

Отзыв официального оппонента на диссертацию

Кочкиной Екатерины Николаевны

«Вклад различных изоформ IP3-рецептора

в Ca^{2+} -сигнализацию в клетках HEK-293»

на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.2. — Биофизика

Актуальность темы

Фундаментальный механизм Са-зависимой активации клеток гормонами и нейротрансмиттерами заключается в высвобождении ионов кальция из эндоплазматического ретикулума через каналы, открываемые вторым посредником – инозитол-1,4,5-трифосфатом (IP3). Традиционно данные каналы обозначаются как рецепторы инозитол-1,4,5-трифосфата – IP3R. Они кодируются тремя генами с близкой последовательностью. Во многих клетках экспрессируются гены всех трёх видов IP3R. Специфическая функциональная роль каждого из них не ясна, поэтому определение вклада отдельных видов IP3R в регуляцию обмена ионов кальция представляется актуальной задачей.

Цель работы

Целью диссертационной работы Екатерины Николаевны Кочкиной было исследование специфических свойств и общих закономерностей работы каждого из трех видов каналов InsP3R при передаче сигнала от мускариновых рецепторов в клетках HEK-293.

Научная новизна

Для решения поставленных задач в диссертационной работе Е.Н. Кочкиной был использован новый подход с использованием моноклональных линий клеток, содержащих каналы только одного вида –

IP3R1-НЕК, IP3R2-НЕК, IP3R3-НЕК или полностью их лишенные – ТКО-НЕК, а также клетки данных линий, экспрессирующие рекомбинантный генетически-кодируемый Ca^{2+} -сенсор R CEPIA1er. Показано, что каждый из каналов IP3R способен участвовать в Ca -индуцируемом выбросе ионов Ca^{2+} , причём подъём $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ происходит по механизму все или ничего, а градуальность ответа достигается за счет изменения лаг-фазы и появления повторных осцилляций в случае IP3R2 и IP3R3. Получены данные, свидетельствующие о наличии у каналов спонтанной активности, за счет которой происходит утечка ионов кальция из ретикулума.

Апробация результатов

По теме диссертации автором опубликованы 4 статьи в научных журналах, глава в монографии и статьи в сборниках научных конференций. Результаты неоднократно доложены на крупных российских конференциях соответствующей тематики.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертация имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, главы результаты и обсуждения, заключения, выводов, приложения и списка литературы. Имеется 117 ссылок на первоисточники. Работа изложена на 91 странице, содержит 20 рисунков.

Обзор литературы

В этой главе Е.Н. Кочкиной сделан краткий обзор современных представлений о сопряженных с гетеротримерными G-белками рецепторов и путей передачи от них сигналов, далее даны общие сведения о кальций-транспортирующих каналах плазматической мембраны и внутриклеточных органелл, кальциевых насосах и связывающих ионы кальция белках.

Большое внимание уделено каналам IP₃R – особенностям экспрессии в тканях организма и физиологической функции разных видов IP₃R, структуре, свойствам, регуляции. Кратко описан феномен кальций-индуцируемого высвобождения кальция (CICR). В заключение в обзоре описана методология CRISPR/Cas9, использованная для получения клеточных линий IP₃R1-НЕК, IP₃R2-НЕК, IP₃R3-НЕК и ТКО.

Материалы и методы

В исследовании были применены методы флуоресцентной микроскопии для определения изменений цитоплазматической концентрации ионов кальция с помощью зонда Fluo-8 и интраплюминального уровня Ca²⁺ в ЭР с помощью сенсора R-CEPIA1er в клетках НЕК-293 и в линейных клетках IP₃R1-НЕК, IP₃R2-НЕК, IP₃R3-НЕК и ТКО-НЕК. Проводился фотолиз caged-Ins(145)P₃/PM. Число повторов и статистическая обработка данных позволяют делать достоверные выводы.

Результаты и обсуждение

Эта глава диссертационной работы Е.Н. Кочкиной состоит из 5 разделов. Первый из них посвящен общему анализу трансдукции сигнала ацетилхолина (АХ) в клетках WT-НЕК. Установлено, что активация АХ-ом кальциевого обмена в клетках НЕК происходит путем быстрого подъёма [Ca²⁺]_{цит} до фиксированного уровня по принципу всё или ничего. Е.Н. Кочкина трактует эти данные как проявление Са-индуцированного высвобождения Ca²⁺ через каналы IP₃R. Как отмечает автор диссертации, градуальность при увеличении концентрации АХ проявляется на уровне одиночной клетки в виде сокращения задержки перед осцилляцией. Величина подъёма [Ca²⁺]_{цит} не зависит от наличия нормального уровня ионов кальция снаружи и происходит путем активации InsP₃R. На уровне клеточной популяции рост концентрации АХ приводит к увеличению числа

реагирующих клеток, причем концентрационная зависимость характеризуется высокой кооперативностью.

