

ОТЗЫВ

официального оппонента Зинченко Валерия Петровича

на диссертационную работу Бирулиной Юлии Георгиевны «Роль калиевых каналов и газотрансмиттеров в регуляции сокращений гладких мышц сосудов при гипоксии и реоксигенации», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям
03.03.01 – физиология, 03.01.02 – биофизика

Актуальность исследования. Оптимальный уровень парциального давления кислорода в клетках различных тканей и органов необходим для поддержания максимальной скорости производства АТФ и адекватного протекания метаболических и пластических процессов в клетках. Гипоксия влияет на сократительные реакции, гладкомышечных клеток (ГМК) сосудов, индуцируя вазодилатацию или констрикцию. Запускаемые при гипоксии процессы сопровождаются изменением ионной проницаемости мембран ГМК, активацией ряда внутриклеточных сигнальных путей, индуцирующих экспрессию генов адаптации ГМК к условиям дефицита кислорода. Известно, что последующая за гипоксией реоксигенация, также может усиливать повреждение ткани за счет генерации АФК и воспалительных реакций.

За последние годы получено большое количество данных, свидетельствующих о высокой чувствительности ГМК сосудов к гипоксии. Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о том, что гипоксия приводит к расслаблению гладких мышц (ГМ) большинства сосудов и снижает силу их сокращений. Во многих работах показано, что это расслабление коррелирует с уменьшением поступления Ca^{2+} в клетку при гипоксии. С другой стороны в условиях кислородного голодания происходит накопление ионов Ca^{2+} в цитозоле клеток, поэтому наблюдаемое исследователями угнетение поступления Ca^{2+} можно рассматривать как отрицательную обратную связь, направленную на защиту сосудов от гиперсокращения. Поскольку поступление Ca^{2+} в ГМ обеспечивается потенциал-зависимыми и SOC каналами, и мобилизацией из внутриклеточных структур, то факторы подавления активности этих каналов могут быть задействованы в адаптивном ответе. Несмотря на то, что в подавляющем большинстве сосудистых клеток саркоплазматический ретикулум развит слабо, и не может быть непосредственной причиной повышения Ca^{2+} , тем не менее его сигнальная функция, направленная на активацию SOC каналов, может быть важна в процессе адаптации. Основным ингибитором активности потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов является гиперполяризация,

обеспечиваемая различными K^+ -каналами. Существует достаточное количество экспериментальных доказательств того, что при гипоксии активируются K_{ATP} -каналы, Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы высокой проводимости (BK_{Ca}), другие K_{Ca} -каналы, K_v -каналов, Ca^{2+} -активируемые Cl^- каналы. Возможностей много, и все они могут быть задействованы на разных этапах гипоксии.

В последние годы показано, что в регуляции сократительных реакций ГМК сосудов при гипоксии и реоксигенации могут участвовать различные вазоактивные факторы, такие, как газовые посредники – монооксид углерода (CO) и сероводород (H_2S), действие которых во многом направлено на регуляцию активности калиевых каналов различного типа. Изучение внутриклеточных сигнальных путей с участием этих посредников и их влияние на сократительную активность ГМК при гипоксии и реоксигенации может установить новые молекулярные мишени, задействованные в механизме адаптации клеток к гипоксии. Таким образом, в полной мере молекулярные механизмы адаптации ГМК сосудов к дефициту кислорода изучены недостаточно.

В связи этим, актуальность исследования Бирулиной Ю.Г. о роли калиевых каналов и газовых посредников (монооксида углерода и сероводорода) в механизмах регуляции сократительной активности гладких мышц сосудов в условиях гипоксии и реоксигенации не вызывает сомнений.

Научная новизна. В диссертационной работе установлено несколько новых фактов. Убедительно продемонстрировано релаксирующее действие гипоксии и реоксигенации на предсокращенные гиперкалиевым раствором или фенилэфрином ГМК аорты. Участие калиевых каналов различного типа в реализации данного явления адаптации и стало предметом исследования диссертации. Установлено, что вазорелаксирующие эффекты гипоксии и реоксигенации обусловлены открыванием потенциал-зависимых и/или Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов мембраны ГМК, а при действии фенилэфрина – дополнительно активацией АТФ-чувствительных калиевых каналов.

