

ОТЗЫВ

**официального оппонента Ситдиковой Гузель Фаритовны
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Швецовой Анастасии Алексеевны
на тему: «Калиевые каналы гладкомышечных клеток артерий крыс в
раннем постнатальном онтогенезе»
по специальности 03.03.01 – «Физиология»**

Актуальность темы диссертационной работы. Диссертационная работа **Швецовой Анастасии Алексеевны** посвящена актуальной проблеме физиологии – исследованию механизмов регуляции работы сердечно-сосудистой системы в онтогенезе. Известно, что сердце и сосуды претерпевают значительные морфологические и функциональные изменения в ходе развития. Поддержание низкого артериального давления у новорожденных организмов является защитным механизмом, снижающим нагрузку на незрелое сердце, и защищает сосуды от чрезмерного растяжения. Известны некоторые регуляторные механизмы, снижающие тонус сосудов в период раннего постнатального онтогенеза, такие как отсутствие симпатической иннервации, большой вклад оксида азота как сосудорасширяющего фактора. Однако, отсутствуют данные о собственных свойствах гладкомышечных клеток, обеспечивающих антиконстрикторное влияние на сосуды, таких как мембранный потенциал, а также о механизмах его формирования в ранний постнатальный период. С учетом современных данных о функциональной роли калиевых каналов в развитии ряда сердечно-сосудистых заболеваний как у взрослого, так и развивающегося организма, актуальность темы диссертационной работы не вызывает сомнения.

Научная новизна проведенных исследований и полученных результатов.

При решении поставленных задач и реализации положений, выносимых на защиту, автором впервые были показаны возрастные изменения функционирования и экспрессии целого ряда различных семейств калиевых каналов в периферических сосудах большого круга кровообращения. Впервые выявлена доминирующая роль потенциал-зависимых (K_v7) и двупоровых (TASK-1) калиевых каналов в поддержании мембранного потенциала покоя и сниженных сократительных ответов подкожной артерии крысы в возрасте 10-15 дней. Кроме того, выявлено, что TASK-1 каналы участвуют в поддержании низкого артериального давления в развивающемся организме. Наконец, обнаружено, что симпатическая иннервация не оказывает влияния на функциональные изменения K_{ir} , K_v7 и TASK-1 каналов в ходе постнатального онтогенеза.

Теоретическая и практическая значимость.

Диссертация Швецовой А.А. имеет важное теоретическое значение, так как вносит вклад в фундаментальные представления о регуляции сердечно-сосудистой системы в онтогенезе. В работе показано, что одним из механизмов, способствующих снижению тонуса сосудов новорожденного организма, может быть выраженное гиперполяризующее влияние большинства представителей калиевых каналов. Выявлены особенности экспрессии различных типов калиевых каналов в сосудах, обеспечивающих антиконстрикторную функцию на разных этапах развития животных. Работа имеет практическое значение, так как вскрывает новые механизмы развития патологий сердечно-сосудистой системы, особенно в детском возрасте, и соответственно, открывает возможности для создания новых лекарственных агентов для лечения данных патологий.

Структура и содержание работы.

Диссертация Швецовой А.А. изложена на 159 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения полученных данных, заключения, выводов и

приложения. Список литературы включает 268 источников. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 41 рисунком.

Во введении автор аргументировано обосновывает выбор темы исследования, представляет степень разработанности темы, описывает цель и задачи исследования, кроме того, здесь обозначены научная новизна и научно-практическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту, также отражены апробация работы, реализация результатов исследования, структура и объем диссертации.

Обзор литературы в достаточной степени предоставляет читателю информацию о различных типах калиевых каналов, участвующих в реализации функций гладкомышечных клеток артерий. Подробно описаны особенности строения различных типов потенциал-зависимых калиевых каналов, кальций-активируемых калиевых каналов большой проводимости, калиевых каналов входящего выпрямления, АТФ-зависимых калиевых каналов и двупоровых калиевых каналов. Кроме того, автор приводит известные сведения об антиконстрикторной роли калиевых каналов при взрослении организма, которая к настоящему времени была показана только в нескольких сосудистых регионах, а именно, в артериях легких, мозга и артериях эластического типа большого круга кровообращения.