В разделе 3.2. описаны результаты исследования роли каждого из трех каналов каналов IP3R в вызываемом АХ повышении $[Ca^{2+}]_{цит}$. Показано, в IP3R1-НЕК, IP3R2-НЕК, IP3R3-НЕК АХ вызывает пиковый подъем $[Ca^{2+}]_{цит}$ по принципу все или ничего. Во всех случаях при повышении концентрации АХ снижается время задержки перед осцилляцией $[Ca^{2+}]_{цит}$, однако в случаях IP3R2-НЕК и IP3R3-НЕК градуальность проявляется также в виде дополнительных осцилляторных подъемов $[Ca^{2+}]_{цит}$.

Следующей задачей исследования Е.Н. Кочкиной была изучение связи между экспрессией отдельных видов IP3R, скоростью утечки депонированного кальция и депо-зависимым входом Ca^{2+} (Раздел 3.3). Проведенные эксперименты показали, что в клетках IP3R1-НЕК и IP3R2-НЕК скорость утечки заметно ниже, чем в клетках дикого типа. Напротив, в клетках IP3R3-НЕК скорость утечки близка к скорости утечки в клетках НЕК-293, но при этом объем тапсигаргин-чувствительного Ca^{2+} -депо в IP3R3-НЕК существенно больше, чем в IP3R1-НЕК и IP3R2-НЕК. При расчете скоростей утечки с поправкой на этот показатель были получены соотношения их величин, соответствующие литературным данным об относительной базальной активности каналов в отсутствие InsP3. На основании этого Е.Н. Кочкина делает вывод об участии каналов IP3R в утечке ионов Ca^{2+} из ЭР в покоящихся клеток НЕК-293.

Описание регуляции $[Ca^{2+}]_{цит}$ в клетках ТКО-НЕК с нокаутом всех трех генов, кодирующих IP3R, вынесено в отдельный раздел 3.4.

В разделе 3.5 приведены дополнительные данные, подтверждающие основной вывод работы о способности каждого из трех видов каналов IP3R вызывать высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума.

Заключение и выводы

По совокупности полученных данных сделаны обоснованные выводы.

Замечания и вопросы

Красной нитью через всю диссертационную работу проходит утверждение, что «механизм CICR при участии IP3-рецепторов может обеспечивать постоянство амплитуды Ca^{2+} -ответов на агонисты» (стр.50). Не отрицая наличия механизма Ca^{2+} -индуцированного высвобождения Ca^{2+} , мне кажется, 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 AX может быть объяснено также не только лавинообразным ответом при достижении пороговой концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$, но и высокой кооперативностью в действии InsP_3 , поскольку функционально активный канал представляет собой тетramer из 4-х рецепторов InsP_3 . Характерным признаком CICR является распространение кальциевой волны. В связи с этим возникает вопрос, наблюдалось ли при активации клеток AX-ом это явление?

Есть небольшие замечания по тексту диссертации. В Главе Обзор литературы встречаются отдельные неточности формулировок. В частности, я не понял фразу на стр.22 – «VDAC1 (потенциал-зависимые анионные каналы типа 1, являющиеся основными каналами транспорта ионов Ca^{2+} на внешней митохондриальной мембране)».

В Главе 3 Результаты и обсуждение в отдельных случаях было бы полезно иметь больше информации для анализа результатов. Так, не сказано о том, каков уровень экспрессии отдельных видов IP3R в IP3R1-НЕК, IP3R2-НЕК, IP3R3-НЕК и в клетках дикого типа, хотя эти данные есть в статье Е.Н. Кочкиной. Поскольку основная гипотеза при объяснении данных – CICR, хорошо было бы в этой главе напомнить читателю, какова зависимость работы каждого из каналов от концентрации ионов кальция.

Стр.66. Высказывается предположение, что при повышенной концентрации Ca^{2+} в ЭР в отсутствие IP3R в клетках ТКО-НЕК индивидуальные SOC-каналы менее активны. Не ясно, на чем основано данное предположение.

Слабым местом раздела 3.4 является отсутствие рисунка с кривой тапсигаргин-индуцированного высвобождения Ca^{2+} в клетках ТКО-НЕК. Наличие такой диаграммы позволило бы читателям более четко оценивать роли IP3R в утечке Ca^{2+} их эндоплазматического ретикулума.

