

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.232.01 (Д 002.285.01), СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ПУЩИНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 25 сентября 2025 г. № 4

О присуждении Кочкиной Екатерине Николаевне, гражданке Российской Федерации, учёной степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Вклад различных изоформ IP_3 -рецептора в Ca^{2+} -сигнализацию в клетках НЕК-293» по специальности 1.5.2. — Биофизика принята к защите 9 июля 2025 г. (протокол заседания № 2), диссертационным советом 24.1.232.01 (Д 002.285.01), созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 142290 Московская обл., г. Серпухов, г. Пушкино, проспект Науки, д. 3, приказ Минобрнауки России от 07 ноября 2019 года РФ № 1069/нк, с изменениями, внесенными приказами Минобрнауки России № 118 от 24 февраля 2021 г., №561/нк от 3 июня 2021 г., № 24/нк от 28 января 2021 г., № 1162/нк от 12 октября 2022 г. и № 475/нк от 21 мая 2024 г..

Соискатель Кочкина Екатерина Николаевна, 19 августа 1994 года рождения, 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 направлению подготовки 06.03.01 — «Биология». В 2018 г. Кочкина Е.Н. с отличием окончила магистратуру Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пушкинский государственный

естественно-научного институт» по направлению 06.04.01 — «Биология», в 2022 г. окончила очную аспирантуру на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН), по направлению 06.06.01 — Биологические науки. В настоящее время соискатель работает в группе геномного редактирования и трансгенеза ФИЦ ПНЦБИ РАН в должности младшего научного сотрудника.

Диссертация выполнена в лаборатории молекулярной физиологии клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН.

Научный руководитель — академик РАН, доктор биологических наук, профессор, Колесников Станислав Сергеевич (главный научный сотрудник лаборатории молекулярной физиологии клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН).

Официальные оппоненты:

Авдонин Павел Владимирович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией физиологии рецепторов и сигнальных систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН; **Сибаров Дмитрий Александрович**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории сравнительной нейрофизиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (ФГБНУ «НИИОПП») в своём **положительном** отзыве, подписанном Кожевниковой Любовью Михайловной, доктором медицинских наук, главным научным сотрудником, заведующей лабораторией хронического воспаления и микроциркуляции и утвержденным

директором Морозовым Сергеем Георгиевичем, член-корреспондентом РАН, доктором медицинских наук, указала, что диссертационная работа Кочкиной Е.Н. является завершенной научно-квалификационной работой и соответствует критериям, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (с изменениями Постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 г. №723, от 21.04.2016 г. №35, от 02.08.2016 г. №748, от 29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. №024, от 01.10.2018 г. №1168, от 26.05.2020 г. №751, от 20.03.2021 г. №426, от 11.09.2021 г. №1539, от 26.09.2022 г. №1690, от 26.01.2023 г. № 101, от 18.03.2023 г. №415, от 26.10.2023 г. №1786, от 25.01.2024 г. №62), а сам диссертант Кочкина Е. Н. несомненно заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. — Биофизика.

Соискатель имеет 28 опубликованных научных работ, из них по теме диссертации опубликовано 13 научных работ, общим объемом 3,33 печатных листа, из которых 4 статьи опубликованы в рецензируемых научных изданиях из списка, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций (входят в базы данных (Web of Science, Scopus и/или РИНЦ), глава в монографии и 8 статей в сборниках материалов конференций, входящих в систему цитирования РИНЦ. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах и текст не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов. Научные работы по теме диссертации, в которые Кочкина Е.Н. внесла основной, либо существенный вклад, включают:

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 Ca²⁺ Signaling in HEK-293-Derived Cells Expressing a Single IP3 Receptor Isoform. // Cells, Special Issue: Advances in Dissecting Calcium Signaling Pathways in Health and Diseases. 2024, 13(7):562. doi:10.3390/cells13070562.
2. Быстрова М.Ф., Рогачевская О.А., **Кочкина Е.Н.**, Копылова Е.Е.,

Коваленко Н.П., Колесников С.С. IP₃-рецептор второго типа является доминантной изоформой в клетках НЕК-293. // Биологические мембраны. 2020, 37(6), 434-441. doi:10.31857/S0233475520060031.

3. Kaimachnikov N.P, Kotova P.D., **Kochkina E.N.**, Rogachevskaja O.A., Khokhlov A.A., Bystrova M.F., Kolesnikov S.S. Modeling of Ca²⁺ transients initiated by GPCR agonists in mesenchymal stromal cells. // BBA Advances. 2021, 1, 100012. doi: 10.1016/j.bbadv.2021.100012.

4. **Кочкина Е.Н.**, Котова П.Д., Енукашвили Н.И., Колесников С.С. cGMP-зависимая протеинкиназа модулирует чувствительность мезенхимных стромальных клеток к пуринаргическим агонистам. // Биологические мембраны. 2019, 36(4), 296-300. doi:10.1134/S0233475519040066.