Получены новые данные о том, что гипоксия и реоксигенация ослабляет релаксирующее влияние монооксида углерода на сокращение сосудистых сегментов, индуцированные гиперкалиевым раствором или фенилэфрином. Установлено, что сероводород при гипоксии и реоксигенации вызывает снижение механического напряжения ГМК, предсокращенных гиперкалиевым раствором, но оказывает разнонаправленные эффекты на сокращения ГМК, вызванные фенилэфрином: угнетает при гипоксии и потенцирует при реоксигенации.

Обзор. Нужно сказать, что действие гипоксии на ГМК и вазодилаторные свойства СО и сульфида водорода изучаются уже давно. Их эффекты довольно сложны. Так, известно, что СО активирует растворимую GC, MAPK и Ca^{2+} -зависимый K^+ канал. Предполагается, что H_2S является третьим газовым медиатором и действует через открытие КАТР каналов. По крайней мере, на изолированных гладких мышцах сосудов показано, что H_2S непосредственно активирует КАТР канал и гиперполяризует мембрану. Но в отличие от NO и СО, расслабляющий эффект H_2S не зависит от активации cGMP-зависимого сигнального пути.

В приведенном обзоре достаточно полно описаны, как явление повреждения клеток при гипоксии и реоксигенации, так и адаптационные процессы, направленные на ослабление их повреждающего действия. Приведены литературные данные о том, что гипоксия в определенных условиях вызывает расслабление гладких мышц (ГМ) сосудов и снижает силу их сокращений. Рассмотрены механизмы регуляции Ca^{2+} в цитозоле клеток с участием АТР- и Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов, АФК, и O_2 -регулируемых $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -зависимых факторов транскрипции. При описании роли газовых посредников в регуляции функциональных свойств гладкомышечных клеток автор обращает внимание, что способность СО модулировать активность BK_{Ca} -каналов рассматривается многими исследователями как основополагающий механизм действия данного газомедиатора, хотя СО активирует и $\text{K}^+_{\text{АТФ}}$ -каналы и K^+_v -каналы. Расслабляющее действие сероводорода на гладкую мышцу также вносят значительный вклад $\text{K}^+_{\text{АТФ}}$ - BK_{Ca} - и K^+_v -каналы плазматической мембраны.

Теоретическая и практическая значимость работы не вызывает сомнений. Данные, полученные Бирулиной Ю.Г., вносят существенный вклад в развитие фундаментальных представлений о механизмах регуляции сокращения гладких мышц сосудов при гипоксии и реоксигенации. Установленные новые факты в действии газовых посредников – монооксида углерода и сероводорода – на сократительную активность гладких мышц при гипоксии и реоксигенации открывают новые подходы в коррекции патологических состояний, связанных с нарушением функции ГМК кровеносных сосудов.

Обоснованность и достоверность результатов исследования. Диссертационная работа Бирулиной Ю.Г. представляет собой законченное научное исследование, выполненное с использованием механографического и радионуклидного методов исследования. Полученные результаты обработаны с помощью адекватных методов статистического анализа, обеспечивающих достоверность и надежность выводов проведенной работы. Основные научные

положения, выдвигаемые соискателем, достаточно полно изложены в опубликованных по теме диссертации печатных работах, из которых 6 опубликованы в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ: 1 научная статья в зарубежном журнале и 7 – статей и тезисов в материалах конференций и симпозиумов. Научные исследования Бирулиной Ю.Г. неоднократно докладывались и обсуждались на конференциях и симпозиумах российского и международного уровня, поддержаны грантами ФЦП и РФФИ.

Структура диссертации. Диссертация изложена грамотным литературным языком на 118 страницах машинописного текста, состоит из введения, глав «Обзор литературы», «Материал и методы исследования», «Результаты собственных исследований и их обсуждение», заключения, выводов и списка литературы. Работа содержит 5 таблиц, иллюстрирована 26 рисунками. Библиографический список включает 242 источников, из которых 192 – зарубежные.

Во введении диссертант обосновывает целесообразность проведения исследования, его научную новизну, теоретическую и практическую значимость. Корректно формулирует цель, задачи диссертационной работы и положения, выносимые на защиту.

Первая глава представляет собой обзор литературы по исследуемой тематике, в котором анализируются процессы, происходящие при гипоксии и реоксигенации в ГМК кровеносных сосудов, приводятся данные о наиболее вероятных механизмах их влиянии на сократительную активность ГМК, анализируются метаболизм и роль газовых посредников (монооксида углерода и сероводорода) в регуляции сокращений гладких мышц.

