

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Евтушенко Анны Александровны «Функциональные изменения активности генов термочувствительных TRP ионных каналов при температурных воздействиях на организм в норме и при артериальной гипертензии» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

Объектом исследований Евтушенко Анны Александровны являются сравнительно недавно открытые и недостаточно изученные, особенно в условиях *in vivo*, рецепторы транзиторных потенциалов (transient receptor potential, TRP), точнее, те их представители, для которых установлена термочувствительность. В то же время, уже имеющиеся знания о химических эндогенных лигандах этих рецепторов, для иных, кроме терморегуляции, физиологических процессов, в которых они участвуют, указывают на их важную роль не только в норме, но и патологии. Поэтому проведенная Евтушенко А.А. работа по изучению влияния температурных воздействий на термочувствительные рецепторы у нормо- и гипертензивных крыс является актуальной.

Диссертация имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, главы результатов исследований, обсуждения, выводов и списка литературы, который включает 433 работы, из них – 99 отечественных и 334 зарубежных, иллюстрирована 24 рисунками и 21 таблицей. Общий объем диссертации – 158 страниц.

Во введении (7 стр.) автор убедительно формулирует актуальность работы. Введение содержит все необходимые разделы. Формулировки цели, задач точные, лаконичные.

Обзор литературы изложен на 35 страницах, состоит из 5 частей. Описывая основные принципы терморегуляции, автор с использованием данных литературы показывает, что она является многоуровневой системой поддержания постоянства внутренней среды организма. Эта система организована единством взаимодействия периферических и центральных

звеньев. Центром осуществления основных интегрирующих функций системы терморегуляции является гипоталамус.

В результате рассмотрения данных по терморегуляции при холодových воздействиях автор делает вывод, что, несмотря на давно существующее понимание того, что поддержание температурного гомеостаза в организме при длительном действии низких температур возможно лишь посредством повышением теплопродукции или снижением теплоотдачи, и имеющиеся данные о наличии изменений в функционировании центральных и периферических терморцепторов под влиянием как острого, так и длительного (адаптация) действия холода на организм, механизмы этих изменений на сегодняшний день остаются до конца не изученными.

В связи с этим выводом ключевое значение в обзоре имеет раздел по молекулярным механизмам терморцепции, а именно мембранным белкам, выполняющих функцию транспорта ионов – transient receptor potential (TRP), или рецепторы транзитного потенциала, которые в настоящее время рассматривают как молекулярную основу термочувствительности. Раздел написан очень информативно

В следующем разделе автор рассматривает известные линии крыс, используемые в качестве моделей артериальной гипертензии крыс, уделяя основное внимание использованным в работе крысам с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ), полученным в ИЦИГ СО РАН.

В последнем разделе, посвященном терморегуляции при артериальной гипертензии, автор приводит данные о наличии ассоциации между колебаниями артериального давления и температурой окружающей среды, связи между изменениями температуры окружающей среды и увеличением частоты возникновения гипертонической болезни, эпидемиологических и клинических исследованиях, показавших увеличение вероятности развития сердечно-сосудистых заболеваний значительно в зимний период и холодную погоду, усугублении течения гипертонической болезни в результате

холодового воздействия. Автор приводит данные, полученные в лаборатории, на базе которой выполнена диссертация, о том, что гипертензивные крысы НИСАГ и нормотензивные имеют разную чувствительность к холодовому воздействию. Это обосновывает необходимость исследования возможного участия термочувствительных TRP ионных каналов в системе температурного гомеостаза в норме и при артериальной гипертензии, в термонеutralных условиях, а также при действии низких температур на организм.

