

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук**

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при ИБХ РАН
26 октября 2022 года

Защита диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Котовой Дарьи Андреевны

По теме: «*In vivo* исследования редокс- процессов в клетках головного
мозга при развитии ишемического инсульта на животных моделях с
помощью генетически кодируемых биосенсоров»

Специальность 1.5.3 – «Молекулярная биология»

Москва – 2022

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 26 октября 2022 года

Председатель
диссертационного совета

д.х.н., академик РАН Мирошников А.И.

Учёный секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

Из 30 членов совета присутствует 21 человек, из них докторов по профилю диссертации – 7.

1. Академик РАН, д.х.н.	Мирошников Анатолий Иванович	(1.5.6)
2. Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(1.4.9)
3. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
4. Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
5. Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(1.4.9)
6. Д.х.н.	Белогуров Алексей Анатольевич	(1.5.3)
7. Академик РАН, д.х.н.	Габибов Александр Габибович	(1.5.6)
8. Академик РАН, д.б.н.	Деев Сергей Михайлович	(1.5.3)
9. Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(1.5.3)
10. Член-корр. РАН, д.б.н.	Завриев Сергей Кириакович	(1.5.6)
11. Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(1.5.3)
12. Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(1.5.6)
13. Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(1.5.3)
14. Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
15. Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
16. Д.х.н.	Смирнов Иван Витальевич	(1.4.9)
17. Член-корр. РАН, д.б.н.	Тоневицкий Александр Григорьевич	(1.5.6)
18. Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(1.4.9)
19. Член-корр. РАН, д.х.н.	Цетлин Виктор Ионович	(1.4.9)
20. Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(1.4.9)
21. Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(1.4.9)

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета:

Перейдем к защите диссертации Котовой Дарьи Андреевны: “In vivo исследования редокс-процессов в клетках головного мозга при развитии ишемического инсульта на животных моделях с помощью генетически кодируемых биосенсоров”. Специальность - молекулярная биология. Научный руководитель - Дмитрий Сергеевич Билан, официальные оппоненты - Силачев Денис Николаевич, МГУ, выступает по Zoom, Демьяненко Светлана Викторовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории “Молекулярная нейробиология” Академия биологии и биотехнологии имени Ивановского Южного Федерального Университета. Очень интересно, это даже у нас коллега из Ростова приехала. И ведущая организация: “Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук”.

Значит, Владимир Александрович, Вам слово.

Олейников В.А., учёный секретарь

Так, материалы личного дела: Котова Дарья Андреевна, Гражданка Российской Федерации окончила Московский государственный университет имени Ломоносова в девятнадцатом году, магистр по направлению общая биохимия, 2019-2020 – лаборант - исследователь, с 2020 - по настоящее время младший научный сотрудник группы метаболических основ патологии нашего института, с 2019 по 2022 год - младший научный сотрудник РНИМУ имени Пирогова. Кандидатский экзамен по специальности “Молекулярная биология” сдан с оценкой “отлично”. Работа выполнена в группе метаболических основы патологии ИБХ РАН, научный руководитель - Билан Дмитрий Сергеевич, он руководитель группы метоболических основ патологии ИБХ РАН. По теме диссертации опубликовано 8 научных статей. Объявление о защите, автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя: 16 августа 2022 года и все необходимые документы в деле есть.

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Так, ну так что, Дарья Андреевна? Пожалуйста, Вам 20 минут.

Котова Д.А., соискатель

(Излагает основные положения диссертационной работы)

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Спасибо, Дарья Андреевна. Пожалуйста, вопросы. Никого не интересует? Пожалуйста, Алексей!

Белогуров А.А., член диссертационного совета

Скажите пожалуйста, вот, может быть, мой вопрос непрофессиональным совсем покажется, но мне просто действительно самому интересно. Вот как Вы считаете, ну наверное все-таки следующий слайд, где у Вас закисление показано, где Вы исследовали закисление, ацидоз в нейронах, да вот этот!