Вторая глава посвящена описанию материала и методов, используемых в ходе проведения научного исследования. Подробно описана методология приготовления изолированных препаратов гладких мышц аорты крысы и моделирования условий гипоксии. Представлены протоколы исследования сократительной активности сосудистых гладкомышечных сегментов с помощью специализированной механографической установки, определения внутриклеточного содержания АТФ и одновалентных катионов радионуклидным методом в культуре ГМК аорты крысы. Кратко описаны методы проведения статистического анализа полученных результатов.

В третьей главе приводятся результаты, полученные в ходе выполнения исследования, и их обсуждение. Глава состоит из 4 разделов, посвященных изучению влияния гипоксии и реоксигенации на сократительные реакции гладких мышц аорты крысы, вызванные действием гиперкалиевого раствора или агониста α_1 -адренорецепторов фенилэфрина.

При исследовании влияния гипоксии и реоксигенации на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы, индуцированную гиперкалиевым раствором или фенилэфрином, показано, что снижение уровня кислорода в растворе вызывало статистически значимое угнетение сократительной активности, вызванное добавлением 30 мМ раствора KCl.

Во второй модели для предсокращения ГМК аорты применяли агонист α_1 -адренергических рецепторов, фенилэфрин. В этой серии экспериментов показано, что снижение содержания кислорода в растворе также достоверно угнетало сократительную реакцию, индуцированную ФЭ. Причем, гипоксия оказывала более сильное релаксирующее действие на сокращения ГМК, вызванные фенилэфрином, чем 30 мМ хлоридом калия.

В условиях реоксигенации амплитуда сокращений гладких мышц аорты, вызванных гиперкалиевым раствором, также подавлялась, и была достоверно меньше снижения амплитуды при гипоксии. Величина сократительного ответа сосудистых сегментов на действие 1 мкМ фенилэфрина в условиях реоксигенации также уменьшилась. Таким образом, в период реоксигенации, как и при гипоксии, происходило угнетение сократительных реакций ГМК аорты крысы, вызванных гиперкалиевым раствором или агонистом α_1 -адренорецепторов фенилэфрином.

При исследовании причин подавления силы сокращения сосудистых гладких мышц при гипоксии и реоксигенации диссертант показал, что релаксирующее действие обусловлено преимущественно активацией потенциал-зависимых и, вероятно, Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов плазматической мембраны ГМК, а при действии фенилэфрина - дополнительно активацией АТФ-чувствительных калиевых каналов. Блокатор калиевых каналов хлорид тетраэтиламмония обращал фенилэфрин-индуцированное сокращение, как при гипоксии, так и при реоксигенации. Полученные результаты свидетельствуют, что повышение калиевой проводимости мембран является причиной наблюдаемого подавления сократительной активности ГМК аорты крысы при гипоксии и реоксигенации.

В следующем разделе автор показывает, какие типы калиевых каналов участвуют в гиперполяризации ГМК при гипоксии и реоксигенации. Поскольку блокатор потенциал-зависимых (K_v)-каналов – 4-аминопиридин (4-АП) увеличивал амплитуду ФЭ-индуцированного сократительного ответа ГМК аорты в условиях гипоксии, автор делает вывод, что потенциал-зависимые (K_v)-каналы активируются при ФЭ-индуцированном сокращении ГМК в условиях гипоксии и реоксигенации.

При исследовании участия АТФ-чувствительных калиевых каналов в развитии гиперполяризации в условиях гипоксии и реоксигенации показано, что селективный блокатор $K_{\text{АТФ}}$ -каналов – глибенкламид не влиял на сокращение, индуцированное калиевой деполяризацией, но увеличивал амплитуду ФЭ-индуцированного сокращения ГМК при гипоксии и реоксигенации.

Полученные экспериментальные результаты проанализированы автором с привлечением литературных источников и согласуются с данными других авторов об участии потенциал-зависимых K^+ -каналов и АТФ-чувствительных калиевых каналов в процессах релаксации сосудистых ГМК при изменении их оксигенации.

