

На правах рукописи

ЕВТУШЕНКО АННА АЛЕКСАНДРОВНА

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ
ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ TRP ИОННЫХ КАНАЛОВ ПРИ
ТЕМПЕРАТУРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ НА ОРГАНИЗМ В НОРМЕ
И ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ**

03.03.01 – физиология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2016

Работа выполнена в лаборатории термофизиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» (НИИФФМ, г. Новосибирск).

Научный руководитель –

Тамара Владимировна Козырева, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией термофизиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» (НИИФФМ).

Официальные оппоненты:

Валентин Андреевич Вавилин, доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории метаболизма лекарств и фармакокинетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» (НИИМББ, г. Новосибирск)

Дмитрий Валерианович Петровский, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики лабораторных животных Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск).

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, (г. Санкт-Петербург).

Защита диссертации состоится «___» _____ 2016 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 001.014.01 при НИИФФМ (630117, а/я 237, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4, e-mail: dissovet@physiol.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФФМ и на сайте <http://www.physiol.ru/>.

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



В.Н. Мельников

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Система терморегуляции, обеспечивающая температурный режим всех процессов, протекающих в живом организме, представляет собой одну из важнейших гомеостатических систем. Как и любая функциональная гомеостатическая система, она включает в себя сенсорные образования – терморцепторы (афферентное звено), структуры центральной нервной системы, где осуществляется обработка температурной информации (в первую очередь гипоталамус – центральное звено системы терморегуляции), и исполнительные органы – эффекторное звено.

В настоящее время интенсивно ведутся исследования, касающиеся клеточных и молекулярных механизмов температурной чувствительности. На роль молекулярной основы термочувствительности претендуют различные ионные каналы и в наибольшей степени – недавно идентифицированные TRP ионные каналы, которые, по мнению целого ряда авторов (McKemy et al., 2002; Jordt et al., 2003; Nilius, Flockerzi, 2014), и являются первичными детекторами изменений температуры у теплокровных животных. Наиболее признанными считаются 6 термочувствительных TRP ионных каналов. Два холодочувствительных, активирующихся при понижении температуры: ниже 17°C – TRPA1, и ниже 28°C – TRPM8 (McKemy, 2005; Karashima et al., 2009; McCoy et al., 2011); а также 4 теплочувствительных, которые активируются при повышении температуры: TRPV1 – от 42°C и выше, TRPV2 – от 52°C и выше, TRPV3 – в диапазоне 31-39°C, и TRPV4 – от 25 до 42°C (Jordt et al., 2003; Vay et al., 2012). Все вместе они охватывают диапазон температур, воспринимаемых большинством млекопитающих. Для некоторых TRP ионных каналов показано наличие нетемпературных агонистов – ментол для TRPM8, горчичное масло и корица для TRPA1, капсаицин для TRPV1 (Hinman et al., 2006) и камфора для TRPV3 (Xu et al., 2006). Можно предположить, что их нетермическая активация вызовет сходные реакции, как и при температурном воздействии, что позволит оценить влияние активации TRP каналов в формировании температурного сигнала.

Проблемам терморегуляции с позиции интегрирования молекулярного и организменного уровня пока не уделяется достаточного внимания. Генетические механизмы температурной чувствительности также являются совершенно неисследованной областью. Исследования реакций, опосредованных TRP ионными каналами при температурных воздействиях, активно ведутся на культурах клеток, однако, функциональная роль этих ионных каналов в реакциях целого организма остается неясной. Поэтому вопрос, касающийся температурной чувствительности, как на периферии, так и в центральных структурах, и участия в этом различных TRP каналов, остается открытым. В связи с освоением территорий, климатической особенностью которых являются низкие температуры, не менее важными являются вопросы о механизмах изменения термочувствительности теплокровного организма при смене температурных условий обитания и возможном участии в этом TRP каналов.

На сегодняшний день термочувствительные TRP ионные каналы рассматривают как перспективные мишени терапевтических воздействий, так как показано их участие в патогенезе целого ряда заболеваний (Nilius et al., 2007; Vay

et al., 2012; Zholos, Curtis, 2013).

Артериальная гипертензия, характеризующаяся стойким повышением артериального давления, является одним из самых распространенных заболеваний. Наличие у теплокровного организма повышенного артериального давления ведет к изменению его реакций на температурные воздействия (Krista et al., 1979; Kirby et al., 1999; Chambers et al., 2000). Однако сведения о функционировании терморегуляторной системы при артериальной гипертензии немногочисленны и противоречивы. Остаются не до конца выясненными механизмы поддержания температурного гомеостаза, в том числе возможное участие термочувствительных TRP ионных каналов в системе температурного гомеостаза при артериальной гипертензии.

Изменения температурной чувствительности организма, происходящие под влиянием температурных стимулов, а также наблюдаемые при артериальной гипертензии, могут быть связаны с изменением в работе тех или иных термочувствительных ионных каналов, что в свою очередь должно найти отражение в функционировании генома – уменьшении или увеличении экспрессии генов, кодирующих эти ионные каналы.

Цель исследования – выявить функциональные изменения активности (экспрессии) генов термочувствительных TRP ионных каналов при температурных воздействиях на организм в норме и при артериальной гипертензии.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительное исследование активности генов термочувствительных TRP ионных каналов в различных структурах мозга, включая гипоталамус – центр регуляции висцеральных функций (терморегуляции и артериального давления).

2. Выяснить влияние длительной адаптации организма к холоду на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в центральных структурах мозга.

3. Оценить влияние гипертензивного состояния на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в функционально различных отделах гипоталамуса (переднем и заднем), а также периферическом органе иммунной системы – селезенке, у нормотензивных и гипертензивных животных.

4. Оценить влияние острого холодового воздействия на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в центре терморегуляции – гипоталамусе, в норме и при артериальной гипертензии.

5. Выяснить влияние активации периферического термочувствительного ионного канала TRPM8 его агонистом ментолом, на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в центре терморегуляции – гипоталамусе в норме и при артериальной гипертензии.

6. Исследовать влияние активации периферического кожного ионного канала TRPM8 на терморегуляторные (метаболические и сосудистые) показатели у нормотензивных и гипертензивных животных при остром охлаждении.

Научная новизна работы

- Впервые проведено сопоставление и показана неравнозначная экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов в различных структурах мозга. Экспрессия теплочувствительных TRP ионных каналов в мозге выше чем, экспрессия генов холодочувствительных TRP каналов. В функционально различных отделах гипоталамуса – переднем и заднем, наблюдаются различия в экспрессии генов TRP ионных каналов: в переднем гипоталамусе повышена экспрессия холодочувствительного ионного канала TRPM8, в заднем отделе гипоталамуса наблюдается более высокая экспрессия генов теплочувствительного ионного канала TRPV1 и, реагирующего на болевые низкие температуры, ионного канала TRPA1.

- Впервые показана вовлеченность геномного уровня регуляции при температурных воздействиях как длительных, так и острых. Длительная адаптация организма к холоду приводит к специфичным для гипоталамуса изменениям – снижению экспрессии гена ионного канала TRPV3, тогда как острое охлаждение приводит к повышению экспрессии гена ионного канала TRPV3.

- Впервые установлено, что наследственная стресс-индуцированная артериальная гипертензия сопровождается изменением экспрессии генов TRP ионных каналов в центре регуляции висцеральных функций – гипоталамусе, так экспрессия гена холодочувствительного ионного канала TRPM8 снижена в переднем отделе гипоталамуса, а экспрессия гена теплочувствительного TRPV4 ионного канала повышена в заднем отделе гипоталамуса. Изменение экспрессии генов затрагивают также и периферические висцеральные органы – в селезенке наблюдается значительное снижение экспрессии генов холодочувствительных ионных каналов TRPM8 и TRPA1.

- Впервые показано функциональное взаимодействие TRP ионных каналов периферической и центральной нервной системы на уровне изменения экспрессии генов. Активация периферического ионного канала TRPM8 его агонистом ментолом приводит к сходным с острым охлаждением изменениям в экспрессии генов TRP ионных каналов. У нормотензивных животных наблюдается в том и другом случае повышение экспрессии гена ионного канала TRPV3 в заднем отделе гипоталамуса. У гипертензивных животных, имеющих исходно сниженную экспрессию гена *Trpm8*, активация периферического кожного ионного канала TRPM8, как и охлаждение, приводит к значительному увеличению экспрессии гена *Trpm8* в переднем отделе гипоталамуса.

- Впервые показано, что снижение экспрессии гена холодочувствительного ионного канала TRPM8 у гипертензивных животных сопровождается функциональными изменениями реакции организма на холод. У гипертензивных животных, в отличие от нормотензивных, активация ионного канала TRPM8 его агонистом ментолом не вызывает уменьшения температурных порогов терморегуляторных реакций при медленном глубоком охлаждении.

