

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

Актуальность. Работа посвящена изучению терморегуляции, в частности изучению изменению экспрессии генов TRP каналов, отвечающих за терморцепцию, при температурных воздействиях у нормальных животных и животных с повышенным артериальным давлением. Актуальность работ в этом направлении не вызывает сомнения, поскольку большинство исследований реакций, опосредованных TRP ионными каналами при температурных воздействиях, активно ведется на культурах клеток, а функциональная роль этих ионных каналов в реакциях целого организма остается не до конца ясной. Еще меньше существует работ, в которых тонкие молекулярно-биохимические методы сопровождают хорошо поставленные физиологические эксперименты. Исследования молекулярно-генетических механизмов адаптации к холодовым воздействиям, в частности участия в этом TRP каналов, может являться актуальным в связи с освоением территорий, климатической особенностью которых являются низкие температуры.

Известно, что дисфункция TRP каналов участвует в различных патологических состояниях от хронической боли до рака и гипертензии (Yosuke Kaneko and Arpad Szallasi, 2014), поэтому было небезосновательно ожидать различия в экспрессии генов TRP каналов у нормотензивных крыс и крыс, склонных к гипертензии. 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.

Диссертационная работа Евтушенко Анны Александровны изложена на 158 страницах по традиционной схеме и включает введение, обзор литературы, методический раздел, результатов исследования и их обсуждение, выводы и список литературы. Работа проиллюстрирована 21 таблицами и 24 рисунками. Библиографический список включает 99 отечественных и 334 зарубежных источников. Диссертация написана хорошим литературным языком. Результаты диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях и опубликованы в 4-х статьях в журналах, в том числе три - в зарубежных.

В обзоре литературных данных Евтушенко А.А. довольно подробно рассматривает основные принципы терморегуляции, начиная с рассмотрения особенностей гомойотермных животных, механизмов теплопродукции и теплоотдачи и заканчивая рассмотрением механизмов работы терморцепторов. Отдельно дан обзор по участию нервных центров в терморегуляции. Очень подробно рассмотрены особенности терморегуляции при холодовых воздействиях, в том числе изменения системы терморегуляции при адаптации теплокровного организма к холоду. В отдельном разделе даны современные представления о молекулярных механизмах терморцепции, в частности новейшие исследования с использованием методов генетической модификации и клонирования, которые позволили выявить высокую температурную зависимость транспорта ионов через клеточную мембрану у группы мембранных белков (TRP), образующих ионные каналы, что дало возможность рассматривать эти белки как молекулярную основу термочувствительности. В разделе, посвященном артериальной гипертензии, рассмотрены особенности терморегуляции при этой патологии, подробно рассмотрены существующие модели артериальной гипертензии, хотя далеко не все, и дано обоснование выбора для изучения линии НИСАГ.

В главе «Материалы и методы исследования» описаны условия содержания, сведения об общем количестве исследованных животных и числе животных в каждой экспериментальной серии. Дано детальное описание схем проведения экспериментов. Исчерпывающе подробно описаны все методики, в том числе дано обоснование выбора метода ОТ ПЦР для определения экспрессии генов, даны критерии выбора праймеров для ПЦР анализа. Методически работа выполнена на современном уровне, с применением необходимых контролей. В разделе «Статистический анализ данных» представлены использованные методы обработки полученных данных.

Глава «Результаты исследования» содержит подробное изложение и анализ полученных результатов исследования. Первый раздел посвящен изучению экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов в различных структурах мозга. Автор демонстрирует, что уровень экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов, как правило, выше в гипоталамусе, чем в других областях мозга. Это может быть связано с исключительной ролью гипоталамуса в терморегуляции. Более высокий уровень экспрессии гена *Tgrm8*, зарегистрированный во фронтальной коре, автор объясняет большими колебаниями температуры, характерными для этой структуры мозга. В следующих двух разделах рассматриваются изменения в экспрессии при различных холодовых воздействиях на нормотензивных крыс линии Wistar. Кроме вполне ожидаемого снижения экспрессии гена ионного канала TRPV3 у адаптированных к холоду животных было показано, что даже кратковременные холодовые воздействия могут задействовать механизмы регуляции на уровне экспрессии генов.

Исследование крыс гипертензивной линии НИСАГ выявило не только отличия от нормотензивных крыс по базальному уровню экспрессии генов TRP каналов, но и отличия в реакции на холодовое воздействие - обнаружено достоверное увеличение экспрессии *Trpm8* в ответ на охлаждение. Автором делается предположение, что обнаруженные различия в экспрессии *Trpm8* и *Trpv4* являются молекулярной основой различий в термочувствительности у животных этих линий, которые были зарегистрированы как ранее, так и в данных исследованиях.

В разделе "Обсуждение результатов" автор проводит анализ полученных в работе данных, основываясь в первую очередь на собственных работах лаборатории термофизиологии и на привлеченных данных из современных литературных источников. Цель и задачи исследования четко сформулированы, выводы полностью обоснованы результатами исследования. Материал диссертации получен, обработан и проанализирован автором лично, за исключением специально оговоренных случаев. Спектр используемых методик исследования и обработки полученных данных широк и соответствует поставленным задачам.

Таким образом, все вышесказанное позволяет считать результаты диссертационной работы достоверными, а положение, выносимое на защиту и выводы обоснованными.

Автореферат по представленным в нем результатам и выводам соответствует диссертации. Качество и количество публикаций соответствует требованиям, предъявляемым Высшей Аттестационной Комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации.