Из представленного обзора становится понятно, что роль различных типов калиевых каналов в ходе онтогенеза недостаточно изучена в сосудах резистивного типа, а вклад различных подсемейств K_v каналов, K_{ir} и K_{2p} каналов в артериях в период раннего постнатального онтогенеза не определен. Не изучены и механизмы возрастных изменений экспрессии калиевых каналов в сосудах.

В главе «Материалы и методы» очень подробно описаны методики, отражены протоколы экспериментов, обработка результатов и статистический анализ полученных данных. Надо отметить комплексный подход выполнения исследования, в котором использованы методики, позволяющие оценить функциональное состояние гладкомышечных

препаратов с помощью тензометрических и электрофизиологических методов. С использованием молекулярно-биологических методов исследовали уровень экспрессии различных типов калиевых каналов в разных возрастных группах животных, наконец, в исследованиях на целом животном были проведены измерения артериального давления. Описаны возрастные группы животных и экспериментальная модель неонатальной десимпатизации. Основная часть работы выполнена с использованием тензометрических методов, позволяющих оценить сократительные ответы изолированных артерий животных различных возрастов. Подробно описаны процедуры приготовления препарата и удаления эндотелия, растворы и используемые фармакологические агенты, протоколы нормализации для стандартизации полученных данных, проверки препарата на удаление эндотелия. Подробно рассмотрена методика измерения мембранного потенциала гладкомышечных клеток сосудов, приведены критерии оценки положения микроэлектродов и успешной записи мембранного потенциала. Далее рассмотрены методики определения содержания мРНК методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, содержания белков в ткани артерий методом Western Blotting. Наконец, описаны эксперименты по регистрации артериального давления и частоты сердечных сокращений у наркотизированных крыс, где подробно описаны и методики изготовления катетеров, проведения операции и сам протокол регистрации артериального давления.

В главе «Результаты» последовательно приведены данные по изучению возрастных изменений функциональной роли различных типов калиевых каналов в подкожной артерии крысы. В первую очередь были выявлены эффекты блокаторов K_{ATP} , BK_{Ca} , K_{ir} , K_v1 , K_v2 и K_v7 , TASK-1 каналов на сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста. В результате этой экспериментальной части было обнаружено, что K_{ATP} -каналы не оказывают влияния на сократительные ответы в обеих группах животных, BK -каналы оказывают значительные эффекты в артериях 2-3 мес. крыс, тогда

как роль других типов каналов значительно выше в раннем постнатальном периоде. Следующая часть данной главы посвящена изучению вклада K_{ir} , K_v7 и TASK-1 в поддержание мембранного потенциала покоя гладкомышечных клеток у крыс разных возрастов. Полученные данные показали, что в артериях 10-15-дневных крыс существенный вклад K_{ir} , K_v7 и TASK-1 каналов в регуляцию сократительных ответов связан с их влиянием на мембранный потенциал гладкой мышцы. В третьей части главы «Результаты» с использованием молекулярно-биологических методов была оценена экспрессия генов, кодирующих субъединицы тех семейств калиевых каналов, вклад которых наиболее ярко изменяется в ходе взросления организма, а именно BK_{Ca} , K_{ir} , K_v7 и K_{2P} каналов. Результаты проведенных ПЦР-исследований продемонстрировали более высокое содержание мРНК BK_{Ca} каналов в артериях взрослых крыс, а большинства представителей K_{ir} , K_v7 и K_{2P} – в артериальной ткани 10-15-дневных крысят, что согласуется с данными функциональных экспериментов. Наконец, в исследованиях на целом животном был проанализирован вклад одного из ключевых типов К-каналов (TASK-1) в поддержание низкого артериального давления у крыс 10-15 дней после рождения.

Для анализа возможного трофического влияния симпатической иннервации на возраст-зависимое изменение функциональной роли калиевых каналов использовали модель хронической неонатальной десимпатизации. В этой модели оценивали эффекты блокаторов K_{ir} , K_v7 и TASK-1 каналов, а также содержание мРНК порообразующих субъединиц K_{ir} каналов и некоторых представителей K_{2P} каналов в гладкой мышце артерий. Полученные данные не выявили эффектов десимпатизации на эффекты блокаторов каналов у взрослых животных.