В следующем разделе диссертации представлены результаты влияния газотрансмиттеров монооксида углерода (CO) и сероводорода (H_2S) на сократительную функцию гладких мышц аорты крысы при действии гипоксии и реоксигенации. Показано, что H_2S снижал величину сокращения гладких мышц, индуцированных гиперкалиевым раствором при гипоксии и реоксигенации, но по-разному влиял на сокращения ГМК, вызванные фенилэфрином: расслаблял при гипоксии и потенцировал при реоксигенации. Причины этого интересного явления в диссертации не исследованы, хотя частично обсуждены в обзоре.

При исследовании действия CO, показано, что донор CO дозозависимо подавлял сокращения, вызванные ФЭ и KCl, как в условиях нормоксии, так и в условиях гипоксии и реоксигенации; угнетая сокращение гладкомышечных клеток, вызванное фенилэфрином, несколько в большей степени, чем сокращение вызванное хлоридом калия.

Таким образом, в диссертации показано, что основной вклад в механизмы расслабления ГМ, предсокращенных гиперкалиевым раствором или ФЭ при гипоксии/реоксигенации, вносят потенциал-зависимые и/или Ca^{2+} -зависимые калиевые каналы мембраны ГМК аорты крысы. Участие АТФ-чувствительных K^+ -каналов в подавлении сокращения при гипоксии/реоксигенации была показана только в случае действия ФЭ.

Выводы представляют собой констатацию основных результатов, полученных в диссертации, соответствуют поставленным задачам, и полностью отражают результаты выполненного исследования. В них соискатель фиксирует полученные данные, касающиеся роли калиевых каналов и газовых посредников в регуляции сокращений гладких мышц сосудов при гипоксии и реоксигенации. Вывод 3 можно опустить, как элементарный и известный для многих типов клеток.

Автореферат диссертации полностью отражает содержание и основные научные положения диссертационной работы.

Замечания и вопросы. В целом, работа Бирулиной Юлии Георгиевны производит благоприятное впечатление, хотя и не лишена ряда недостатков. В работе отсутствует глава общего обсуждения, что не позволило автору описать общую картину адаптационных процессов, происходящих при гипоксии и реоксигенации в в ГМК. В работе не описаны механизмы передачи сигнала на различные типы калиевых каналов при действии KCl и ФЭ и недостаточно обсуждены различия сигнальных путей, ведущие к калий-зависимому торможению. Не оценен вклад иных (кроме калиевого потенциала) механизмов подавления Ca^{2+} каналов, принимающих участие в сокращении ГМК. В тексте встречаются опечатки и стилистические погрешности.

Название, на мой взгляд, неудачно объединяет каналы и трансмиттеры. Для целостности описания исследования лучше было оставить одно: роль калиевых каналов в расслабляющем действии гипоксии и реоксигенации.

Я бы не стал включать в положения, выносимые на защиту параграф, описывающий известные и давно очевидные явления снижения внутриклеточного уровня АТФ и концентрации ионов калия, и увеличения содержание ионов натрия при гипоксии в ГМК аорты крысы. Тем более, что автор сам пишет: «Изложенные выше процессы (происходящие при действии гипоксии) являются универсальными и протекают во многих клетках и тканях организма в ответ на действие гипоксии и реоксигенации». Сделанные замечания не являются принципиальными и носят рекомендательный характер.

Заключение. Диссертационная работа Бирулиной Ю.Г. на тему «Роль калиевых каналов и газотрансмиттеров в регуляции сокращений гладких мышц сосудов при гипоксии и реоксигенации» по специальностям 03.03.01 – физиология и 03.01.02 – биофизика представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение актуальной задачи по установлению роли отдельных типов калиевых каналов в ослаблении сокращения гладкомышечных клеток сосудов в условиях гипоксии и реоксигенации. Полученные результаты имеют существенное значение для понимания адаптационных процессов, происходящих в других тканях при гипоксии и реоксигенации.

Представленная диссертация Бирулиной Юлии Георгиевны по актуальности, научной новизне и значимости, методическому уровню, достоверности полученных результатов соответствует требованиям п. 9

«Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.03.01 – физиология, 03.01.02 – биофизика.

Официальный оппонент

Заведующий лабораторией
внутриклеточной сигнализации
ФГБУН Институт биофизики клетки РАН,
доктор биологических наук, профессор

Зинченко В. П.

«12» ноября 2016 г.

Заверяю:

Ученый секретарь
ФГБУН Институт биофизики клетки РАН,
канд. биол. наук



Масулис И.С.