Положения, выносимые на защиту

1. В функционально различных структурах мозга экспрессия генов термочувствительных TRP ионных каналов неравнозначна, при этом уровень экспрессии теплочувствительных TRP ионных каналов во всех исследованных отделах мозга значительно выше, чем экспрессия генов холодочувствительных TRP ионных каналов. В функционально различных отделах гипоталамуса – переднем и заднем, наблюдаются различия в экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов.

2. В поддержание температурного гомеостаза при холодовом воздействии на организм как длительном, так и остром вовлечен геномный уровень регуляции активности термочувствительных TRP ионных каналов.

3. Наследственная индуцированная стрессом артериальная гипертензия сопровождается изменением активности (экспрессии) генов TRP ионных каналов в центре регуляции висцеральных функций – гипоталамусе, а также в периферическом висцеральном органе – селезенке. Изменения активности генов TRP ионных каналов в гипоталамусе в ответ на холодовое воздействие у нормо- и гипертензивных животных различны.

4. Взаимодействие TRP ионных каналов периферической и центральной нервной системы на уровне экспрессии генов изменено при артериальной гипертензии и сопровождается функциональными (метаболическими и сосудистыми) изменениями реакции организма на холод. У гипертензивных животных, имеющих исходно сниженную экспрессию гена *Trpm8*, ослаблена чувствительность к активации периферического кожного ионного канала TRPM8.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы

Настоящая работа объединяет молекулярно-генетический и организменный уровни исследования функциональной роли термочувствительных TRP ионных каналов. Полученные новые знания расширяют представления об участии термочувствительных TRP каналов в регуляции термозащитных реакций при действии холода на организм, позволяют приблизиться к пониманию физиологического значения этих каналов, а также молекулярных механизмов поддержания температурного гомеостаза в норме и при такой патологии как артериальная гипертензия. Кроме того полученные данные могут представлять собой платформу для планирования экспериментов, направленных на дальнейшее выяснение физиологической роли этих ионных каналов.

Полученные данные используются в курсе лекций «Физиология сенсорных систем» для студентов факультета естественных наук Новосибирского Государственного Университета.

Апробация результатов

Полученные результаты были представлены и обсуждены на XLIX международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2011); The 4th International Symposium on Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation (Rio de Janeiro, Brazil, 2012); VIII международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для

медицины и психологии» (Судак, 2012), VII Сибирском физиологическом съезде (Красноярск, 2012); International Summer School: «Neurogenetics. Unraveling behavior and brain mechanisms using modern technologies» (Zvenigorod, 2012); Всероссийской научной конференции молодых ученых-медиков «Инновационные технологии в медицине XXI века» (Москва, 2012); XXII Съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Волгоград, 2013); X международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2014); VII Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2015); XI международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2015); IV международной междисциплинарной конференции «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций» (Москва, 2015).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых отечественных (1) и иностранных (3) журналах, 13 тезисов в сборниках материалов конференций.

Структура и объем работы

Диссертация включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение результатов, выводы, список цитируемой литературы (433 источника). Работа изложена на 158 страницах, содержит 24 рисунка и 21 таблицу.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. Эксперименты проводили на самцах крыс линии Wistar, нормотензивной линии WAG (Wistar Albino Glaxo) и крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ) (Маркель, 1985; Markel, 1992) весом 250-350 грамм. Животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и корму. Содержание экспериментальных животных и все процедуры были выполнены в соответствии с международными правилами обращения с животными от 24 ноября 1986 (86/609/ЕЕС).

Длительное температурное воздействие. Адаптация животных к холоду проводилась в течение 5 недель при температуре окружающей среды $+4+6^{\circ}\text{C}$ и освещении 12 часов – свет/12 часов – темнота (Hart, 1964). Контрольные животные находились в стандартных условиях вивария при температуре $+20+22^{\circ}\text{C}$.

Острое температурное воздействие. В экспериментах использовались два типа глубокого охлаждения: быстрое и медленное. При быстром охлаждении скорость снижения температуры кожи в области приложения холодого стимула составила $0,1^{\circ}\text{C}/\text{сек}$, что обеспечивало присутствие динамической активности кожных холодовых рецепторов, при медленном охлаждении – $0,005-0,008^{\circ}\text{C}/\text{сек}$, что исключало появление динамической активности кожных холодовых рецепторов. Охлаждение продолжалось до снижения глубокой температуры тела на $3-3,5^{\circ}\text{C}$.

Схема проведения быстрого и медленного охлаждения. Эксперименты проводились на наркотизированных животных при температуре окружающей среды +21+24°C. Животное находилось на термостатируемом (38°C) столике, и регистрировались исходные терморегуляторные параметры, после чего начиналось охлаждение (термодом площадью 25 см² в области живота). Контролем служили животные без холодового воздействия.

Регистрация физиологических параметров (ректальной температуры, температуры изолированного от среды участка кожи ушной раковины, температуры кожи хвоста, внутрикожная температура охлаждаемой поверхности живота, общего потребления кислорода, концентрации CO₂ в выдыхаемом воздухе и электрической активности мышц шеи) велась непрерывно в течение эксперимента с помощью приборов и программы AcqKnowledge компании BIOPAC Systems, Inc., США. Изменение температуры кожи живота позволяло определить скорость охлаждения и оценить пороговую кожную температуру возникновения термозащитных реакций. По ректальной температуре судили об изменении глубокой температуры тела и рассчитывали пороговую глубокую температуру эффекторных реакций. Метаболическая реакция организма оценивалась по изменению общего потребления кислорода, который отражает общий термогенез (сократительный и несократительный) и по изменению электрической активности мышц, отражающей сократительный термогенез. Концентрация выделяемого углекислого газа позволяла производить вычисление дыхательного коэффициента (CO₂/O₂), характеризующего преимущественный субстрат окисления. О констрикторной реакции кожных сосудов и изменении теплоотдачи судили по кожной температуре ушной раковины и хвоста.

Аппликация ментола. При изучении влияния активации ионного канала TRPM8 агонистом ментолом на терморегуляторные параметры в термонеutralных условиях производилась аппликация 1% суспензии ментола в физиологическом растворе или физиологического раствора (контроль) на кожу живота площадью 25см², в области последующего приложения холодового стимула. Продолжительность аппликации составляла 20 минут.

Определение экспрессии генов. После окончания эксперимента животных декапитировали и забирали биологический материал: структуры головного мозга – гипоталамус, фронтальную кору, гиппокамп, средний мозг; в качестве периферического органа была взята селезенка. Пробы, помещенные в стерильные пробирки «Эппендорф», замораживали жидким азотом и хранили при -70°C до выделения суммарной РНК.

Суммарная РНК была выделена экстракцией фенолом, гуанидиниизоцианатом и хлороформом по методу Chomczynski, Sacchi (1987). Пробы суммарной РНК разводили деионизированной водой, обработанной диэтилпирокарбонатом (DEPC), до концентрации 0,15 мкг/мкл и хранили при температуре -70 °С.

Экспрессию генов определяли количественным методом ОТ-ПЦР (Науменко, Куликов, 2005; Kulikov et al., 2005). В качестве внешнего стандарта использовали геномную ДНК крысы известной концентрации. В качестве внутреннего стандарта – гены «домашнего хозяйства» – ген ДНК-зависимой РНК-полимеразы

II (*Polr2a*) и ген пептидил-пролил цис-транс изомеразы A (*Ppia*). Уровень мРНК интересующего нас гена пересчитывался на уровень мРНК гена *Polr2a* или *Ppia* и выражался в числе копий мРНК соответствующего гена на 100 копий гена домашнего хозяйства.

Все праймеры (Таблица 1.), использованные в настоящем анализе, были разработаны на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide, и синтезированы в компании «Биосинтез» (Россия).