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, 139-163. doi: 10.5772/intechopen.79097.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Официального оппонента д.б.н. Авдони́на Павла Владимировича – отзыв **положительный**, содержит следующие замечания и вопросы: 1) В работе утверждается, что «механизм CICR (Ca²⁺-индуцированного высвобождения Ca²⁺) при участии IP₃-рецепторов может обеспечивать постоянство амплитуды Ca²⁺-ответов на агонисты» (стр.50). Не отрицая наличия механизма CICR, корректнее предполагать, что постоянство амплитуды обеспечивается ограниченным объемом IP₃-чувствительного кальциевого депо, которое полностью опорожняется при активации клетки. Отсутствие плавного перехода от нулевого к максимальному ответу (все или ничего) при повышении концентрации ацетилхолина (АХ) может быть объяснено также не только лавинообразным ответом при достижении пороговой концентрации [Ca²⁺]_{цит}, но и высокой кооперативностью в

действии InsP, поскольку функционально активный канал представляет собой тетрамер из 4-х рецепторов InsP. Характерным признаком CICR является распространение кальциевой волны. Наблюдалось ли при активации клеток АХ-ом это явление? 2) Встречаются неточности формулировок, например, на стр 22 «VDACI (потенциал-зависимые анионные каналы типа 1, являющиеся основными каналами транспорта ионов Ca^{2+} на внешней митохондриальной мембране)». 3) Отсутствуют в диссертации данные об уровне экспрессии отдельных видов IP_3R в $\text{IP}_3\text{R1-HEK}$, $\text{IP}_3\text{R2-HEK}$, $\text{IP}_3\text{R3-HEK}$ и в клетках дикого типа, которые есть в статье автора. 4) На чем основано предположение, что при повышенной концентрации Ca^{2+} в ЭР в отсутствие IP_3R в клетках ТКО-НЕК индивидуальные SOC-каналы менее активны? 5) Корректнее предполагать, что постоянство амплитуды обеспечивается ограниченным объемом IP_3 -чувствительного кальциевого депо, которое полностью опорожняется при активации клетки. 6) Отсутствует рисунок с кривой тапсигаргин-индуцированного высвобождения Ca^{2+} в клетках ТКО-НЕК (п. 3.4). 7) «...При рассмотрении зависимости (рис.8) ответа одиночных линейных клеток на АХ хорошо видно, что в клетках $\text{IP}_3\text{R2-HEK}$ и $\text{IP}_3\text{R3-HEK}$ размер плеча ответа и число осцилляций увеличивается при росте концентрации АХ, тогда как клетки $\text{IP}_3\text{R1-HEK}$ не проявляют такой реакции. Следовало бы это обсудить».

Официального оппонента к.б.н. Сибарова Д.А. – отзыв положительный, содержит замечания стилистического характера: 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) В подписях к рисункам неплохо указать какие флуоресцентные зонды применялись автором, чтобы понять о каком именно кальциевом сигнале идет речь – цитоплазматическом или ретикулярном? 3)

В п. 2.3.3. методики впервые упоминается использование вектора, а затем только в п. 3.5. говорится, что это цитомегаловирусный вектор, однако, нигде нет сведений о способе трансфекции (химическая, электропорация...). Верно ли, что речь идет о векторе <https://www.addgene.org/58216/>?

Ведущей организации — отзыв положительный. Принципиальных замечаний по диссертации нет. Имеются вопросы: 1) наблюдалось ли фоторазложение Fluo-8 при облучении УФ-лазером? 2) Почему была выбрана внеклеточная концентрация Ca^{2+} 260 нМ, а не меньшая? 3) Как проводили смену растворов? 4) По какой методике осуществлялась трансфекция клеток плазмидой, несущей ген кальциевого сенсора R-CEPIA1er (с помощью липофектамина, электропорации или вируса)? 5) На какой день после посадки использовали культуру для флуоресцентно-микроскопических измерений? 6) Какое значение pH буферного раствора, в котором проводили эти измерения? 7) каким образом происходило переключение возбуждающего света и регистрация эмиссии для отдельной детекции сигналов Fluo-8 и R-CEPIA1er?

Положительные отзывы на автореферат предоставили:

Тарасова Ольга Сергеевна, д.б.н., доцент, заведующая кафедрой физиологии и патологии факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова». Отзыв содержит вопрос и рекомендацию: 1) корректно ли использовать термин «CICR» и каков источник Ca^{2+} , запускающий CICR? 2) для подтверждения связи задержки ответа на ацетилхолин при разных его концентрациях и чувствительности изоформ к IP_3 стоило провести эксперименты с фотоиндуцированным высвобождением IP_3 .