Сведения

об официальном оппоненте по диссертационной работе Бирулиной Юлии Георгиевны на тему: «Роль калиевых каналов и газотрансмиттеров в регуляции сокращений гладких мышц сосудов при гипоксии и реоксигенации», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.03.01 – физиология и 03.01.02 – биофизика

Фамилия, имя, отчество оппонента	Зинченко Валерий Петрович
Год рождения, гражданство	1945 г.р., Российская Федерация
Ученая степень и отрасль науки	Доктор биологических наук
Полное название организации, являющейся основным местом работы оппонента	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук
Занимаемая должность	Заведующий лабораторией внутриклеточной сигнализации
Почтовый адрес, индекс	142290, г. Пущино, Московская область, ул. Институтская, 3, ИБК РАН
Телефон	8(4967)739162, 8-916-2354895
Адрес электронной почты	vpz@mail.ru
Список основных публикаций официального оппонента по профилю диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет	- Надеев А.Д., <u>Зинченко В.П.</u>, Авдонин П.В., Гончаров Н.В. Токсические и сигнальные свойства активных форм кислорода // Токсикологический вестник. 2014. № 2. С. 22-27. - Berezhnov A.V., Soutar M.P., Fedotova E.I., Frolova M.S., Plun-Favreau H., <u>Zinchenko V.P.</u>, Abramov A.Y. Intracellular pH Modulates Autophagy and Mitophagy // Journal of Biological Chemistry. 2016. Vol. 291(16). P. 8701-8708. - Dynnik V.V., Kononov A.V., Sergeev A.V., Tankanag A., <u>Zinchenko V.P.</u> To Break or to Brake Neuronal Network Accelerated by Ammonium Ions? // PLoS ONE. 2015. Vol. 10 (7). P. e0134145. - Silachev D.N., Plotnikov E.Y., Zorov D.B., Pevzner I.B., Babenko V.A., Zorov S.D., Popkov V.A., Jankauskas S.S., Zorova L.D., Sukhikh G.T., <u>Zinchenko V.P.</u> The

mitochondrion as a key regulator of ischaemic tolerance and injury // Heart, Lung and Circulation. 2014. Vol. 23, N 10. P. 897-904.

5. Turovskaya M.V., Turovsky E.A., Kononov A.V., Zinchenko V.P. Short-term hypoxia induces a selective death of gabaergic neurons // Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology. 2014. Vol. 8, N 1. P. 125-135.
6. Tukhovskaya E.A., Turovsky E.A., Turovskaya M.V., Levin S.G., Murashev A.N., Zinchenko V.P., Godukhin O.V. Anti-inflammatory cytokine interleukin-10 increases resistance to brain ischemia through modulation of ischemia-induced intracellular Ca²⁺ response // Neuroscience Letters. 2014. Vol. 571. P. 55-60.
7. Turovsky E.A., Turovskaya M.V., Kononov A.V., Zinchenko V.P. Short-term episodes of hypoxia induce posthypoxic hyperexcitability and selective death of gabaergic hippocampal neurons // Experimental Neurology. 2013. Vol. 250. P. 1-7.

Заверяю:

Ученый секретарь
ФГБУН Институт биофизики клетки РАН,
канд. биол. наук

Масулис И.С.



ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Бирулиной Юлии Георгиевны «Роль калиевых каналов и газотрансмиттеров в регуляции сокращений гладких мышц сосудов при гипоксии и реоксигенации», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертационная работа Бирулиной Ю. Г. «Роль калиевых каналов и газотрансмиттеров в регуляции сокращений гладких мышц сосудов при гипоксии и реоксигенации» является актуальной, прежде всего потому, что, несмотря на интенсивные исследования, механизмы регуляции сократительных свойств гладких мышц (ГМ) в физиологических и патологических условиях окончательно не установлены, имеются противоречивые данные. Особенно это касается молекулярных механизмов сопряжения возбуждения-сокращения в гладкомышечных клетках (ГМК) при нарушении их оксигенации. Последние играют важную роль в регуляции просвета кровеносных сосудов, а, следовательно, системного артериального давления и локального снабжения тканей кислородом. Необходимость идентификации и уточнения эффекторных систем, задействованных при гипоксии и реоксигенации, в первую очередь, продиктована целью адекватной коррекции патологических состояний, сопровождающихся данными явлениями. Особые перспективы при этом связывают с представителями семейства газовых посредников, в частности, монооксидом углерода (CO) и сероводородом (H₂S), которые, как предполагается, могут выполнять протекторную функцию, предотвращая нарушения функции ГМК сосудов при гипоксии и реоксигенации. Известно, что эндогенно продуцируемые, они способны оказывать модулирующее действие на сократительную и электрическую активность сосудистых гладких мышц. Данная работа является одной из немногих, в которой с использованием адекватных методов установлены внутриклеточные мишени действия газотрансмиттеров и механизмов их взаимодействия с классическими сигнальными системами в условиях гипоксии и реоксигенации, что может стать