Таблица 1. Характеристики праймеров, использованных для определения уровня мРНК термочувствительных TRP ионных каналов в мозге и селезенке крыс

| Ген | Нуклеотидная последовательность | Температура отжига, °С | Размер ПЦР-продукта (пар нуклеотидов) | Количество циклов амплификации |
|---------------|--|------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| <i>Trpv1</i> | F 5'-ATGGAGTCCACACCACACAAG R 5'-TGAGCATGTTGAGCAGAAGG | 60 | 211 | 34 |
| <i>Trpv2</i> | F 5'-CCAAGCCCCTCGTCAATGCCC R 5'-GAGGTGAACATCCGCTCCATTCTCTAC | 60 | 131 | 30 |
| <i>Trpv3</i> | F 5'-CATGTACCAACCAGCCTGAG R 5'-GCGTGAGACCGTCATTGTT | 56 | 222 | 35 |
| <i>Trpv4</i> | F 5'-TCTGGTCAC CCTCCTGAATC R 5'-CTTGCTCTCCTTGGACACCT | 63 | 298 | 36 |
| <i>Trpm8</i> | F 5'-GAAGCCCATTGACAAGCACAAG R 5'-ACGAAGACCAGGGCATAGAG | 64 | 189 | 36 |
| <i>Trpa1</i> | F 5'-TTTGGAAAAGCAGCACGAG R 5'-TGGGTGGCTAATAGAACAATGTG | 60 | 193 | 36 |
| <i>Polr2a</i> | F 5'-TTGTGCGGGCAGCAGAACGTG R 5'-CAATGAGACCTTCTCGTCTCTCCC | 64 | 186 | 29 |
| <i>Ppia</i> | F 5'-CCGACTGTGGACAACCTAAT R 5'-ACTTGAAGGGGAATGAGGAAA | 61,5 | 168 | 28 |
| <i>Tph1</i> | F 5'-GAAAGTATTTTCGCAGAGCTGG R 5'-GGCGTGGGTTGGGTAGAGTTTGTGTT | 62 | 283 с интроном 134 без интрона | 38 |

Статистический анализ данных проводился с помощью пакета программ Statistica 8 и программы Microsoft Excel. Результаты представлены как $M \pm m$. Достоверность результатов оценивалась с использованием t-критерия Стьюдента для независимых переменных, межгрупповые сравнения проводились с помощью многофакторного дисперсионного анализа ANOVA с использованием post-hoc тест Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Экспрессия генов термочувствительных TRP ионных каналов в структурах мозга

В представленной работе впервые проведено сравнительное исследование уровня экспрессии генов 6 наиболее признанных термочувствительных TRP ионных каналов в центре терморегуляции – гипоталамусе, а также в таких отделах мозга как фронтальная кора, средний мозг и гиппокамп у типичных теплокровных животных – крыс.

Согласно нашим результатам во всех исследованных структурах мозга крыс

активно экспрессируются гены теплочувствительных TRP ионных каналов – TRPV1, TRPV2, TRPV3 и TRPV4, в то время как уровень экспрессии генов холодочувствительных TRP ионных каналов – TRPA1 и TRPM8, значительно ниже (Рисунок 1.).

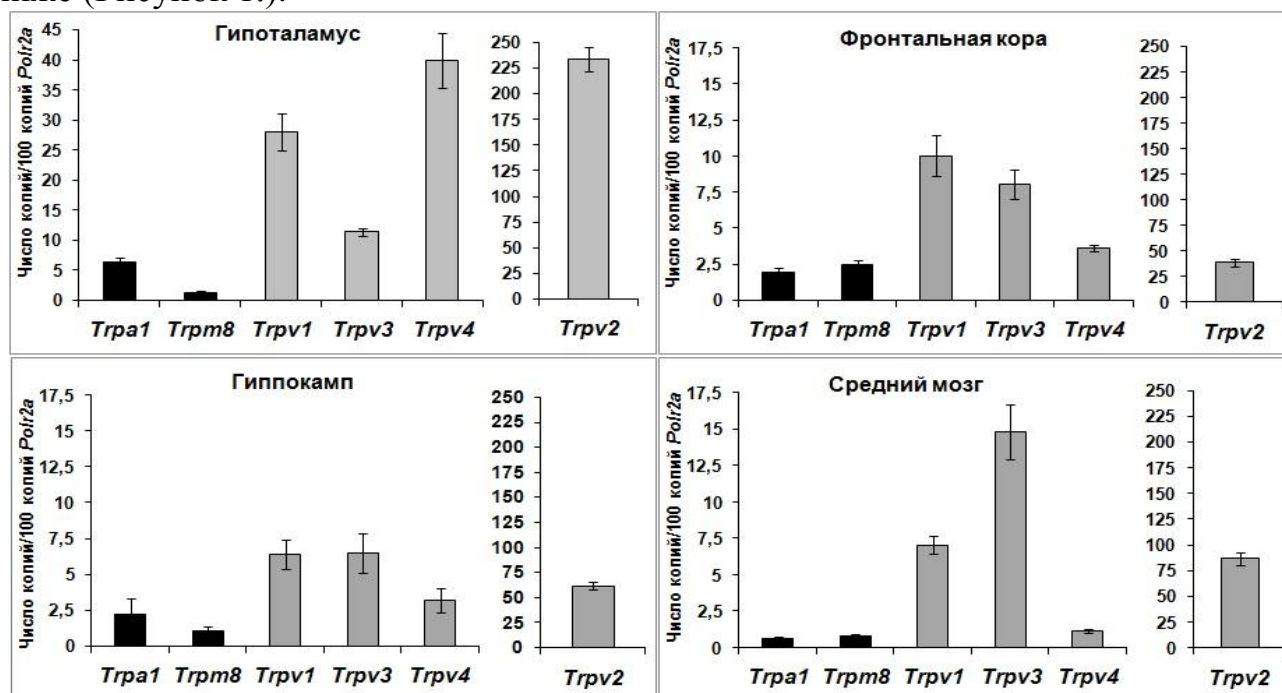


Рисунок 1. Уровень мРНК генов термочувствительных TRP ионных каналов в исследованных отделах мозга крыс. $n=10$

Ионные каналы TRPA1 и TRPM8 рассматриваются как молекулярная основа физиологических ощущений холода (Viana et al., 2002; Pataroutian et al., 2003; McKemy, 2005). Обнаруженный нами факт невысокой экспрессии их генов вполне согласуется с нейрофизиологическими данными о преобладании теплочувствительных нейронов в центральной нервной системе по сравнению с периферической (Brück, Zeisberger, 1986; Kozyreva, Pierau, 1994; Boulant, 1998).

Во всех исследованных отделах головного мозга наблюдается высокая экспрессия гена *Trpv2* (обратите внимание на масштаб шкалы графиков!), сопоставимая с экспрессией генов «домашнего хозяйства» (housekeeping genes). Это позволяет выдвинуть предположение об его участии в жизненно важных процессах клеток головного мозга. В пользу этого предположения свидетельствуют и некоторые литературные данные (Kojima, Nagasawa, 2007; Shibasaki et al., 2010; Park et al., 2011).

Сравнение экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов в исследованных областях мозга крыс показало, что уровень их экспрессии, как правило, выше в гипоталамусе ($p < 0,001$), чем в других областях мозга (Рисунок 2.). Это может быть связано с исключительной ролью гипоталамуса в терморегуляции.

Иное соотношение наблюдалось для TRPV3 и TRPM8 (Рисунок 3.). Уровень мРНК *Trpv3* в среднем мозге оказался сопоставим с уровнем экспрессии этого гена в гипоталамусе ($p > 0,05$) и превышал ($p < 0,001$) значения этого показателя в других отделах. Уровень экспрессии гена *Trpv3* в гипоталамусе также превышал

($p < 0,05$) этот показатель во фронтальной коре и гиппокампе. Наивысшая экспрессия гена *Trpm8* зарегистрирована во фронтальной коре (Рисунок 3.). Известно, что температура коры мозга колеблется в достаточно широких пределах, допуская снижение температуры примерно на 1,5-2°C (Иванов, 1990). Не исключено, что именно этим обусловлен высокий уровень экспрессии гена ионного канала TRPM8, активирующегося при понижении температуры.