Как уже отмечено выше, автор диссертации Е.Н.Кочкина отмечает задержку перед осцилляцией $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$, которая уменьшается при возрастании концентрации AX. Однако, согласно её же данным, градуальность кальциевого ответа клеток на AX проявляется также в виде увеличивающегося плеча с повторными осцилляциями на кривой повышения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ (рис.4). Как отмечено выше, при рассмотрении зависимости ответа на AX одиночных линейных клеток хорошо видно, что в клетках IP3R2-НЕК и IP3R3-НЕК размер плеча и число осцилляций увеличивается при росте концентрации AX (рис.8), тогда как клетки IP3R1-НЕК не проявляют такой реакции. Мне кажется, это явление также можно было отметить и обсудить.

Все приведенные замечания имеют дискуссионный характер и не отражаются на качестве работы. В исследовании, проведенном Е.Н. Кочкиной, получены оригинальные данные, способствующие более глубокому пониманию механизмов рецепторзависимой регуляции $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$. Результаты четко изложены, диссертация написана ясным языком, хорошо иллюстрирована и заслуживает высокой оценки.

Заключение

Диссертация Екатерины Николаевны Кочкиной «Вклад различных изоформ IP3-рецептора в Са-сигнализацию в клетках НЕК-293», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата

биологических наук по специальности 1.5.2. — Биофизика, является законченной научно-квалифицированной работой. Считаю, что она соответствует требованиям п.9-14 действующей редакции «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденная Постановление Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 25.01.2024 №62), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Екатерина Николаевна Кочкина заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. — Биофизика.

Авдонин Павел Владимирович,
Заведующий лабораторией физиологии рецепторов и сигнальных систем
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института
биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
профессор, доктор биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

«20» августа 2025 г.

П.В. Авдонин

«Подпись П.В. Авдонина заверяю»
Учёный секретарь ИБР РАН, к.б.н.



Хабарова М.Ю.

Контактные данные:

тел: + 7(499) 135-70-09, e-mail: pavel.avdonin@idbras.ru

Адрес места работы: 119334, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 26

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Телефон: +7 (499) 135-33-22, e-mail: info@idbras.ru

Сведения об официальном оппоненте
по диссертации Кочкиной Екатерины Николаевны «Вклад различных изоформ IP₃-рецептора в Ca²⁺-сигнализацию в клетках НЕК-293» на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. – Биофизика

Фамилия, имя, отчество	Авдонин Павел Владимирович
Гражданство	Российская Федерация
Ученая степень, наименование отрасли науки, научных специальностей, по которым защищена диссертация	Доктор биологических наук (шифр специальности 1.5.4. Биохимия)
Ученое звание	Профессор
Полное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
Сокращенное наименование организации в соответствии с уставом	ИБР РАН
Ведомственная принадлежность организации	Министерство науки и высшего образования РФ
Полное наименование кафедры, лаборатории	Лаборатория физиологии рецепторов и сигнальных систем
Должность	Заведующий лабораторией
Почтовый индекс, адрес организации	119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 26.
Веб-сайт организации	http://idbras.ru/
Телефон	+7 (499) 135-70-09
Адрес электронной почты	pavel.avdonin@idbras.ru
Являетесь ли Вы работником (в том числе по совместительству) организаций, где работает соискатель ученой степени, его научный руководитель?	Не являюсь
Являетесь ли Вы работником (в том числе по совместительству) организаций, где ведутся научно-исследовательские работы, по которым соискатель ученой степени является руководителем или работником организации-заказчика или исполнителем (соисполнителем)?	Не являюсь
Являетесь ли Вы членом Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования науки Российской Федерации?	Не являюсь
Являетесь ли Вы членом экспертных советов Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования	Не являюсь