Т.е. ну может это у Вас как-то прозвучало, а я не совсем понял, но вот ацидоз, так. У нейронов происходит.

Котова Д.А., соискатель

Да

Белогуров А.А., член диссертационного совета

Это хорошо или плохо? С Вашей точки зрения. И тогда я продолжу свой вопрос.

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

В зависимости от ответа?

Белогуров А.А., член диссертационного совета

От развития, да

Котова Д.А., соискатель

Ацидоз является одним из возможных факторов, по которым нейроны выживают в условиях гипоксии.

Белогуров А.А., член диссертационного совета

Ну да.

Котова Д.А., соискатель

Как известно, переходя на режим, в котором они (нейроны) не могут получать энергию от окислительного фосфорилирования, клетка переходит на, соответственно, гликолиз и происходит массовая продукция лактата как от близлежащих, близстоящих к ним клеткам, таких как астроциты, так и внутри самих нейронов. И есть некоторое представление о том, что астроциты с помощью монокарбоксилатных транспортеров передают лактат нейронам для того, чтобы они поддерживали свой функциональный статус и могли получать как-то энергию. Так что, конечно, на короткой дистанции, наверное, это полезный источник энергии, однако с течением времени, естественно, те механизмы, по которым ранее функционировали нейроны, становятся невозможными. И это приводит к каким-то негативным последствиям.

Белогуров А.А., член диссертационного совета

Ну да. В этом и был мой, в общем, второй вопрос, что именно стоит ли с этим бороться и в какой момент?

Котова Д.А., соискатель

Это вопрос, над которым мы сейчас активно работаем. Мы также проводим исследования и на коре головного мозга и непосредственно в зоне пенумбры. В зоне пенумбры, в смысле в коре, там, где еще наблюдается какое-то изменение вследствие ишемии, однако оно может быть обратимым. И если, оно обратимо, то клетки могут выжить в этих условиях. Конечно, нужно воздействовать на тот процесс, в котором мы можем получить какой-то эффект.

Белогуров А.А., член диссертационного совета

Ну да. То есть снимать закисление чуть не сразу, а чуть позже. Правильно я понимаю логику?

Котова Д.А., соискатель

Да, да.

Белогуров А.А., член диссертационного совета

Спасибо большое!

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Спасибо. Еще вопросы? Пожалуйста.

Долгих Д.А., член диссертационного совета

Скажите, пожалуйста, вот Вы сравнивали свои параметры, звучало это, с тяжестью инсульта. А вот инсульт у крыс, да, вот так сказать, есть ли какие-то объективные параметры, по которым Вы говорите: “вот здесь он идет хуже, здесь, так сказать, более тяжелый или лёгкий или это вот как-то приблизительно?”

Котова Д.А., соискатель

Да, я поняла. Спасибо большое. Ваш вопрос совпал с вопросом от моего оппонента, и я тогда сразу на него отвечаю. То, о чем мы говорим, что тяжесть инсульта никак не коррелировала с тем, возвращается ли рН к исходным значениям или нет. Мы как оцениваем этот параметр. После проведения экспериментов, животное выводится из эксперимента, делаются аккуратные срезы мозга, 2 мм, которые далее окрашиваются специальным красителем, который называется ТТХ - трифенилтетразолийхлорид, по степени окрашивания которого можно оценить, где у нас находятся еще функционирующие клетки. То есть это скорее окрашивание не на погибшую ткань, а на дегидрогеназную реакцию, которая продолжается в некоторых клетках головного мозга, и вот там, где продолжается дегидрогеназная реакция, там краситель становится ярко-красного цвета, т.е. это живая ткань. Мы делаем срезы мозга, фотографируем их с двух сторон и далее в специальной программе высчитываем объем повреждений головного мозга, и сравнивали с помощью t-теста, как и в каких случаях у нас восстанавливается, в каких не восстанавливается рН, и мы не показали значимого различия в этом случае.