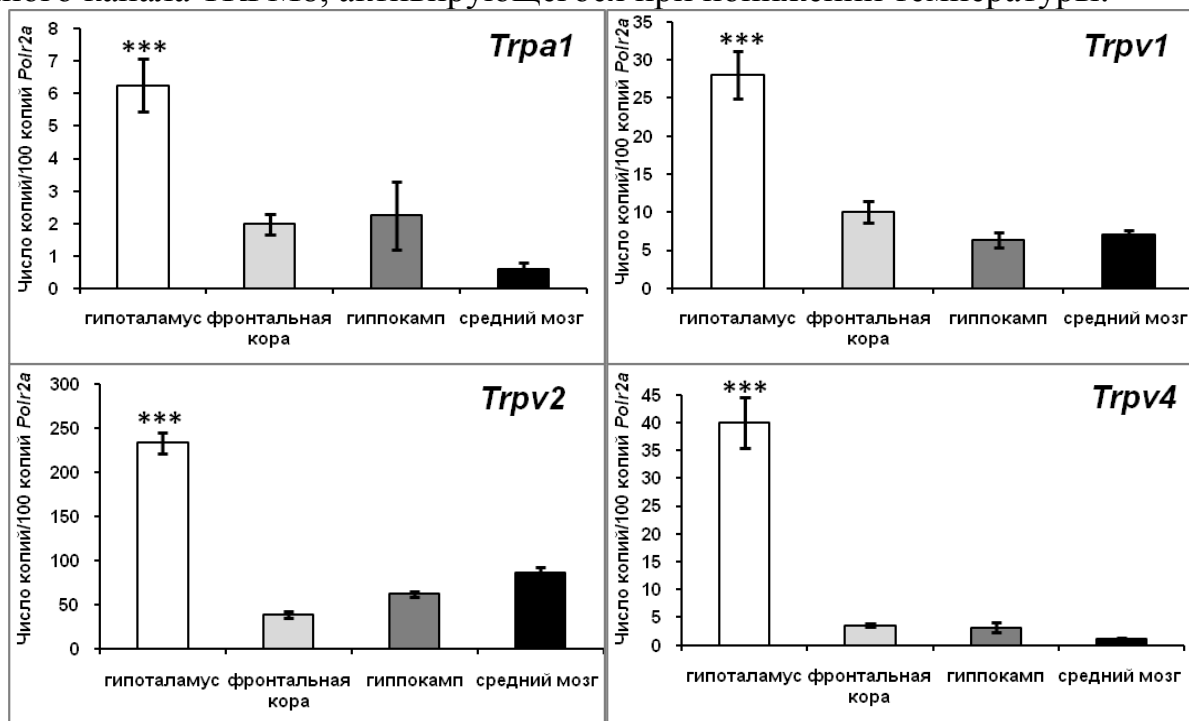


Рисунок 2. Уровень мРНК генов *Trpa1*, *Trpv1*, *Trpv2*, *Trpv4* в различных структурах мозга крыс. $n=10$, *** $p < 0,001$ – относительно исследованных структур мозга

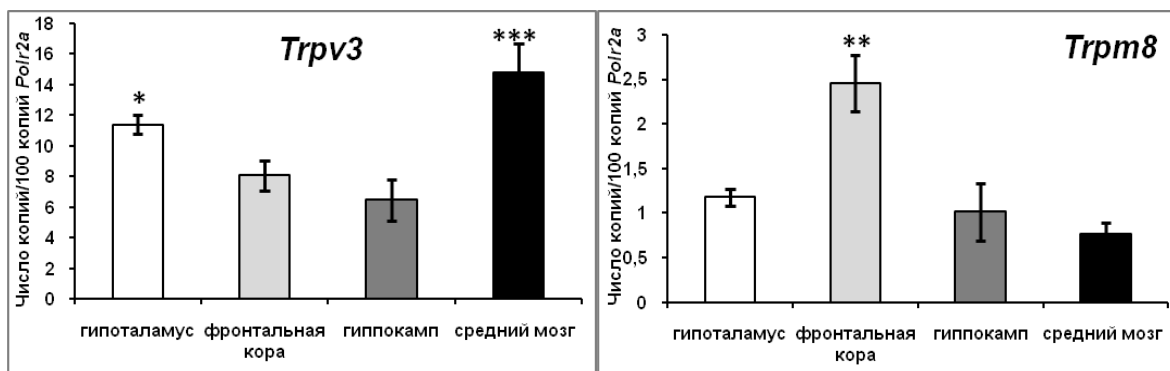


Рисунок 3. Уровень мРНК гена *Trpv3* и *Trpm8* в различных структурах мозга крыс. $n=10$, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ – для *Trpv3* относительно фронтальной коры и гиппокампа; ** $p < 0,01$ – для *Trpm8* относительно исследованных структур мозга

Таким образом, нами впервые показано, что гены всех 6 исследованных термочувствительных TRP ионных каналов в разной степени экспрессируются в таких отделах мозга крыс как гипоталамус, фронтальная кора, средний мозг и гиппокамп. До настоящего исследования сопоставить данные о наличии TRP каналов в структурах мозга не представлялось возможным, так как они были получены разными методами и на разных животных (Mezey et al., 2000; Liapi, Wood, 2005; Gavva et al., 2007; Du et al., 2009; Maione et al., 2011).

2. Влияние длительной адаптации организма к холоду на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в структурах мозга

Исследование экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов в мозге адаптированных к холоду крыс показало, что уровни их мРНК в таких отделах мозга как фронтальная кора, гиппокамп и средний мозг достоверно не отличаются от соответствующих показателей у контрольных животных. В гипоталамусе аналогичный результат был получен для генов теплочувствительных ионных каналов TRPV1, TRPV2, TRPV4 и холодочувствительных ионных каналов TRPA1 и TRPM8.

В отличие от всех остальных исследованных генов уровень экспрессии гена *Trpv3* оказался подвержен влиянию длительных температурных воздействий. После адаптации к холоду достоверно ($p < 0,001$) уменьшилась его экспрессия в гипоталамусе с $11,4 \pm 0,60$ до $7,98 \pm 0,63$ копий/100 копий *Polr2a* (Рисунок 4.).

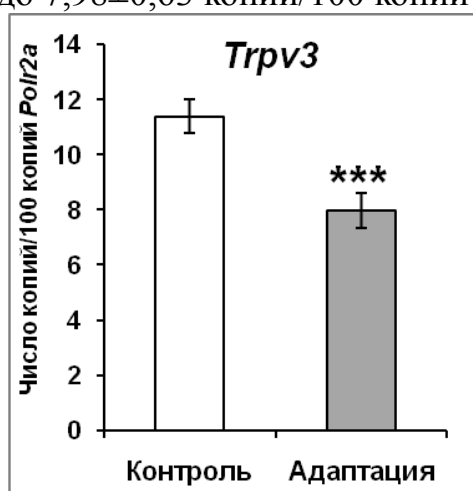


Рисунок 4. Уровень мРНК гена *Trpv3* в гипоталамусе контрольных и адаптированных к холоду крыс. $n=10$, *** $p < 0,001$

Снижение экспрессии гена ионного канала TRPV3 (активируется при температурах 31-39 °C) у адаптированных к холоду животных, позволяет предполагать его участие в обеспечении собственной температурной чувствительности и адаптивных изменений нейронов гипоталамуса. Это предположение подкрепляется данными Козыревой и Пирау (Козырева, Пирау, 1994) о снижении в результате адаптации к холоду доли нейронов гипоталамуса, чувствительных к изменению температуры в диапазоне 35-38 °C, то есть области функционирования ионного канала TRPV3.

3. Экспрессия генов термочувствительных TRP ионных каналов у крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией

Наличие у теплокровного организма повышенного артериального давления ведет к изменению его реакций на температурные воздействия (Krista et al., 1979; Kirby et al., 1999; Chambers et al., 2000). Ранее в нашей лаборатории на крысах линии НИСАГ получены данные, свидетельствующие об их измененной температурной чувствительности в сравнении с нормотензивными животными (Ломакина и др., 2002). Можно предположить, что температурная чувствительность у них изменена и в центре терморегуляции – гипоталамусе. Это

должно сказаться и на экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов. Необходимо отметить, что гипоталамус не является структурой однородной, его передняя и задняя части функционально различны, как в плане регулирования температуры тела, так и в поддержании кровяного давления.

Соотношение экспрессии генов TRP ионных каналов в функционально различных отделах гипоталамуса нормо-и гипертензивных крыс. Было обнаружено, что гены как теплочувствительных, так и холодочувствительных TRP каналов экспрессируются в обоих отделах гипоталамуса как у нормотензивных, так и гипертензивных животных. Для экспрессии генов *Trpv2* и *Trpv3*, не обнаружено зависимости ни от отдела гипоталамуса, ни от гипер- или нормотензивного состояния животного ($F_{1,35}=0,25$, $F_{1,35}=3,51$, $p>0,05$ – для *Trpv2* и *Trpv3*, соответственно). Экспрессия гена *Trpv2* в обоих отделах гипоталамуса у крыс обеих линий оказалась наиболее высокой, как это было описано выше (Рисунок 5.). Это еще раз подтверждает предположение об участии TRPV2 в жизненно важных процессах клеток головного мозга.