науки Российской Федерации?	
Являетесь ли Вы членом диссертационного совета, принялшего диссертацию защите?	Не являюсь
Являетесь ли Вы соавтором соискателя степени по опубликованным работам по теме диссертационного исследования?	Не являюсь
Список основных публикаций в рецензируемых изданиях, монографии, учебники за последние пять лет по теме диссертации (не более 15 публикаций)	
<p>1. Avdonin P.V., Nadeev A.D., Mironova G.Yu., Zharkikh I.L., Avdonin P.P., Goncharov N.V. Enhancement by Hydrogen Peroxide of Calcium Signals in Endothelial Cells Induced by 5-HT1B and 5-HT2B Receptor Agonists // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2019. Article ID 1701478, 8 pages.</p> <p>2. Avdonin P.V., Rybakova E.Yu., Avdonin P.P., Trufanov S.K., Mironova G.Yu., Tsitrina A.A., Goncharov N.V. VAS2870 inhibits histamine-induced calcium signaling and vWF secretion in human umbilical vein endothelial cells. Cells 2019, 8(2), 196.</p> <p>3. А. В. Муравьев, П. В. Авдонин, И. А. Тихомирова, С. В. Булаева, Ю. В. Малышева. Влияние газотрансмиттеров на мембранный эластичность и микрореологию эритроцитов. Биологические мембранны, 2019, том 36, № 4, с. 281–289.</p> <p>4. Trufanov S.K., Rybakova E.Y., Avdonin P.P., Tsitrina A.A., Zharkikh I.L., Goncharov N.V., Jenkins R.O., Avdonin P.V. The Role of Two-Pore Channels in Norepinephrine-Induced $[Ca^{2+}]_i$ Rise in Rat Aortic Smooth Muscle Cells and Aorta Contraction. Cells. 2019 Sep 25;8(10). pii: E1144.</p> <p>5. Muravyov, A.V., Tikhomirova, I.A., Avdonin, P.V., Bulaeva, S.V., Malisheva, J.V. Comparative efficiency of three gasotransmitters (nitric oxide, hydrogen sulfide and carbon monoxide): Analysis on the model of red blood cell microrheological responses. Journal of Cellular Biotechnology, 2021, 7(1), 1–9</p> <p>6. Труфанова Е. В., Анненкова Е. М., Труфанов С. К. Влияние ингибитора НАДФН-оксидаз VAS2870 на кальциевый сигнал одиночных эндотелиальных клеток // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация: Сборник статей. – Пущино: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 2021. – С. 189–193.</p> <p>7. Гончаров Н.В., Васильев К.А., Кудрявцев И.В., Авдонин П.П., Белинская Д.А., Стукова М.А., Шамова О.В., Авдонин П.В. Экспериментальный поиск новых средств патогенетической терапии COVID-19: ингибитор H2-рецепторов фамотидин усиливает эффект осельтамивира на выживаемость и иммунный статус мышей, инфицированных A/PR/8/34 (H1N1). Российский физиологический журнал им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 2, с. 202–221.</p> <p>8. Goncharov N.V., Vasilyev K.A., Kudryavtsev I.V., Avdonin P.P., Belinskaia D.A., Stukova M.A., Shamova O.V., Avdonin P.V. Experimental Search for New Means of Pathogenetic Therapy COVID-19: Inhibitor of H2-Receptors Famotidine Increases the Effect of Oseltamivir on Survival and Immune Status of Mice Infected by A/PR/8/34 (H1N1) // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2022. Vol. 58(1). P. 230-246.</p> <p>9. Авдонин П. П., Рыбакова И.Ю., Труфанов С.К., Авдонин П.В. Рецепторы SARS-CoV-2 и их участие в инфицировании клеток. Биологические мембранны. 2022. Т. 39. № 6. С. 419–430.</p>	

10. Rybakova E.Yu., Avdonin P.P., Trufanov S.K., Goncharov N.V., Avdonin P.V. Synergistic Interaction of 5-HT1B and 5-HT2B Receptors in Cytoplasmic Ca²⁺ Regulation in Cells: Possible Involvement in Pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 13833.
11. Belinskaia, D.A., Voronina, P.A., Popova, P.I., Avdonin P.1, Jenkins, R.O., Goncharov, N.V. Albumin Is a Component of the Esterase Status of Human Blood Plasma/*International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24(12). Art. no. 10383.
12. Avdonin PP, Blinova MS, Generalova GA, Emirova KM, Avdonin PV. The Role of the Complement System in the Pathogenesis of Infectious Forms of Hemolytic Uremic Syndrome. *Biomolecules*. 2023 Dec 27;14(1):39.
13. Avdonin PP, Rybakova EY, Trufanov SK, Avdonin PV. SARS-CoV-2 Receptors and Their Involvement in Cell Infection. *Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol.* 2023;17(1):1-11.
14. Кузьмина Е.С., Нечаева М.В., Авдонин П.В. Роль NAADP в поддержании спонтанных сокращений сердца: сравнительно-физиологические исследования//*Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 16. Биология / Lomonosov Biology Journal*. 2024. Т. 79. № 2S. С. 65–72.
15. Авдонин П.П., Маркитанова Ю.В., Рыбакова Е.Ю., Гончаров Н.В., Авдонин П.В. Активация гистамином сорбции фактора комплемента C3/C3b на поверхности эндотелиальных клеток как одна из причин повреждения эндотелия при COVID-19//*Биологические мембранны*. 2024. Т. 41. № 1. С. 73-81.

8 июля 2025 г.

Подпись


(Авдонин Павел Владимирович)

«Подпись П.В. Авдонина заверяю»
Учёный секретарь ИБР РАН, к.б.н.


Хабарова М.Ю.