Колесников Дмитрий Олегович, к.б.н., научный сотрудник лаборатории ионных каналов клеточных мембран ФГБУН Института Цитологии РАН. Отзыв содержит следующие вопросы: 1) Согласно выдвинутой в работе гипотезе возможно функциональное сопряжение IP_3R_2 с депо-управляемыми кальциевыми каналами. Является ли это прямым

взаимодействием или опосредованным через изменение уровня кальция в ЭР? 2) Чем объяснить наличие субпопуляций в моноклональных линиях? 3) Гипотеза о роли анексина в различиях скорости выброса Ca^{2+} требует экспериментальной проверки. Планируются ли эксперименты с модуляцией ANXA1? 4) Какие физиологические преимущества дает наличие трех изоформ?

Гришин Сергей Николаевич, д.б.н., профессор кафедры медицинской и биологической физики имени Е.Е. Никольского ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет Минздрава России» (без замечаний).

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области биофизики и физиологии клетки, которые подтверждены сериями их публикаций в ведущих российских и международных журналах. В ведущей организации – ФГБНУ «НИИОПП», которая является крупным центром современной медицинской науки, разрабатывающим фундаментальные медико-биологические проблемы и участвующим в решении актуальных задач практической медицины, проводятся исследования по выяснению механизмов внутриклеточной сигнализации, регуляции Ca^{2+} -гомеостаза и межклеточных взаимодействий в норме и патологии, что позволяет объективно оценить научную и практическую значимость диссертационной работы Кочкиной Е.Н. Официальный оппонент д.б.н. Авдонин Павел Владимирович является ведущим специалистом в области физиологии клеток, включая клеточную сигнализацию, официальный оппонент к.б.н. Сибаров Дмитрий Александрович является компетентным специалистом в области нейрофизиологии, в том числе кальциевой регуляции. Высокая квалификация, большой опыт исследовательской работы оппонентов и представителей ведущей организации позволяют им объективно оценить степень научной новизны диссертационной работы Кочкиной Е.Н., ее научную и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

Впервые показано, что клетки линий с единственной изоформой IP_3 -рецептора, как и клетки дикого типа, генерируют полноценные Ca^{2+} -ответы на ацетилхолин (ACh) по принципу «всё или ничего», что свидетельствует о способности каждой изоформы поддерживать выброс депонированного Ca^{2+} по механизму CICR.

Проведено сравнение Ca^{2+} -сигналов в клетках НЕК-293, экспрессирующих индивидуальные изоформы IP_3 -рецепторов, а также в клетках без IP_3 -рецепторов, что позволило обоснованно выявить специфические свойства каждой изоформы.

Впервые показано, что вклады различных изоформ IP_3 -рецепторов в Ca^{2+} -проницаемость мембраны ретикулума коррелируют с их активностью в покое в соответствии с рядом IP_3R2 -НЕК > IP_3R1 -НЕК > IP_3R3 -НЕК.

Впервые экспериментально показана корреляция между уровнем Ca^{2+} в ЭР (эндоплазматическом ретикулуме) и активностью IP_3 -рецепторов с использованием генетически кодируемого сенсора R-CER1Aler, локализованного в ЭР, что позволило в реальном времени отслеживать изменения уровня Ca^{2+} в депо, раскрывая новые детали опустошения ЭР и утечки Ca^{2+} .

Теоретическая значимость исследования обусловлена тем, что результаты проведенной работы расширяют современное понимание механизмов рецептор-зависимой регуляции содержания цитозольного кальция и углубляют знания о регуляции Ca^{2+} -гомеостаза и о механизмах генерации агонист-индуцированных Ca^{2+} -сигналов в клетках.

Применительно к проблематике диссертации результативно (эффективно, т.е. с получением обладающих новизной результатов) использованы современные биофизические методы, включая флуоресцентную микрофотометрию клетки, фотохимическое высвобождение вторичного мессенджера (IP_3 -uncaging), методы

молекулярной биологии для характеристики клеточных линий, а также разработанная новаторская методология оценки относительной Ca^{2+} -проницаемости мембраны ЭР в нестимулированных клетках.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что полученные данные о механизмах генерации агонист-индуцированных Ca^{2+} -сигналов в клетках, а также разработанная методология по регистрации изменений концентрации ионов кальция одновременно в ЭР и цитозоле и оценке кальциевой проницаемости мембраны ЭР могут быть применены в прикладных исследованиях, связанных с нарушениями Ca^{2+} -гомеостаза. Клетки линий $\text{IP}_3\text{R1-HEK}$, $\text{IP}_3\text{R2-HEK}$ и $\text{IP}_3\text{R3-HEK}$, а также их варианты, экспрессирующие генетически кодируемый сенсор ретикулярного Ca^{2+} , могут послужить инструментом для создания системы поиска фармакологических средств воздействия на IP_3 -рецепторы, а также для исследования механизмов их регуляции.