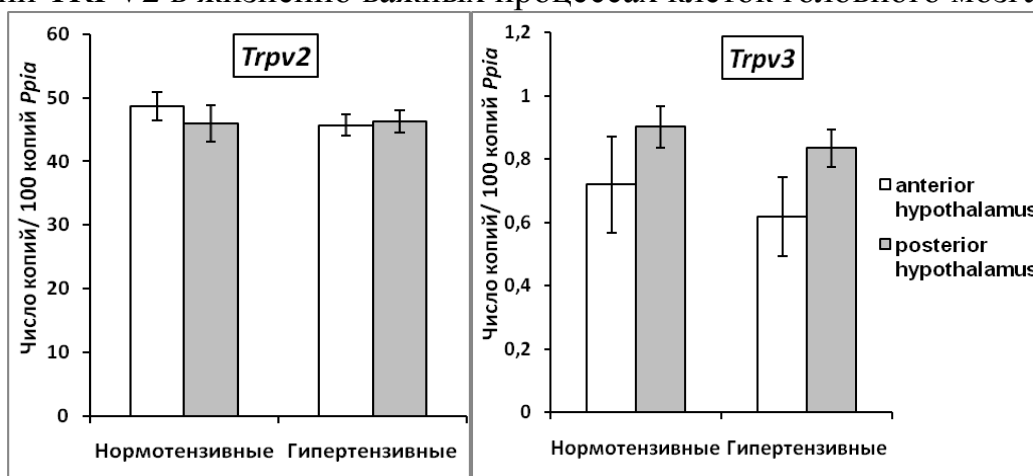


Рисунок 5. Уровень мРНК генов *Trpv2* и *Trpv3* в функционально различных отделах гипоталамуса нормо-и гипертензивных животных. $n=10$

Зависимость экспрессии гена от отдела гипоталамуса наблюдается для генов *Trpv1* и *Trpa1*. Уровень их мРНК в заднем гипоталамусе оказался выше, чем в переднем ($F_{1,36}=354,8$, $p<0,001$, $F_{1,35}=14,12$, $p<0,01$ – для *Trpv1* и *Trpa1*, соответственно). Это характерно для крыс обеих линий. Межлинейных различий в уровне мРНК ни для *Trpv1*, ни для *Trpa1* не прослеживается (Рисунок 6.). Надо полагать, наблюдаемые различия экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов в переднем и заднем отделах гипоталамуса могут быть связаны и с различиями в физиологической роли этих отделов.

Для *Trpv4* и *Trpm8* обнаружена зависимость экспрессии их генов как от отдела гипоталамуса, так и от гипер-или нормотензивного статуса животных. У гипертензивных крыс в заднем отделе гипоталамуса уровень мРНК *Trpv4* превышает этот показатель в переднем отделе, и превышает показатель для заднего отдела гипоталамуса нормотензивных крыс ($F_{1,34}=5,3137$, $p<0,05$) (Рисунок 7.). Что касается *Trpm8*, то в переднем гипоталамусе уровень мРНК этого гена выше, чем в заднем как у нормо-, так и у гипертензивных животных

($F_{1,35}=33,61$, $p<0,05$), но у крыс-гипертоников он значительно ниже, чем у нормотензивных животных ($F_{1,35}=17,0587$, $p<0,01$) (Рисунок 7.).

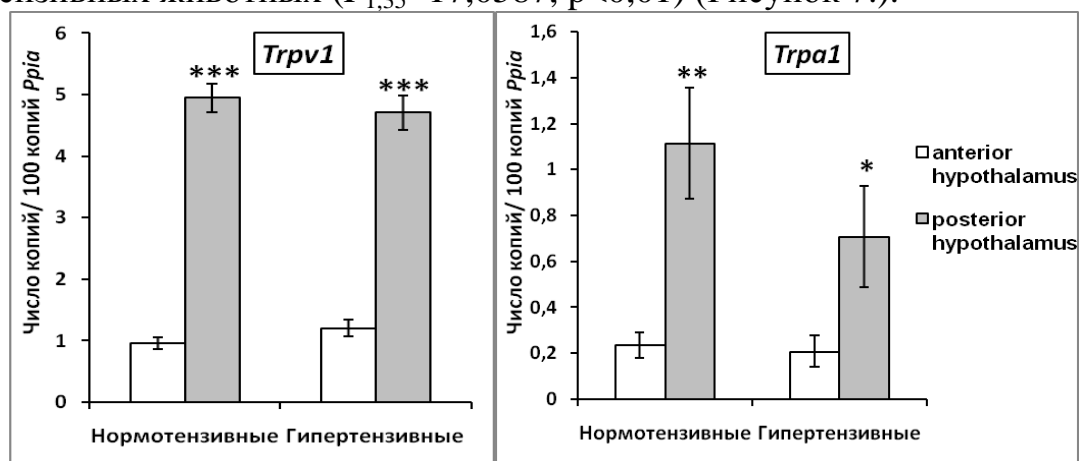


Рисунок 6. Уровень мРНК генов *Trpv1* и *Trpa1* в функционально различных отделах гипоталамуса нормо- и гипертензивных животных. $n=10$, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ – передний vs задний гипоталамус

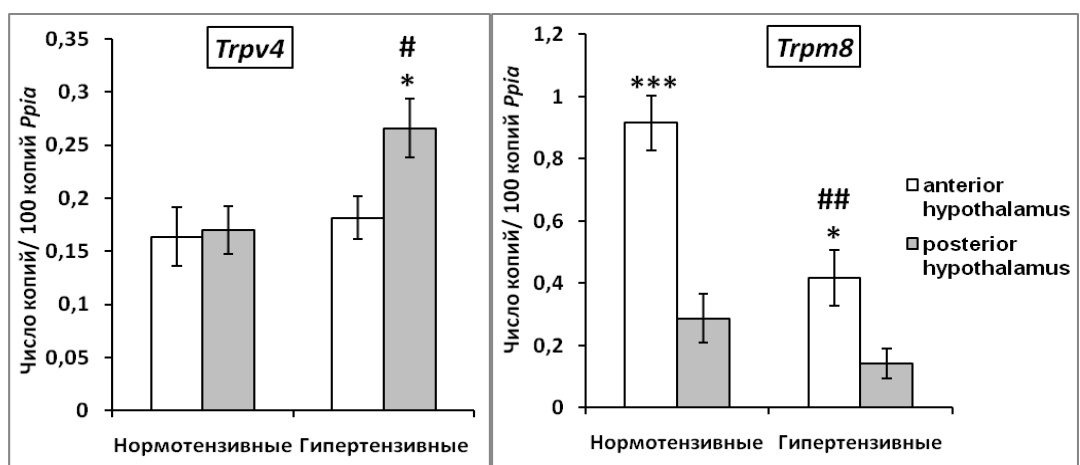


Рисунок 7. Уровень мРНК генов *Trpv4* и *Trpm8* в функционально различных отделах гипоталамуса нормо- и гипертензивных животных. $n=10$, * $p<0,05$; *** $p<0,001$ – передний vs задний гипоталамус; # $p<0,05$; ## $p<0,01$ – нормо vs гипертензивные животные

Известно, что у крыс гипертензивной линии НИСАГ по сравнению с нормотензивной WAG или Wistar имеют место изменения в электролитном составе в разных тканях (Антонов и др., 1998; Федосеева и др., 2011). Принимая во внимание, что TRPV4 был идентифицирован как осморорецептор (Liedtke et al., 2000; Strotmann et al., 2000; Wissenbach et al., 2000), нельзя исключить и возможность того, что обнаруженные нами межлинейные различия в экспрессии гена *Trpv4* в гипоталамусе, связаны с различиями в электролитном балансе животных исследованных линий.

Обнаруженное изменение экспрессии гена *Trpm8* у крыс гипертензивной линии по сравнению с нормотензивной позволяет предполагать вовлеченность этого гена в процессы, связанные с гипертензивным состоянием. Возможная связь области гена *TRPM8*, локализованного в районе 2q37.1 второй хромосомы (Voets et al., 2007), с регуляцией кровяного давления у людей была выявлена также при полногеномном исследовании ассоциаций (He et al., 2013). Эта связь была

обнаружена при изменении кровяного давления в ответ на холодовой прессорный тест, который введен в клиническую практику для оценки риска возникновения артериальной гипертензии (Matthews et al., 2004). Обнаруженное изменение экспрессии гена *Trpm8* в гипоталамусе у крыс в данном эксперименте с температурными воздействиями не связано и может быть интерпретировано только в связи с гипертензивным состоянием животных.

Роль TRPM8 гипоталамуса в механизмах влияния на кровяное давление остается неясной. Однако, тот факт, что в депрессорных областях (передний гипоталамус) экспрессия гена этого ионного канала более высокая, чем в прессорных (задний гипоталамус), и у нормотензивных животных выше, чем у гипертензивных, – позволяет предполагать вовлеченность ионного канала TRPM8 гипоталамуса в гипертензивное состояние животных.

Присутствие термочувствительных TRP ионных каналов как в переднем, так и в заднем отделах гипоталамуса функционально оправдано, поскольку и в том, и в другом его отделах имеются термочувствительные нейроны. Однако к настоящему моменту дать однозначный ответ на вопрос, какова роль того или иного TRP канала превалирует в том или ином отделе гипоталамуса, пока не представляется возможным.

Экспрессия генов термочувствительных TRP ионных каналов в селезенке – сравнение нормо- и гипертензивных крыс. Показанные различия в экспрессии генов TRP ионных каналов в гипоталамусе ставили вопрос – имеются ли особенности в экспрессии генов этих каналов в периферических висцеральных органах при артериальной гипертензии.