основой для разработки подходов к управлению электрофизиологическими свойствами ГМК кровеносных сосудов при различных физиологических и патологических состояниях.

Научно-практическая значимость работы определяется установлением следующих основных закономерностей:

1. Установлено, что гипоксия и реоксигенация вызывает расслабление предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса или фенилэфрином сосудистых гладкомышечных сегментов, которое в большей степени проявляется на фоне действия агониста α_1 -адренорецепторов – фенилэфрина.

2. Показано, что вазорелаксирующие эффекты гипоксии и реоксигенации обусловлены открыванием не только потенциал-зависимых и, вероятно, Ca^{2+} -активируемых, но и АТФ-чувствительных калиевых каналов мембраны ГМК.

3. Убедительно доказано, что угнетение Na^+/K^+ -АТФазы, равно как и гипоксия, сопровождаются снижением внутриклеточного уровня АТФ, концентрации ионов калия, а также увеличением содержания ионов натрия в изолированных ГМК аорты крысы.

4. Получены данные о релаксирующем влиянии монооксида углерода на сокращения сосудистых сегментов, индуцированные гиперкалиевым раствором или фенилэфрином, при гипоксии и реоксигенации, а сероводород при гипоксии и реоксигенации вызывает снижение механического напряжения сосудистых гладкомышечных сегментов, предсокращенных гиперкалиевым раствором, тогда как фенилэфрин-индуцированные сокращения ГМК угнетаются при гипоксии и потенцируются при реоксигенации.

5. Использование комплекса современных методов исследования на 2-х моделях позволило довольно точно оценить механизмы сопряжения возбуждения-сокращения в ГМК и полосках аорты при действии газотрансмиттеров – монооксида углерода и сероводорода – на сократительные ответы гладких мышц при гипоксии и реоксигенации, что открывают перспективные подходы для разработки новых принципов коррекции

патологических состояний, связанных с нарушением двигательной функции ГМК кровеносных сосудов, в том числе обусловленных модификацией газовой коммуникации.

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Диссертационная работа Бирулиной Ю.Г. выполнена на высоком методологическом уровне, с применением современных методов исследования, позволяющих достаточно точно зарегистрировать изменения внутриклеточного состава катионов и сократительной активности гладких мышц при действии различных агентов. Полученные результаты были подвергнуты тщательной статистической обработке с использованием критериев статистического анализа, что не вызывает сомнений в их достоверности. Положения, выдвигаемые соискателем на защиту, в полной мере отражены в опубликованных по теме диссертации печатных работах, из которых 6 – в журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 1 научная статья в зарубежном журнале, 7 – статей и тезисов в материалах конференций российского и международного уровня. Научные изыскания диссертанта поддержаны грантами ФЦП и РФФИ.

Диссертация Бирулиной Ю. Г. построена по традиционной схеме и состоит из введения, литературного обзора, глав материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения и выводов, а также списка литературы, включающего 242 отечественных и зарубежных источников.

Во введении автор четко формулирует актуальность работы, ее цели и задачи. К сожалению, отсутствуют положения, выносимые на защиту.

Литературный обзор написан четко, хорошим литературным языком и состоит из 3 параграфов. В обзоре дан анализ имеющихся в литературе данных, убедительно разобраны механизмы регуляции сокращения и расслабления сосудов, влияние гипоксии, реоксигенации и действия газотрансмиттеров – монооксида углерода и сероводорода. Обзор хорошо иллюстрирован

конкретными схемами, что облегчает его чтение. Нужно отметить, к сожалению, что литературный обзор несколько перегружен информацией, свидетельствующей об эрудиции диссертанта, но не относящейся к теме работы. Самое главное, в обзоре нет достаточного заключения, которое подводит читателя к цели и задачам, проводимых диссертантом исследований.