Новизна и значимость полученных результатов и выводов.

Исследование, проведенное автором, может и не является первым, в котором показаны различия в экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов в различных структурах мозга, но оно является первым сравнительным исследованием уровня экспрессии генов 6 наиболее признанных на сегодняшний день термочувствительных TRP ионных каналов в центре терморегуляции – гипоталамусе, а также в других отделах мозга. Фактом, заслуживающим повышенного внимания, является показанное в данной работе влияние кратковременного периферического охлаждения на уровень экспрессии гена термочувствительного TRPV3 ионного канала в гипоталамусе. Обнаруженный автором факт изменения экспрессии гена *Trpm8* у крыс гипертензивной линии по сравнению с нормотензивными животными позволяет предполагать вовлеченность этого гена в процессы, связанные с гипертензивным состоянием, особенно важным может оказаться тот факт, что в работе была использована линия крыс,

которая является признанной в мире оригинальной моделью гипертонической болезни человека.

Недостатки и общие замечания

В то же время к работе есть ряд вопросов и замечаний.

1. Мелкие недочеты в обзоре литературы –
 - a. Стр. 22: изменение температуры кожи не говорит напрямую о снижении теплоотдачи с поверхности тела животного, оно происходит из-за изменения теплопроводности при уменьшении подкожного кровотока, что и является причиной снижения теплоотдачи;
 - b. Стр. 22: «при медленных скоростях» - скорости не могут быть медленными;
 - c. Стр. 24: «развитие морфологических адаптивных изменений требует довольно длительного периода (месяцы, годы)» Все-таки для мелких млекопитающих (к которым можно отнести и лабораторных крыс) характерны более быстрые процессы, и изменения могут быть заметны через недели;
 - d. Стр. 24: «Было обнаружено, что в ответ на охлаждение у животных повышается потребление кислорода, которое сопровождается усилением электрической активности скелетной мускулатуры» - скорее всего увеличение электрической активности сопровождается повышением потребления кислорода;
2. Во время проводимых экспериментов, в том числе и при проведении адаптации к холоду, животных содержали при фотопериоде 12 часов света, 12 часов темноты - мы знаем, что для адаптации к холоду может быть критично, в каком фотопериоде находятся животные, по крайней мере дикие. Может ли фотопериод повлиять на исследуемые параметры у лабораторных крыс?
3. В описании методики острого охлаждения указана скорость 0,1 °C/сек и среднее время охлаждения 10-15 минут - то есть получается, что термод в конце эксперимента охлаждался почти до -70°C, так ли это, и если это так, то не было ли случаев обморожения?
4. Из описаний методики аппликации ментола не ясно, как рассчитывали временные параметры и концентрацию апплицируемого вещества.
5. В качестве внутреннего стандарта – были использованы гены «домашнего хозяйства» – ген ДНК-зависимой РНК-полимеразы II (Polr2a) и ген пептидил-пролил цис-транс изомеразы А (Ppia) – не

понятно по какому принципу был использован тот или иной стандарт в конкретном эксперименте и почему нельзя было использовать один стандарт.

6. Критерием возможности использования гелей для дальнейшего анализа было превышение уровня 0,97 коэффициента линейной корреляции, а не аппроксимации, как написано в диссертации.
7. В главе «Результаты исследований» часть графиков (10, 11, 12, 13, 19 и др.) полностью повторяют данные из соответствующих таблиц, такое повторение полезно для презентаций, чтобы акцентировать внимание на полученных результатах, но сильно загромождает диссертацию. При этом часть данных представлена только в графиках. Было бы логичнее дать все средние групповые результаты в таблицах, которые вынести в приложения, а в основном тексте приводить только рисунки с графиками, отражающими основные результаты.
8. В таблице 15 показаны различия в уровне мРНК генов термочувствительных TRP ионных каналов в селезенке у нормо- и гипертензивных животных, все-таки желательно указывать отличие экспериментальных животных (НИСАГ) от контрольных (Wistar), а не наоборот, как приведено в диссертации.
9. Исследование реакции на острое охлаждение в отличие от адаптации к холоду было проведено на наркотизированных животных. Как известно, наркоз сам очень сильно влияет на терморегуляцию и, судя по оценочным расчетам, влияет и на экспрессию исследованных генов, причем как раз затрагивает и TRPV3 и TRPM8, по которым получились наиболее яркие результаты. Тем не менее, этот факт никак не обсуждается в диссертации.

Указанные недостатки не имеют принципиального характера и не снижают научную ценность работы.

Заключение

Диссертационная работа Анны Александровны Евтушенко «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 объему и значимости полученных результатов является законченной самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой и посвящена решению актуальной научно-практической задачи - исследованию функциональных изменений экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов при

температурных воздействиях на организм в норме и при артериальной гипертензии. По актуальности избранной темы, новизне полученных результатов, обоснованности научных выводов, объему проведенных работ и практической значимости диссертация Евтушенко А.А. соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям и п.п. 9-14 «О порядке присуждения ученых степеней» постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013г. № 842, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 - физиология.

Старший научный сотрудник
Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Федеральный исследовательский
центр Институт цитологии и
генетики Сибирского отделения
Российской академии наук»,

к.б.н

Петров

Петровский Д.В.

Ученый секретарь
Орлов Т.В.
05.04.2016



Тор

630090, г. Новосибирск,
пр. Академика Лаврентьева, д.10
Тел. +79139049037
e-mail: dm_petr@ngs.ru