Материалы и методы исследований (10 стр.). Данный раздел автор диссертации начинает с описания проведенных экспериментов, которое наглядно характеризует логику работы в целом. Евтушенко А.А. использовала в работе арсенал методов, отвечающий задачам исследования, который включал: регистрацию температурных показателей (ректальной температуры, температуры изолированного от среды участка кожи ушной раковины, температуры кожи хвоста, внутрикожная температура охлаждаемой поверхности живота), интегральный метаболический показатель (общее потребление кислорода, концентрации CO₂ в выдыхаемом воздухе) и измерение электрической активности мышц шеи. Экспрессию рецепторов транзиторных потенциалов измеряла с использованием обратнотранскриптной полимеразной цепной реакции с последующей оценкой величин площадей электрофоретических пятен в гелях. Расчет числа копий проводился с использованием калибровочных графиков, полученных с известными концентрациями ДНК. Метод выполнен с использованием реактивов и оборудования ведущих производителей и качество результатов не вызывает сомнений. Результаты обработаны с применением параметрической статистики.

Результаты собственных исследований (38 стр.) изложены в 4 подглавах.

Прежде всего, автором исследована экспрессия *Trpv1*, *Trpv2*, *Trpv3*, *Trpv4*, *Trpa1* и *Trpm8* во фронтальной коре, среднем мозге, гипоталамусе и

гиппокампе. Показано, что каждый из них экспрессируется в этих отделах, но теплочувствительные более экспрессированы, чем холодочувствительные, наиболее высококопийным является *Trpv2*. В гипоталамусе наблюдается более высокий уровень экспрессии рецепторов в сравнении с другими исследованными структурами мозга. Автор обоснованно, на мой взгляд, полагает, что это может быть связано с исключительной ролью гипоталамуса в терморегуляции. В самом гипоталамусе, между передней и задней его зонами, наблюдаются различия в экспрессии генов трех рецепторов: *Trpm8* (холодочувствительный) более экспрессирован в передней зоне, а *Trpa1* (болевая холодочувствительность) и *Trpv1* (теплочувствительный) – в задней зоне. Таким образом, Евтушенко А.А. получена «молекулярная топография» рецепторов транзитного потенциала (по мРНК) для головного мозга.

Далее автор исследует влияние температурных воздействий на экспрессию генов TRP в разных структурах мозга. Установлено, что при адаптации к холоду (+5° С, модель Харта) наблюдается только снижение экспрессии *Trpv3* в гипоталамусе. Экспрессия всех других рецепторов не меняется ни в одном из отделов мозга.

При остром холодовом воздействии с медленным понижением температуры автор обнаружил увеличение экспрессии гена ионного канала TRPV3 в заднем отделе гипоталамуса. В следующем эксперименте, когда острое холодовое воздействие сменялось периодом отогревания, в гипоталамусе наблюдалось увеличение экспрессии гена холодочувствительного рецептора TRPM8. Этот результат поставил вопрос для следующего эксперимента по изучению влияния активации TRPM8 его агонистом ментолом на экспрессию генов TRP. Автор работы показала, что действительно, аппликация ментола приводит к увеличению экспрессии *Trpv3* в заднем отделе гипоталамуса. Острое медленное охлаждение на фоне аппликации ментола оставляет этот эффект на том же уровне.

Полученный результат – повышение экспрессии гена ионного канала TRPV3 в ответ на активацию периферического ионного канала TRPM8 как

его агонистом, так и температурой, является важным с точки зрения возможных регуляторных взаимоотношений в семействе TRP.

Для выявления особенностей экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов при артериальной гипертензии автор проводил эксперименты на линии крыс НИСАГ, модели наследственной стресс-индуцируемой артериальной гипертензии, полученной и поддерживаемой в Институте цитологии и генетики. Получено, что в отличие от нормотензивных крыс, у НИСАГ значимо увеличена экспрессия гена *Trpv4* в заднем гипоталамусе в сравнении с передним. Отличия в экспрессии генов *Trpv1*, *Trpa1* и *Trpm8* между передним и задним гипоталамусом имеют одинаковый характер у обеих линий. Автор выявил статистически значимые различия у линии НИСАГ в сравнении с нормотензивной линией WAG: снижение экспрессии *Trpm8* в переднем гипоталамусе и повышение экспрессии *Trpv4* в заднем гипоталамусе.