В 2-ей главе подробно описываются материал и методы исследования. Необходимо подчеркнуть, что автор использовал самые современные методы. Приведена методология подготовки изолированных гладкомышечных препаратов аорты крысы, моделирования условий гипоксии. Корректно составлен протокол исследования сократительных реакций сосудистых сегментов с помощью специализированной механографической установки при действии различных тестирующих агентов. В достаточном объеме описана методика определения ионного гомеостаза радионуклидным методом и внутриклеточного содержания АТФ хемолюминисцентным методом в культуре гладкомышечных клеток аорты крысы. Статистический анализ данных выполнен согласно приведенным критериям.

В главе «Результаты исследований» подробно изложены полученные автором данные. Дан их анализ и сопоставлен с литературными данными, иными словами в этой главе описываются результаты и дано обсуждение результатов, полученных при выполнении исследования. Глава состоит из 4 разделов, каждый из которых логично вытекает из предыдущего. Автор с привлечением литературных данных анализирует все выявленные им закономерности влияния гипоксии и реоксигенации на сократительные свойства ГМК аорты крысы. Достаточно корректно диссертант описывает наблюдаемые различия в эффектах гиперкалиевого раствора и биологически активного вещества α_1 -адреномиметика фенилэфрина на сокращения сосудистых сегментов. Установленные вазорелаксирующие эффекты гипоксии и реоксигенации на гладкомышечные сегменты аорты крысы, согласно данным, могут быть связаны с активацией калиевых каналов мембраны ГМК, в

частности, потенциал-зависимых и/или Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов, также АТФ-чувствительных калиевых каналов, что было убедительно продемонстрировано на фоне действия фенилэфрина. Важным представляется выполненное диссертантом исследование ионного гомеостаза и активности Na^+/K^+ -АТФазы при гипоксии на примере изолированных ГМК аорты крысы, которое еще раз подтверждает возникновение ионного дисбаланса в клетках при дефиците кислорода. Отдельный раздел третьей главы посвящен изучению эффектов газовых посредников (CO и H_2S) на механическое напряжение сосудистых ГМК как в условиях нормоксии, так при гипоксии/реоксигенации. Показано, что монооксид углерода и сероводород способны оказывать различные вазоактивные эффекты при действии отличающихся по природе агентов. Не менее существенными являются выявленные особенности реагирования сосудистых гладкомышечных сегментов на воздействие доноров изучаемых газотрансмиттеров при гипоксии и реоксигенации. Полученные экспериментальные данные хорошо иллюстрированы и систематизированы. В заключении проведен краткий анализ полученных результатов, во многом повторяющийся в главе результатов.

Выводы, сформулированные соискателем по полученным результатам, соответствуют поставленным задачам, в полной мере отражают основные закономерности, касающиеся роли калиевых каналов и газовых посредников в механизмах регуляции сократительной активности сосудистых гладких мышц в условиях гипоксии и реоксигенации.

Автором опубликовано в отечественной и зарубежной печати 14 работ.

Принципиальных замечаний нет. Хотелось бы получить ответы на следующие вопросы, кроме замечаний, указанных выше:

1. Как тщательно контролировалась деэндотелизация сосудов.
2. Автор пишет, что вызванное ФЭ сокращение ГМК было достоверно ниже по амплитуде в сравнении с индуцированным 30 мМ KCl в гипоксическом

растворе. Однако из рисунков, представленных в диссертации и автореферате, я не нашел различий, а судя по таблице эти различия очень незначительны.

3. Почему при гипоксии гладкомышечные клетки инкубировали сутки, а с убаином – только 6 часов? И как это соотносится с часовым гипоксическим воздействием на сосуды?

4. Что известно автору о представленности разных типов калиевых каналов в ГМК аорты крыс по сравнению с другими артериями (прежде всего, с резистивными артериями большого круга). Я не встретил таких работ в литературном обзоре и при анализе полученных результатов.

5. В какой степени полученные результаты могут отражать изменения регуляции сопротивления сосудов разных органов при гипоксии/реоксигенации?