Наши исследования показали, что в органе иммунной системы – селезенке экспрессируются гены как теплочувствительных, так и холодоочувствительных TRP ионных каналов. Как и в исследованных структурах мозга отмечалась высокая экспрессия гена *Trpv2*, превышающая экспрессию других исследованных TRP каналов, что также подтверждает, высказанное предположение о важности ионного канала TRPV2 для процессов жизнедеятельности клеток, как головного мозга, так и всего организма в целом.

Для генов теплочувствительных TRP ионных каналов – TRPV1, TRPV2, TRPV3 и TRPV4 различий в экспрессии генов между нормо-и гипертензивными животными обнаружено не было. Различия обнаружены для генов холодоочувствительных ионных каналов TRPA1 и TRPM8. Уровень мРНК *Trpa1* у гипертензивной линии НИСАГ более чем в полтора раза ниже, чем у нормотензивной линии WAG, а уровень мРНК гена *Trpm8* у гипертензивных животных, по-видимому, настолько мал, что не представляется возможным оценить степень его экспрессии (Рисунок 8.).

Известно, что у гипертензивных животных наблюдаются изменения показателей иммунного ответа при температурных воздействиях на организм (Kozyreva et al., 2011). Обнаруженное нами значительное снижение экспрессии генов холодоочувствительных ионных каналов TRPM8 и TRPA1 в селезенке гипертензивных животных дает основание полагать, что эти ионные каналы могут быть вовлечены в их измененный иммунный ответ.

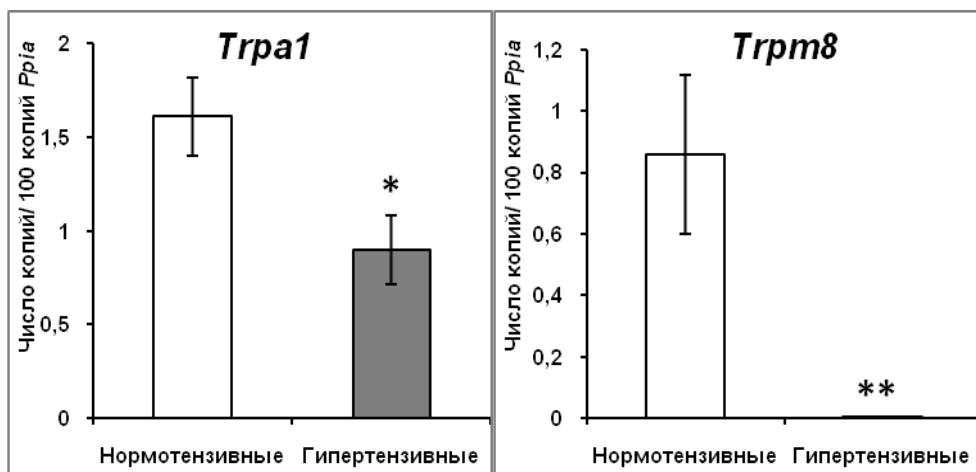


Рисунок 8. Уровень мРНК гена *Trpa1* и *Trpm8* в селезенке нормо- и гипертензивных животных. $n=10$, * $p<0,05$; ** $p<0,01$

В нашем исследовании показано снижение экспрессии гена ионного канала TRPM8 как в мозге, так и периферическом висцеральном органе селезенке у гипертензивных животных, что дает возможность говорить о снижении активности гена этого ионного канала.

4. Влияние активации периферического ионного канала TRPM8 холодом и ментолом на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов и терморегуляторные показатели у нормо-и гипертензивных крыс

Влияние активации периферического ионного канала TRPM8 на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в гипоталамусе нормо-и гипертензивных крыс. У нормотензивных животных при остром охлаждении изменения затрагивают только ген ионного канала TRPV3. Уровень мРНК *Trpv3* в заднем отделе гипоталамуса увеличивается при медленном глубоком охлаждении, такое же по глубине быстрое охлаждение эффекта не оказывает. Активация периферического ионного канала TRPM8 ментолом, как и охлаждение, приводит к увеличению экспрессии гена *Trpv3* в заднем отделе гипоталамуса (Рисунок 9.).

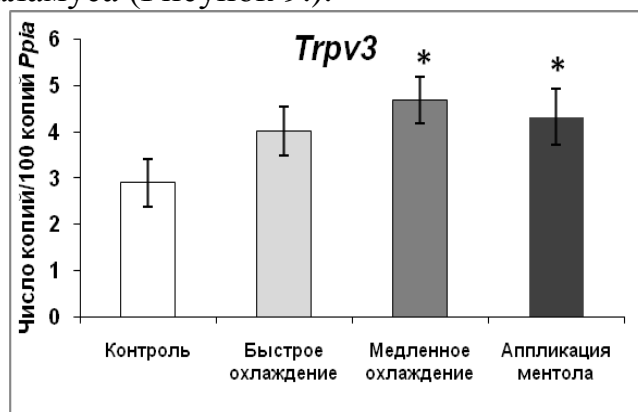


Рисунок 9. Уровень мРНК гена *Trpv3* в заднем отделе гипоталамуса нормотензивных крыс в термонейтральных условиях (контроль), при остром охлаждении, а также после аппликации ментола. $n=6-8$, * $p<0,05$ – относительно контроля

У гипертензивных животных, имеющих исходно сниженную экспрессию гена *Trpm8*, активация периферического кожного ионного канала TRPM8 – агонистом ментолом, как и медленное охлаждение, приводит к значительному увеличению экспрессии гена *Trpm8* в переднем отделе гипоталамуса (Рисунок 10.).

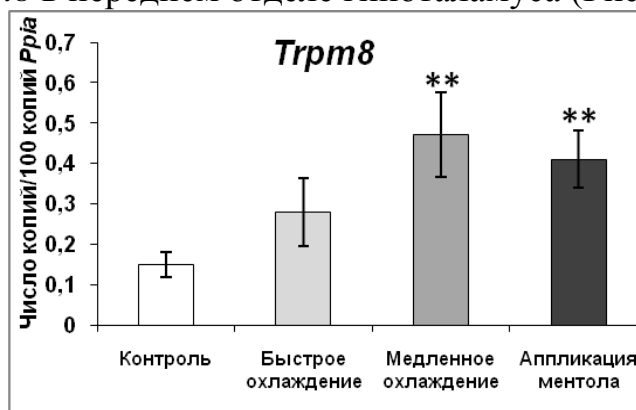


Рисунок 10. Уровень мРНК гена *Trpm8* в переднем отделе гипоталамуса гипертензивных крыс в термонейтральных условиях (контроль), при остром охлаждении, а также после аппликации ментола. $n=10$, $**p<0,01$ – относительно контроля

Обнаруженное изменение экспрессии *Trpm8* в ответ на охлаждение позволяет предполагать участие ионного канала TRPM8 гипоталамуса в регуляции физиологических реакций на охлаждение при артериальной гипертензии. Одним из подтверждений этого может являться способность TRPM8 оказывать влияние на жировой обмен. Известно, что у пациентов с артериальной гипертензией наблюдается изменение в соотношении липидов плазмы крови (Berliner, 1995; Klimov, Nikulcheva, 1995; Steinberg, 1988). У крыс гипертензивной линии НИСАГ обнаружены соотношения липопротеидов крови, сходные с таковыми для людей-гипертоников: снижен уровень липопротеидов высокой плотности и повышен коэффициент атерогенности. Холодовое воздействие повышало уровень липопротеидов высокой плотности и снижало коэффициент атерогенности до уровня, характерного для нормотензивных животных (Kozyreva et al., 2004). В других терминах можно сказать, что активация холодových рецепторов, в том числе повышение активности ионного канала TRPM8, нормализует некоторые показатели жирового обмена, характерные для гипертоников. Обнаруженный пониженный уровень мРНК гена *Trpm8* в гипоталамусе у крыс гипертензивной линии, относительно нормотензивной, и увеличение его экспрессии в ответ на охлаждение, дает основание полагать, что измененный липидный обмен у этих животных, может быть связан с изменениями в работе ионного канала TRPM8. По-видимому, в центральных механизмах нормализации жирового обмена у гипертоников при действии холода могут быть задействованы процессы, связанные с нормализацией экспрессии *Trpm8* в гипоталамусе.

Таким образом, впервые показано функциональное взаимодействие TRP ионных каналов периферической и центральной нервной системы на уровне изменения экспрессии генов. Активация периферического кожного ионного канала TRPM8 – агонистом ментолом приводит к сходным с острым охлаждением изменениям в экспрессии генов TRP ионных каналов.