Изучение влияния острого охлаждения на экспрессию TRP у гипертензивных животных показало, что медленное охлаждение приводит к увеличению экспрессии гена *Trpm8* в переднем отделе гипоталамуса. В заднем отделе гипоталамуса изменений не отмечено. Быстрое охлаждение не имеет никаких эффектов.

В эксперименте по оценке экспрессии генов TRP в селезенке Евтушенко А.А. показала снижение экспрессии *Trpm8* в этом органе, как и в гипоталамусе, у гипертензивных крыс в сравнении с нормотензивными. Данный результат представляет интерес с точки зрения поиска суррогатных маркеров, адекватно описывающих ситуацию в головном мозге.

В завершающем эксперименте автор исследует влияние активации TRPM8 аппликациями ментола на терморегуляторные параметры у нормо- и гипертензивных животных в термонеutralных условиях и при охлаждении. Показано, что у нормотензивных крыс в термонеutralных условиях не наблюдается физиологически значимых различий между контрольными животными и животными с аппликацией ментола. При медленном глубоком

охлаждении ментол стимулировал развитие сосудистой и метаболической реакций и не оказывал влияние на возникновение сократительного термогенеза. Ментол сокращал продолжительность латентных периодов терморегуляторных реакций и вызывал пороговое снижение температуры кожи живота и ректальной температуры. У гипертензивных крыс не наблюдалось ни одного из перечисленных эффектов аппликации ментола. Автор объясняет это различие пониженной экспрессией *Trpm8* у гипертензивных крыс.

В обсуждении результатов (20 стр.) автор привлекает большое количество литературы за примерно 15-летний период. Обсуждение является многосторонним и включает сопоставление полученных результатов по экспрессии в отделах мозга крыс с имеющимися в литературе, анализ участия TRP в метаболических процессах и их возможной роли в патологии.

Новизна результатов. 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. Показана вовлеченность генетических процессов в ответ на длительные и острые температурные воздействия и др. В целом можно согласиться с отмеченной самим автором диссертации новизной полученных результатов.

Результаты подвергнуты адекватной статистической обработке и их надежность не вызывает сомнений.

Вопросы и замечания, возникшие при чтении диссертации:

1. Что использовали в качестве внешнего стандарта?
2. Не пробовали отдельно оценивать передний и задний гипоталамус в

модели Харта? Эксперименты с быстрым и медленным охлаждением показывают, что направления изменений в этих отделах имеют противоположные тенденции.

3. Проводился ли анализ различий между WAG и НИСАГ по общему потреблению кислорода и дыхательному коэффициенту?

4. Рисунок 10 дублирует данные таблицы 5.

Выводы соответствуют полученным результатам и исчерпывают поставленные задачи. Основные положения, выносимые на защиту, базируются на полученных результатах.

По результатам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах, том числе 3 – в зарубежных журналах, 13 тезисов в материалах конференций, из которых 6 – международные.

Технические замечания к оформлению диссертации отсутствуют.

Автореферат включает все основные результаты работы. Формулировки цели, задач, положений, выносимых на защиту идентично таковым в тексте диссертации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Евтушенко Анны Александровны «Функциональные изменения активности генов термочувствительных TRP ионных каналов при температурных воздействиях на организм в норме и при артериальной гипертензии» является научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная задача, имеющая существенное значение для физиологии терморегуляции – описана молекулярная топография термочувствительных рецепторов транзиторных потенциалов и показаны особенности терморегуляторной функции в связи с экспрессией генов TRP ионных каналов у нормотензивных и гипертензивных крыс; работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением

Правительства РФ №842 от 24.09.2013 года, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а сама Евтушенко Анна Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Официальный оппонент,
руководитель лаборатории метаболизма
лекарств и фармакокинетики

НИИ молекулярной биологии и биофизики

д.м.н., профессор



В.А.
Вавилин В.А.



Адрес: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12

Телефон: 8(383) 334-80-16

Электронная почта: drugsmet@niimbb.ru