Оценка достоверности результатов исследования выявила репрезентативность выборок данных и воспроизводимость результатов, экспериментальные данные были получены на сертифицированном научном оборудовании с использованием качественных расходных материалов, обоснованным использованием контролей. При анализе данных были использованы современные методы анализа и статистической обработки экспериментальных данных. Полученные данные прошли экспертизу в рецензируемых научных журналах и в докладах на российских и международных научных конференциях.

Использованные в работе методы соответствуют поставленным целям и задачам, идея базируется на анализе собственных экспериментальных данных и находится в согласии с современными представлениями в данной области.

Большинство авторских результатов получено впервые.

Личный вклад соискателя определяется его непосредственным участием на всех этапах выполнения работы, включая планирование,

выполнение научных экспериментов, обработку и интерпретацию полученных данных, литературный поиск, подготовку публикаций и представление результатов на научных конференциях и съездах. Основные эксперименты по оптимизации протоколов, постановке и проведении физиологических экспериментов, описанные в диссертации, выполнены лично соискателем. Модифицированные клеточные линии с нокаутированными изоформами IP_3Rs были получены Копыловой Е.Е. (группа геномного редактирования и трансгенеза ФИЦ ПНЦИБИ РАН) и Рогачевской О.А. (лаборатория молекулярной физиологии клетки ФИЦ ПНЦИБИ РАН). Оценка относительных уровней транскриптов была проведена Коваленко Н.П. (группа геномного редактирования и трансгенеза ФИЦ ПНЦИБИ).

Диссертационный совет 24.1.232.01 заключил, что диссертационная работа Кочкиной Екатерины Николаевны является законченной научно-квалификационной работой. Работа написана автором самостоятельно, содержит новые и актуальные научные результаты и по своему содержанию соответствует специальности 1.5.2. – «Биофизика». Таким образом, диссертационная работа Кочкиной Екатерины Николаевны «Вклад различных изоформ IP_3 -рецептора в Ca^{2+} -сигнализацию в клетках НЕК-293», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. — «Биофизика», соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. № 1690; 26.01.2023 г. №101; 25.01.2024 № 62).

В ходе защиты диссертации Кочкиной Е.Н. были высказаны следующие критические замечания: 1) отсутствие плавного перехода от нулевого до максимального уровня при увеличении концентрации АХ,

трактуемой Вами, как ответ «все или ничего» может быть связано с отсутствием измерений в промежуточных точках, поэтому регистрируемый максимальный всплеск может происходить лавинообразно за счет высокой кооперативности IP₃, что вполне характерно для гетерогенных популяций. На слайде 38 хотя и слабый есть ответ на подпороговые концентрации, поэтому полагаю такое утверждение слишком категоричным. 2) Зачем нужен клетке такой ответ? Можно ли использовать свойство автоволны для объяснения сохранения максимального уровня секреции, необходимого в ответ на разные сигналы. Чтобы убедиться в наличии автоволны необходимо воспользоваться системой быстрой регистрации концентрации ионов кальция. 3) Насколько типично поведение «все или ничего» для других рецепторов? Можете привести такие примеры?

Соискатель Кочкина Е.Н. ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию: 1) В области пороговых значений концентраций АХ мы использовали меньший шаг для подтверждения отсутствия градуальности ответов. Кривая, представленная на слайде, демонстрирует вероятность открытого состояния канала IP₃-рецептора в зависимости от концентрации цитозольного Ca²⁺, тогда как генерация кальциевого ответа включает в себя кооперативное действие IP₃ и кальция на IP₃-рецептор. 2) Согласны, что необходимо провести подобные эксперименты. Можно планировать на будущее. 3) Большинство агонистов, с которыми мы работали проявляли способность клеток различных линий генерировать ответы при стимуляции разными агонистами по принципу "всё или ничего". Градуальная доза-зависимость ответа была характерна для серотонинового рецептора 5-HT₄.

На заседании 25 сентября 2025 г., протокол № 4 диссертационный совет постановил: за **решение** научной задачи по изучению особенностей индивидуальных изоформ IP₃-рецепторов и определению их роли в регуляции обмена ионов кальция, в результате чего получены новые данные

о IP_3Rs -зависимых механизмах Ca^{2+} -сигналикации, имеющих важное значение для исследований в области биофизики, клеточной биологии и физиологии клетки присудить **Кочкиной Екатерине Николаевне** ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 5 докторов наук по специальности 1.5.2. – «Биофизика», участвующих в заседании, из **24**, входящих в состав ученого совета, проголосовали: за – «17», против – «0», недействительных бюллетеней – «0».

Председатель

диссертационного совета



д.б.н., проф. Озолин О.Н.

Ученый секретарь

диссертационного совета



д.б.н. Дегтярева О.В.

25 сентября 2025 г.