Влияние активации периферического ионного канала TRPM8 ментолом на параметры терморегуляторных реакций при медленном глубоком охлаждении. Ранее было показано, что предварительное введение ментола на кожу в области приложения холодного стимула приводит к изменениям терморегуляторных реакций при последующем охлаждении (Kozyreva et al., 2010). Нами был поставлен вопрос о возможных особенностях физиологической реакции гипертензивных животных на стимуляцию ионного канала TRPM8 холодом и ментолом в связи с обнаруженной низкой экспрессией этого ионного канала при артериальной гипертензии.

В термонейтральных условиях у нормо-и гипертензивных животных не наблюдалось физиологически значимых различий между контрольными животными и животными с аппликацией ментола (Таблица 2., 3.).

Таблица 2. Терморегуляторные показатели в термонейтральных условиях у нормотензивных крыс в контроле и при аппликации ментола

| Показатели | Контроль (n=6) | Аппликация ментола (n=8) | P |
|--|----------------|--------------------------|-------|
| Температура кожи уха, °C | 30,0±0,17 | 29,6±0,17 | >0,05 |
| Температура кожи хвоста, °C | 33,4±0,35 | 33,1±0,25 | >0,05 |
| Внутрикожная температура живота, °C | 37,3±0,09 | 37,4±0,08 | >0,05 |
| Ректальная температура, °C | 37,3±0,08 | 37,2±0,09 | >0,05 |
| Электрическая активность мышц, мкВ | 1,3±0,08 | 1,4±0,11 | >0,05 |
| Общее потребление O ₂ , мл/мин*кг | 24,5±0,75 | 24,0±0,64 | >0,05 |
| Выделение CO ₂ , мл/мин*кг | 23,5±0,84 | 22,8±0,61 | >0,05 |
| Дыхательный коэффициент, ед. | 0,955±0,0095 | 0,948±0,0101 | >0,05 |

Таблица 3. Терморегуляторные показатели в термонейтральных условиях у гипертензивных крыс в контроле и при аппликации ментола

| Показатели | Контроль (n=10) | Аппликация ментола (n=10) | P |
|--|-----------------|---------------------------|-------|
| Температура кожи уха, °C | 28,5±0,14 | 28,6±0,23 | >0,05 |
| Температура кожи хвоста, °C | 30,3±0,14 | 30,1±0,15 | >0,05 |
| Внутрикожная температура живота, °C | 36,8±0,04 | 36,8±0,04 | >0,05 |
| Ректальная температура, °C | 36,9±0,06 | 37,0±0,06 | >0,05 |
| Электрическая активность мышц, мкВ | 1,2±0,06 | 1,4±0,09 | >0,05 |
| Общее потребление O ₂ , мл/мин*кг | 18,6±0,32 | 18,9±0,35 | >0,05 |
| Выделение CO ₂ , мл/мин*кг | 15,5±0,43 | 15,4±0,57 | >0,05 |
| Дыхательный коэффициент, ед. | 0,837±0,0194 | 0,810±0,0227 | >0,05 |

При медленном глубоком охлаждении нами были выявлены функциональные изменения реакции организма на холод при артериальной гипертензии. У гипертензивных животных, имеющих исходно сниженную экспрессию гена *Trpm8*, снижена чувствительность к активации периферического кожного ионного канала TRPM8. В отличие от нормотензивных животных активация ионного канала TRPM8 – агонистом ментолом, не вызывает у них уменьшения температурных порогов терморегуляторных реакций при медленном глубоком охлаждении (Рисунок 11.).

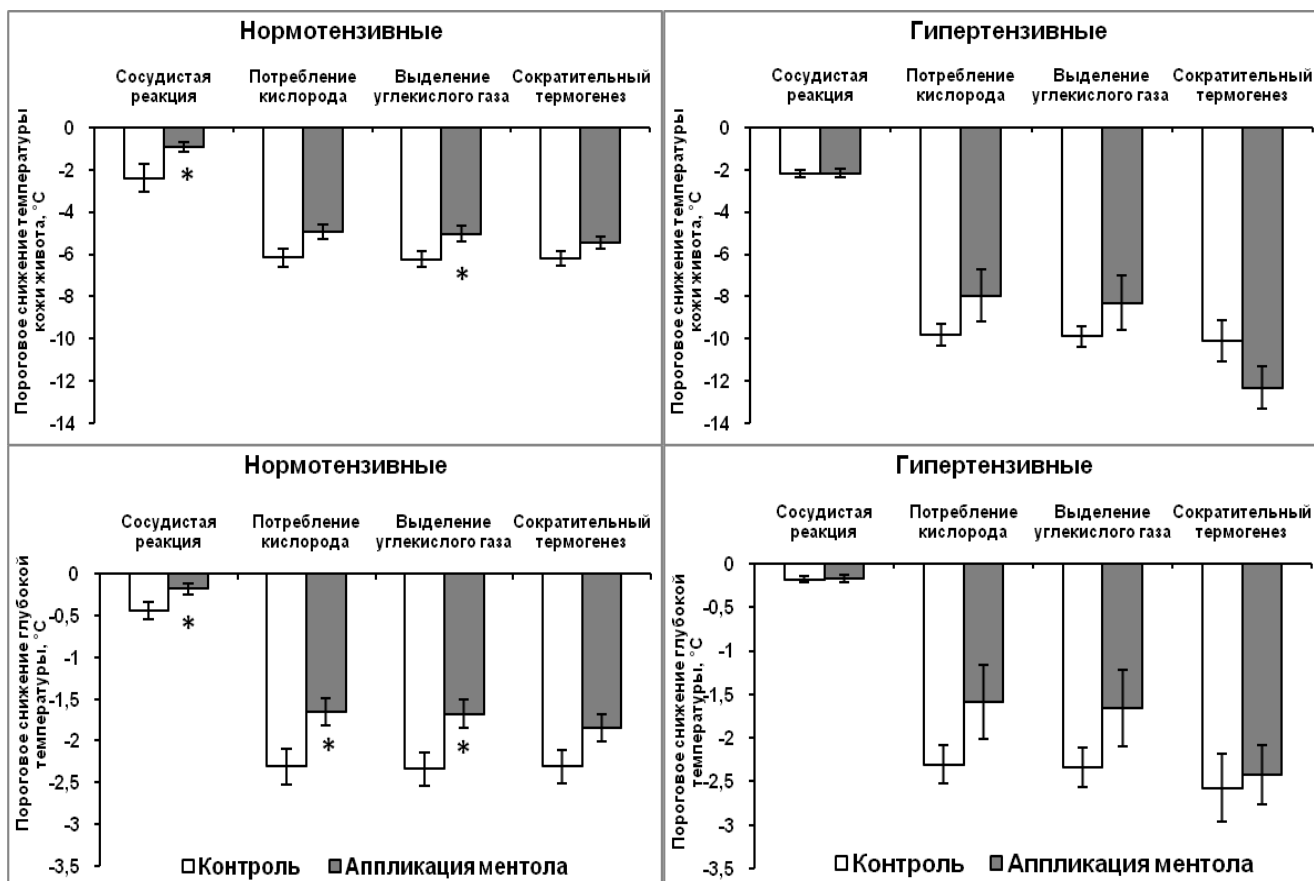


Рисунок 11. Пороговое снижение температуры кожи живота и ректальной температуры при медленном глубоком охлаждении в контроле и после аппликации ментола. $n=6-8$ для нормотензивных, $n=10$ для гипертензивных животных, $*p<0,05$ – относительно контроля

Таким образом, полученные результаты подтверждают высказанное предположение о том, что нормотензивные и гипертензивные животные имеют разную температурную чувствительность, что проявляется как в изменении физиологических реакций, направленных на поддержание температурного гомеостаза, так и в уровне экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов. Обнаруженная у гипертензивных животных сниженная чувствительность терморегуляторных реакций к стимуляции ионного канала TRPM8 вполне согласуется со сниженной у них экспрессией гена этого ионного канала. В результате проведенного исследования были получены новые данные о функционировании термочувствительных TRP ионных каналов, позволяющие приблизиться к пониманию их физиологического значения, а также степени вовлеченности в регуляцию термозащитных реакций организма в норме и при артериальной гипертензии. В работе на примере TRP ионных каналов также четко показана вовлеченность геномного уровня регуляции в формирование ответа организма на внешнее холодное воздействие.

ВЫВОДЫ

1. Во всех исследованных структурах мозга (гипоталамус, фронтальная кора, средний мозг, гиппокамп) имеет место выраженная экспрессия большинства генов теплочувствительных TRP ионных каналов и относительно невысокая экспрессия генов холодочувствительных ионных каналов. В гипоталамусе, выполняющем функцию центра терморегуляции, по сравнению с другими исследованными структурами, наблюдается повышенный уровень экспрессии генов большинства термочувствительных TRP каналов.