Долгих Д.А., член диссертационного совета

Ну т.е. параметр какой-то цифровой-числовой у Вас есть?

Котова Д.А., соискатель

Да-да

Долгих Д.А., член диссертационного совета

Спасибо!

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Спасибо. Еще вопросы? Нет? Отдохните немножко (*обращение к выступающему*).

Так, Владимир Александрович, пожалуйста.

Олейников В.А., учёный секретарь

А руководитель?

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

А, руководитель, да.

Где Дмитрий Сергеевич?

Билан Д.С., научный руководитель диссертанта

Здравствуйте, уважаемые члены диссертационного совета, уважаемые коллеги. Хочу сказать, что в эти минуты испытываю чувство радости и гордости. Во-первых, я несказанно горд, что в нашем молодом коллективе выросла вот такая специалистка. Я всем искренне желаю работать с аспирантами и аспирантками с тем же уровнем ответственности и дисциплинированности, жизнелюбия, которые присущи Дарье Андреевне. А во-вторых, я болею душой за этот проект. В нашей лаборатории это первый проект, который мы выставляем на защиту. Дарья Андреевна пришла к нам еще во времена студенчества, и я помню собеседование, когда она сказала, что белковые молекулы являются конечной точкой любого научного исследования. И на тот момент

мы не занимались никакими *in vivo* технологиями, мы разрабатывали молекулярные инструменты и, собственно, у нее работа началась с того, что она оптимизировала свойства некой флуоресцентной белковой молекулы, и потом мы окунулись в *in vivo* исследования и нам захотелось использовать те инструменты, которые мы разрабатываем в различных моделях. Собрали команду, в основном состоящую из биохимиков и молекулярщиков. Биохимики и молекулярщики не особо умеют работать с животными, поэтому приходилось записываться на какие-то тренинги: “Как правильно держать крысу или как правильно, отличить артерию от вены на практике”. Но на сегодняшний момент готов сказать, что у нас очень сильный коллектив и мы конкурентноспособные на мировом уровне. Такие исследования мы проводим не хуже, чем в любой точке мира, ну по крайней мере на сегодняшний день. И как вы заметили этот проект очень междисциплинарный, т.е. здесь хватает и биохимии, и молекулярной биологии, и нужно работать с клетками, и необходимо осваивать навыки экспериментальной хирургии, и физики. И, собственно, Дарья Андреевна, которая заканчивала кафедру биохимии, она, собственно, стала еще и экспериментальным хирургом. И она выступала в роли не только исследователя, но и в роли координатора, который координирует работу биологов и физиков. Дарья Андреевна умеет писать статьи, умеет писать отчеты, заявки, не боится трудностей, не боится начинать что-то новое, поэтому дорогие коллеги, я с уверенностью представляю вам сотрудника, сотрудницу, которая выросла в стенах нашего замечательного института, и конечно же она достойна степени кандидата биологических наук. Спасибо!

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Спасибо!

Олейников В.А., учёный секретарь

(Зачитывает заключение организации, где была выполнена диссертация).

