изложения научный, грамотный. Все разделы – от обзора литературы до выводов – оформлены в соответствии с требованиями ВАК. Приведены иллюстрации, диаграммы, библиографический список включает актуальные источники.

Небольшие замечания.

(1) Стр.42. "...клеток в культуре, которые бы удовлетворяли ряду критериев, таких как достаточная стабильность при культивировании, устойчивость к трансфекции различными векторами, кодирующими рекомбинантные белки, ..."

Вероятно имелась ввиду не устойчивость к трансфекции (способность сопротивляться трансфекции), а устойчивость экспрессии после трансфекции.

(2) Поскольку в исследовании применяли два флуоресцентных кальциевых зонда, было бы неплохо называть их в подписях к рисункам, чтобы сразу было понятно о каком именно кальциевом сигнале идет речь – цитоплазматическом или ретикулярном. Например, в разделе 3.3 говорится о кальции в цитозоле и ретикулуме и о регистрации кальциевого ответа, но о том, что это цитоплазматический сигнал приходится догадываться из контекста.

(3) В разделе 2.3.3 методики первые упоминается использование вектора R-CEPIA1er, а затем только в разделе 3.5 говорится, что это цитомегаловирусный вектор, однако, нигде нет сведений о способе трансфекции (химическая, электропорация, ...). Верно ли я понял, что речь идет вот об этом векторе <https://www.addgene.org/58216> ?

В целом эти замечания не являются принципиальными и носят стилистический характер.

"Диссертационная работа Кочкиной Екатерины Николаевны соответствует критериям (в том числе пп. 9-14), установленным "Положением 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; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. – «Биофизика».

Сибаров Дмитрий Александрович
к.б.н., ведущий научный сотрудник
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института эволюционной физиологии
и биохимии им. И. М. Сеченова
Российской академии наук
194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44
Тел. +7 911 7092977
dsibarov@gmail.com

19 августа 2025

Подпись Д. А. Сибарова
Катялина Оксана Владимировна
19.08.2025

Д. А. Сибаров
Удостоверение
19.08.2025

Сведения

об официальном оппоненте по диссертации Кочкиной Екатерины Николаевны на тему «Вклад различных изоформ IP_3 Ca^{2+} - сигнализацию в клетках HEK-293», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.2. — «Биофизика».

№ № П.П	Фамилия Имя Отчество	Год рождения и граж- данство	Место основной работы, должность, адрес места работы, телефон, e-mail.	Ученая степень	Ученое Звание	название специаль- ности и шифр
	Сибаров Дмитрий Александрович	1975, Россия	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук, 194223, Санкт- Петербург, пр. Тореза, 44 Т.+79117092977 dsibarov@gmail.com	Кандидат биологических наук		03.00.13 Физиология человека и животных

Основные публикации по теме оппонируемой диссертации:

1. Fedorina AI, Antonov SM, Sibarov DA. The Role of Calcium-Dependent Desensitization in the Potentiation by Gne-9278 of NMDA Receptor Currents in Rat Cortical Neurons in vitro / J Evol Biochem Phys+ 60(5): 1702-1711, 2024.
2. Boikov SI, Karelina TV, Sibarov DA, Antonov SM. Selective inhibitor of sodium-calcium exchanger, SEA0400, affects NMDA receptor currents and abolishes their calcium-dependent block by tricyclic antidepressants / Front Pharmacol 15(): , 2024.
3. Sibarov DA, Zhuravleva ZD, Ilyina MA, Boikov SI, Stepanenko YD, Karelina TV, Antonov SM. Unveiling the Role of Cholesterol in Subnanomolar Ouabain Rescue of Cortical Neurons from Calcium Overload Caused by Excitotoxic Insults / Cells 12(15): 2011, 2023.
4. Stepanenko YD, Sibarov DA, Shestakova NN, Antonov SM. Tricyclic Antidepressant Structure-Related Alterations in Calcium-Dependent Inhibition and Open-Channel Block of NMDA Receptors / Front Pharmacol 12: 815368, 2022.
5. Boikov SI, Shestakova NN, Antonov SM, Sibarov DA. Effects of Lithium and Selective Inhibitors of Sodium-Calcium Exchanger on Its Transport Currents in Neurons and HEK293 Cells / Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology 553(1): 29-37, 2022.
6. Boikov SI, Sibarov DA, Antonov SM. Nutritional and Metabolic Factors, Ethanol and Cholesterol, Interact With Calcium-Dependent N-Methyl-D-Aspartate Receptor Inhibition by Tricyclic Antidepressants / Front Cell Neurosci 16(): , 2022.
7. Boikov SI, Sibarov DA, Stepanenko YD, Karelina TV, Antonov SM. Calcium-Dependent Interplay of Lithium and Tricyclic Antidepressants, Amitriptyline and Desipramine, on N-methyl-D-aspartate Receptors / Int J Mol Sci 23(24): 16177, 2022.
8. Ilyina MA, Ivanova MA, Abushik PA, Sibarov DA, Antonov SM. Ouabain prevents NMDA elicited neuronal calcium overload in brain cortical slices: role of membrane cholesterol / J Neurochem 162(S1): MTU10-38, 2022.

9. Boikov SI, Sibarov DA, Karelina TV, Shestakova NN, Antonov SM. The Role of Ryanodine and IP₃-receptors in Calcium Responses to Tricyclic Antidepressants in Rat Neocortical Neurons / J Evol Biochem Phys+ 57(3): 694-703, 2021.
10. Sibarov DA, Boikov SI, Karelina TV, Antonov SM. GluN2 subunit-dependent redox modulation of NMDA receptor activation by homocysteine / Biomolecules 10(10): 1441, 2020.
11. Ivanova MA, Kokorina AD, Timofeeva PD, Karelina TV, Abushik PA, Stepanenko YD, Sibarov DA, Antonov SM. Calcium Export from Neurons and Multi-Kinase Signaling Cascades Contribute to Ouabain Neuroprotection in Hyperhomocysteinemia / Biomolecules 10(8): E1104, 2020.
12. Stepanenko YD, Boikov SI, Sibarov DA, Abushik PA, Vanchakova NP, Belinskaya DA, Shestakova NN, Antonov SM. Dual action of amitriptyline on NMDA receptors: enhancement of Ca-dependent desensitization and trapping channel block / Sci Rep-Uk 9(1): 19454, 2019.
13. Sibarov DA, Antonov SM. Calcium Dependent Desensitization of NMDA Receptors / Biochemistry-Moscow- 83(10): 1173-1183, 2018.
14. Sitnikova LS, Ivanova MA, Stepanenko YD, Karelina TV, Giniatullin R, Sibarov DA, Abushik PA, Antonov SM. Collapse of Neuronal Energy Balance As a Basis of L-Homocysteine Neurotoxicity / Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology 12(4): 360-368, 2018.
15. Иванова МА, Ситникова ЛС, Степаненко ЮД, Карелина ТВ, Сибаров ДА, Абушик ПА, Антонов СМ. Форсколин как нейротектор и модулятор глутамат-зависимого входа Ca²⁺ в нейронах мозжечка / Биол мембраны 35(4): 334-338, 2018.

дата

14.07.2025

Сибаров

к.б.н. Сибаров Дмитрий Александрович



*Сибаров Д.А. удостоверяю
подпись Гусева М.И. 14.07.2025*