2. В функционально различных отделах гипоталамуса экспрессируются гены всех исследованных термочувствительных TRP ионных каналов, однако экспрессия генов этих каналов различна. Так экспрессия гена *Trpm8* в переднем гипоталамусе, выше, чем в заднем, а экспрессия генов *Trpa1* и *Trpv1* в заднем отделе выше, чем в переднем.

3. Показана вовлеченность геномного уровня регуляции в поддержание температурного гомеостаза при температурных воздействиях как длительных, так и острых. Длительная адаптация организма к холоду приводит к специфичным для гипоталамуса изменениям – снижению экспрессии гена ионного канала TRPV3. Под влиянием острого охлаждения наблюдалось повышение экспрессии гена ионного канала TRPV3.

4. Наследственная индуцированная стрессом артериальная гипертензия у крыс линии НИСАГ сопровождается изменениями экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов как в центре регуляции висцеральных функций – гипоталамусе, так и в периферическом висцеральном органе – селезенке. Так, экспрессия гена холодочувствительного ионного канала TRPM8 снижена в переднем термодетекторном отделе гипоталамуса, а экспрессия гена теплочувствительного ионного канала TRPV4 повышена в заднем отделе гипоталамуса. В селезенке наблюдается значительное снижение экспрессии генов холодочувствительных ионных каналов TRPM8 и TRPA1.

5. Показано функциональное взаимодействие TRP ионных каналов периферической и центральной нервной системы на уровне экспрессии генов. Активация периферического ионного канала TRPM8 его агонистом ментолом и острое охлаждение приводят к повышению экспрессии гена ионного канала TRPV3 в заднем гипоталамусе у нормотензивных животных и к значительному увеличению экспрессии гена *Trpm8* в переднем отделе гипоталамуса у гипертензивных животных.

6. Наследственная индуцированная стрессом артериальная гипертензия сопровождается функциональными изменениями реакции организма на холод. Активация ионного канала TRPM8 агонистом ментолом не вызывает у гипертензивных животных уменьшение температурных порогов терморегуляторных реакций при охлаждении, наблюдаемое у нормотензивных животных. Это изменение физиологической реакции на холод согласуется со снижением экспрессии гена холодочувствительного ионного канала TRPM8 в гипоталамусе у гипертензивных животных.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В РЕФЕРИРУЕМЫХ ЖУРНАЛАХ ИЗ СПИСКА ВАК

1. Воронова, И.П. Экспрессия генов термочувствительных TRP-каналов в гипоталамусе крыс в норме и при адаптации к холоду / И.П. Воронова, **А.А. Тужикова (Евтушенко)**, Т.В. Козырева // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2012. – №9. – С. 1101-1110.

2. Voronova, I.P. Gene expression of thermosensitive TRP ion channels in the rat brain structures: Effect of adaptation to cold / I.P. Voronova, **А.А. Tuzhikova (Evtushenko)**, T.V. Kozyreva // Journal of Thermal Biology. – 2013. – Vol. 38. – P. 300-304.

3. Voronova, I.P. Expression of Genes for Temperature-Sensitive TRP Channels in the Rat Hypothalamus in Normal Conditions and on Adaptation to Cold / I.P. Voronova, **А.А. Tuzhikova (Evtushenko)**, T.V. Kozyreva // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2014. – Vol. 44. – P. 565-570.

4. Voronova, I.P. Inherited stress-induced hypertension is associated with altered gene expression of thermosensitive TRP ion channels in hypothalamus / I.P. Voronova, **А.А. Tuzhikova (Evtushenko)**, A.L. Markel, T.V. Kozyreva // Journal of Experimental and Integrative Medicine. – 2015. – Vol. 5. – № 3. – P. 149-156.

ТЕЗИСЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ В СБОРНИКАХ КОНФЕРЕНЦИЙ

1. **Тужикова (Евтушенко), А.А.** Исследование экспрессии генов термочувствительных TRP-каналов в гипоталамусе крыс / А.А. Тужикова (Евтушенко) // Труды молодых ученых Алтайского государственного университета: материалы XXXVII научной конференции студентов, магистрантов, аспирантов и учащихся лицейных классов. – Барнаул: Изд-во Алт.ун-та, 2010. – Вып. 7. – С. 173-175.

2. **Тужикова (Евтушенко), А.А.** Исследование экспрессии генов термочувствительных TRP-каналов в гипоталамусе крыс / А.А. Тужикова (Евтушенко) // Материалы XLIX международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»: Биология. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та, 2011. – С. 44

3. **Тужикова (Евтушенко), А.А.** Экспрессия генов термочувствительных TRP-каналов в гипоталамусе и фронтальной коре крыс в норме и при адаптации к холоду / А.А. Тужикова (Евтушенко), И.П. Воронова, Т.В. Козырева // Материалы (интернет-публикация) конкурса молодых ученых ФГБУ НИИ Физиологии СО РАМН, 22 марта. – Новосибирск, 2012. – С. 7-8

4. **Tuzhikova (Evtushenko), А.А.** Expression of thermosensitive TRP ion channel genes in hypothalamus of normal and adapted rats / А.А. Tuzhikova (Evtushenko), I.P. Voronova, T.V. Kozyreva // The 4th International Symposium on Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation, 22-25 march. – Rio de Janeiro, Brazil. – 2012.

5. **Тужикова (Евтушенко), А.А.** Влияние длительного температурного воздействия на экспрессию генов термочувствительных TRP-каналов в отделах мозга крыс / А.А. Тужикова (Евтушенко), И.П. Воронова, Т.В. Козырева // VIII Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и

психологии», 2-12 июня. – Судак. – 2012. – С. 406-407

6. **Тужикова (Евтушенко), А.А.** Экспрессия генов термочувствительных TRP-каналов в отделах мозга у крыс, адаптированных к холоду и контрольных / А.А. Тужикова (Евтушенко), И.П. Воронова, Т.В. Козырева // VII Сибирский физиологический съезд, 27-29 июня. – Красноярск. – 2012. – С. 539-540.

7. **Tuzhikova (Evtushenko), A.A.** Long-term exposition at different temperatures and expression of thermosensitive TRP ion channel genes in rat brain / A.A. Tuzhikova (Evtushenko), I.P. Voronova, T.V. Kozyreva // International Summer School: «Neurogenetics. Unraveling behavior and brain mechanisms using modern technologies», 20-25 of August 2012. – Zvenigorod. – P. 25-26.

8. **Тужикова (Евтушенко), А.А.** Экспрессия генов термочувствительных TRP ионных каналов – потенциальных мишеней терапевтического воздействия – в норме и при действии холода на организм / А.А. Тужикова (Евтушенко), И.П. Воронова, Т.В. Козырева // Первая Всероссийская научная конференция молодых ученых-медиков «Инновационные технологии в медицине XXI века», 6-7 декабря. – Москва. – 2012. – С. 235-237

9. **Тужикова (Евтушенко), А.А.** Экспрессия генов термочувствительных TRP-каналов в гипоталамусе крыс при разных типах охлаждения / А.А. Тужикова (Евтушенко), И.П. Воронова, Т.В. Козырева // XXII Съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова, 16 – 20 сентября. – Волгоград. – 2013. – С. 531.

10. **Тужикова (Евтушенко), А.А.** Экспрессия генов термочувствительных TRP ионных каналов в гипоталамусе крыс при температурных воздействиях и активации ионного канала TRPM8 у нормо- и гипертензивных животных / А.А. Тужикова (Евтушенко), И.П. Воронова, Т.В. Козырева // X Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии», 2-12 июня. – Судак. – 2014. – С. 343-344.

11. **Тужикова (Евтушенко), А.А.** Влияние артериальной гипертензии на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в гипоталамусе крыс при температурных воздействиях и активации ионного канала TRPM8 / А.А. Тужикова (Евтушенко), И.П. Воронова, Т.В. Козырева // VII Всероссийская научно-практическая конференция «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов», 21-22 апреля. – Новосибирск. – 2015. – С. 290-291.

12. **Тужикова (Евтушенко), А.А.** Особенности экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов в функционально различных отделах гипоталамуса у нормо- и гипертензивных животных / А.А. Тужикова (Евтушенко), И.П. Воронова, Т.В. Козырева // XI Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии», 2-12 июня. – Судак. – 2015. – С. 396-397.

13. **Tuzhikova (Evtushenko), A.A.** Gene expression of thermosensitive TRP ion channels in the functionally different regions of hypothalamus / A.A. Tuzhikova (Evtushenko), I.P. Voronova, T.V. Kozyreva // 4th International Interdisciplinary Conference on «Modern problems in systemic Regulation of Physiological Functions» / Conference proceedings. – Moscow, Russia, September 17-18. – 2015. – P. 630-633.