Ну теперь очередь заключению, во-первых, организации, в которой выполнялась работа. Организация — это наш институт, институт Биоорганической химии. Опять же биографические данные были зачитаны и оглашены в самом начале еще, но я повторю, что Котова закончила МГУ в 2019 году. Научный руководитель - Дмитрий Сергеевич Билан, только что выступал. Тема диссертационной работы в 2019 же году была утверждена, ну и соответственно, у меня тут в руках заключение, в котором конечным моментом является - рекомендовать диссертацию к защите. Ну первый пункт - актуальность темы. Ну здесь много написано, чуть ли не 2 страницы, на самом деле, очень хорошо было аккумулировано в докладе о важности инсульта, важности поиска подходов к пониманию механизмов молекулярных и очень важно, так сказать, новые типы сенсоров оптических, которые применяются. Это в общем сразу дает очень хороший шаг вперед в исследованиях, что было использовано блестяще в данной диссертации. Новизна и практическая значимость — это опять же, так сказать, свойственно тем же. Ну и фактически дальше идет подробное описание, что конкретно было сделано. Я не буду повторять, поскольку в докладе это тоже прозвучало. Ну важным является то, что по крайней мере в течение трех лет развивалось и вклад личный диссертанта здесь очень велик, и, соответственно, большое количество статей здесь прямо в заключении здесь перечислены. Соответствие специальности — да, эта диссертационная работа Котовой соответствует заявленной специальности 1.5.3 - Молекулярная биология. Все достаточно полно опубликовано, все достаточно достоверно. Ну и в целом заключение говорит о том, что диссертация рекомендована к защите. Оно принято на заседании открытого межлабораторного семинара отдела метаболизма и редокс-биологии. Подписано секретарем семинара - Храмова Ю.В, зам. директора Смирнов Иван Витальевич, и утверждено директором института Александром Габировичем Габировым, академиком РАН. Это что касается заключения организации.

Теперь отзыв ведущей организации, в качестве которой выступал институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, отзыв полностью положительный.

(Зачитывает отзыв ведущей организации, отзыв положительный).

Опять же, так сказать, актуальность очень хорошо подчеркнута и сформулирована. Поставленная задача, в работе поставлена задача: исследовать динамику некоторых биохимических параметров, в частности рН, концентрацию перекиси водорода, соотношения НАД/НАДН в тканях головного мозга *in vivo* при развитии ишемического инсульта с помощью генетически кодируемых биосенсоров. Это постановка задачи, новизна - говорится очень, так сказать, подчеркивается. Достоверность полученных результатов подтверждается фактически публикациями автора в рецензируемых научных журналах. Задача исследования корректно сформулирована, соответствует поставленной цели. Содержание диссертации построено по традиционной схеме, изложено на 119 страницах, список литературы включает 307 наименований. Ну опять же во введении сформулированы цель и задачи работы. По самой диссертации: каждый сделанный вывод из научных положений отражает новые экспериментальные данные, полученные в диссертационном исследовании. Существенных замечаний по диссертационной работе - нет, однако в тексте встречаются небольшие опечатки, имеется также уточняющий вопрос к диссертанту, что в целом не влияет на общую положительную оценку работы. Теперь вопрос: “ На рисунке 21Б диссертации ответ на аппликацию лактата имеет циклический характер. Это случайность или ответ может быть в виде волн с периодом в 600 секунд.”. Но этот вопрос единственный, дальше заключение идет о том, что в работе получены новые данные. По актуальности, достоверности и новизне, результатов, выводов соответствует требованиям, предъявляемым к диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Автор - Котова Дарья Андреевна, несомненно, достойна присуждения ей этой степени. Ну все соответствует положениям ВАК, сама диссертация. Отзыв обсужден и утвержден на открытом заседании лаборатории клеточной нейробиологии и ведущий, подписал ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной нейробиологии обучения, доктор биологических наук - Никитин Е.С. Ну и соответственно этот отзыв утвержден директором института Высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, профессор РАН, доктор биологических наук - Малышев. Ну вот единственный вопрос тут.

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Дарья Андреевна, будем обсуждать рисунок 21Б?

Котова Д.А., соискатель

Этот вопрос, наверное, я частично на него уже ответила, когда говорила, про то, что, какие могут быть механизмы транспорта лактата. Да, и возможно, действительно эти волны связаны с транспортом лактата через монокарбоксилатные транспортеры, которые могут вносить свой вклад в развитие периодических колебаний, но какого-то точного ответа на этот вопрос дать нельзя. Мы находимся на стадии экспериментов на животной модели, поскольку мы обнаружили, что в коре головного мозга наблюдаются тоже такие же колебания, правда, периодичность у них больше, но как мне кажется, это тоже очень интересный факт, который нам предстоит выяснить в дальнейшем.