Заключение

Диссертационная работа Бирулиной Ю.Г. на тему «Роль калиевых каналов и газотрансммиттеров в регуляции сокращений гладких мышц сосудов при гипоксии и реоксигенации» по специальностям 03.03.01 – физиология и 03.01.02 – биофизика является законченной фундаментальной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи по установлению механизмов влияния калиевых каналов мембраны и газотрансммиттеров – монооксида углерода и сероводорода – на сократительные реакции сосудистых гладкомышечных клеток в условиях гипоксии и реоксигенации, имеющей существенное значение для физиологии и молекулярной биофизики. Представленная диссертация Бирулиной Юлии Георгиевны по актуальности, научной новизне и значимости, методическому уровню, достоверности полученных результатов соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой

ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.03.01 – физиология, 03.01.02 – биофизика.

Официальный оппонент
Главный научный сотрудник
лаборатории нейробиологии и
фундаментальных основ развития мозга
ФГАУ Научный центр здоровья детей Минздрава России,
доктор медицинских наук, профессор

Пинелис В.Г.

«13» октября 2016 г.

Заверяю:

Ученый секретарь
ФГАУ Научный центр здоровья
детей Минздрава России, д-р мед. наук

Антонова Е.В.



Сведения

об официальном оппоненте по диссертационной работе Бирулиной Юлии Георгиевны на тему: «Роль калиевых каналов и газотрансммиттеров в регуляции сокращений гладких мышц сосудов при гипоксии и реоксигенации», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.03.01 – физиология и 03.01.02 – биофизика

Фамилия, имя, отчество оппонента	Пинелис Всеволод Григорьевич
Год рождения, гражданство	1940 г.р., Российская Федерация
Ученая степень и отрасль науки	Доктор медицинских наук
Полное название организации, являющейся основным местом работы оппонента	Федеральное государственное автономное учреждение «Научный центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Занимаемая должность	Главный научный сотрудник лаборатории нейробиологии и фундаментальных основ развития мозга
Почтовый адрес, индекс	119991, г. Москва, Ломоносовский проспект, 2, стр. 1
Телефон	+7 (916) 686-77-24
Адрес электронной почты	pinelis@mail.ru
Список основных публикаций официального оппонента по профилю диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет	1. Сурин А.М., Горбачева Л.Р., Савинкова И.Г., Шарипов Р.Р., Ходоров Б.И., <u>Пинелис В.Г.</u> Исследование изменений [АТФ] в цитозоле индивидуальных нейронов при развитии глутамат-индуцированной дизрегуляции кальциевого гомеостаза // Биохимия. 2014. Т. 79, № 2. С. 196-208. 2. Сурин А.М., Красильникова И.А., <u>Пинелис В.Г.</u>, Ходоров Б.И. Исследование взаимосвязи между индуцированной глутаматом отсроченной Ca^{2+}-дизрегуляцией, митохондриальной деполяризацией и последующей гибелью нейронов // Патогенез. 2014. Т. 12, № 4. С. 40-46. 3. Safina D.R., Surin A.M., <u>Pinelis V.G.</u>, Kostrov S.V. Effect of neurotrophin-3 precursor on glutamate-induced calcium homeostasis deregulation in rat cerebellum granule cells // Journal of Neuroscience Research. 2015. Vol. 93, N 12. P. 1865–1873. 4. Persiyantseva N.A., Storozhevyykh T.P., Senilova Y.E., <u>Pinelis</u>

V.G., Gorbacheva L.R., Pomytkin I.A. Mitochondrial H₂O₂ as an enable signal for triggering autophosphorylation of insulin receptor in neurons // Journal of Molecular Signaling. 2013. Vol. 8. P. 11.

5. Khodorov B.I., Mikhailova M.M., Bolshakov A.P., Surin A.M., Sorokina E.G., Rozhnev S.A., Pinelis V.G. Dramatic effect of glycolysis inhibition on the cerebellar granule cells bioenergetics // Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. 2012. Vol. 29, Issue 2. P. 186–197.

6. Surin A.M., Khiroug S.S., Khiroug L., Khodorov B.I., Gorbacheva L.R., Pinelis V.G. Comparative analysis of cytosolic and mitochondrial ATP synthesis in embryonic and postnatal hippocampal neuronal cultures // Frontiers in Molecular Neuroscience. 2012. Vol. 5. URL: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2012.00102/full>

Главный научный сотрудник, проф.

Пинелис В.Г.

Подпись г. н. с., проф. Пинелиса В.Г. заверяю:

Ученый секретарь
ФГАУ Научный центр здоровья
детей Минздрава России, д-р мед. наук



Антонова Е.В.