Глава «Обсуждение результатов» включает обобщение полученных результатов, их интерпретацию, сопоставление с имеющимися данными в мировой литературе. Изложение и интерпретация представленных в разделе

материалов обосновывает положения диссертации, выносимые на защиту, и логически подводит к выводам работы.

Выводы диссертации обоснованы результатами исследования и соответствуют решению поставленных задач.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, результатов и выводов.

Все использованные в работе объекты и методы, включая статистические методы обработки результатов, выбраны корректно. Достоверность полученных данных не вызывает сомнения.

Текст диссертации соответствует установленным правилам научного цитирования, библиографические ссылки оформлены корректно.

Диссертационное исследование по своему содержанию соответствует заявленной специальности 03.03.01 – «Физиология».

Основные идеи и положения диссертационной работы отражены в научных публикациях. По теме исследования опубликованы 4 статьи и 2 тезисов докладов конференций в журналах, индексируемых аналитическими базами Web of Science, Scopus и RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.03.06. по специальности физиология 03.03.01 (объемом 52 п.л.), а также 9 тезисов в сборниках докладов научных конференций. Публикации полностью соответствуют теме диссертационного исследования и раскрывают его основные положения.

Аннотация соответствует всем требованиям, предъявляемым к подобным работам, дает полное представление о структуре, объеме и содержании диссертации.

Вопросы и замечания.

При ознакомлении и анализе материалов, изложенных в диссертации, возник ряд вопросов и замечаний.

Вопросы:

1. Насколько специфичным является $BaCl_2$ в качестве блокатора K_{ir} каналов?

2. Ранее в Вашей лаборатории были исследованы возрастные особенности действия оксида азота, который может как прямо, так и опосредованно регулировать активность калиевых каналов. Каков вклад NO в реализацию антиконстрикторных эффектов K-каналов в раннем онтогенезе?

3. Практическое значение Вашей работы связано с раскрытием механизмов патологий сердечно-сосудистой системы, связанных с нарушениями работы K-каналов. Какие это могут быть патологии, и какие известны нарушения функций и регуляций K-каналов при таких состояниях?

4. В работе установлено, что снижение функциональной роли K_{ir} , K_v7 и TASK-1 каналов в подкожной артерии крыс не связано с трофическим влиянием симпатических нервов? Не очень понятно, каков может быть механизм такого влияния? Если этот механизм не работает, то какие механизмы предположительно обеспечивают возрастные различия функций калиевых каналов?

Замечания и рекомендации:

В материалах и методах не указан протокол этического комитета МГУ, разрешающий проведение данного исследования.

Заключение о соответствии диссертации предъявляемым требованиям.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.03.01 – «Физиология» по биологическим наукам, а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном

университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Швецова Анастасия Алексеевна вполне заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – «Физиология».

Официальный оппонент:

Ситдикова Гузель Фаритовна

Доктор биологических наук, профессор

Заведующий кафедрой физиологии человека и животных ИФМиБ ФГАОУ
ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет"

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация: 03.00.13 Физиология

Адрес: 420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18, Казанский федеральный
университет, Институт фундаментальной медицины и биологии

Тел. [REDACTED]

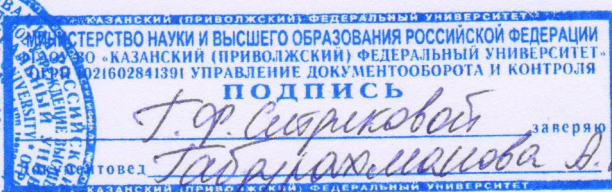
Адрес электронной почты: Guzel.Sitdikova@kpfu.ru

«4» октября 2019 года

Г.Ф. Ситдикова

Г.Ф. Ситдикова

Подпись Г.Ф. Ситдиковой заверяю



Т.Ф. Ситдикова заверяю
Габдурахманова А.Р.