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Спасибо. Так, официальные оппоненты. Вот я предлагаю Светлане Викторовне Демьяненко выступить сначала, поскольку второй оппонент будет по зуму. Светлана

Викторовна, Вы здесь? Не часто к нам все-таки приезжают из Южного научного центра.

Демьяненко С.В., официальный оппонент

(Излагает отзыв, отзыв положительный).

Спасибо за приглашение. Глубокоуважаемые председатель, члены диссертационного совета, коллеги! Ну актуальности работы Котовой Дарьи Андреевны я, наверное, не буду касаться. Понятно, что разработка экспериментальных методов прижизненной фиксации короткоживущих биохимических показателей, причем как в различных типах клеток: в данной работе были использованы нейроны и астроциты, так и в разных компартментах клеток, в цитозоле и митохондриях, это необычайно актуально. Тем более, когда речь идет о редокс-статусе клетки, например, что характерно для ишемии и реперфузии. Что касается использованных биосенсоров, то тут нужно сказать, что эти биосенсоры использовались давно и основной заслугой Дарьи Андреевны — это то, что она смогла их использовать и сделать такие установки, которые позволили их применять наиболее эффективно. То есть для опытов *in vitro*, т.е. на культивируемых первичных культурах гиппокампа, была создана установка, которая позволила очень быстро менять уровень кислорода, и тем самым изучать баланс перекиси водорода, баланс окисленной/восстановленной формы НАД, баланс изменения рН чуть ли не с первых секунд эксперимента. Очень сложная установка использовалась Дарьей Андреевной в работе при моделировании окклюзии средней мозговой артерии, которая позволила выявить результаты, которые в принципе, противоречат точке зрения общепринятой биохимии, точке зрения общепринятым положениям исследователей по инсульту. Поскольку я, занимаясь этим, как и большинство считала, что активация, наработка активных форм кислорода начинается чуть ли не с первых часов повреждения, однако Дарье Андреевне удалось очень убедительно показать, что это не так, и наработка перекиси водорода идет только после 20 часов эксперимента. Кроме того, Дарья Андреевна не вынесла результаты исследования в отдельные выводы, но тем не менее она упоминает это в автореферате. Она говорит о том, что эксперименты *in vitro*, т.е. на культурах клеток не всегда совпадают с экспериментами *in vivo*, и это кажется очевидным фактом, но тем не менее, публикаций, которые бы убедительно это показали, как публикация Дарьи Андреевны, таких немного. Что касается замечаний. Работа очень большая и, насколько я знаю, подобные биосенсоры были использованы еще в 2010 году, если я не ошибаюсь. Хотелось бы просто более четко понять для себя личный вклад Дарьи Андреевны в данную работу, но его мы можем прочитать в отзыве научного руководителя, который вывешен на сайте. Кроме того, у меня есть несколько мелких замечаний опять-таки: не везде упоминаются рисунки, не очень хорошего качества рисунки, есть недочеты. Работа проведена огромная и лично мне при ознакомлении с работой не хватило просто графика или рисунка, в котором поэтапно бы была показана логика исследования. По существу работы. Первый вопрос о том, каким образом оценивалась тяжесть инсульта уже был задан. Понятно, что тяжесть инсульта оценивали по объему повреждения уже после эксперимента. Это в принципе логично. Второй вопрос, который у меня был, это касательно вывода пятого. Там сказано, что проведена оценка...можно формулировку, пожалуйста? Там было сказано, что охарактеризованы свойства рН-биосенсора, но о каких свойствах идет речь, непонятно. Просто невозможно согласиться или опровергнуть данный вывод, т.е. надо было написать более подробно. Кроме того, Дарья Андреевна упоминает, что она изучала кору и стриатум головного мозга одновременно, но, к сожалению, мне не удалось найти эти результаты. Возможно, речь идет о переживающих срезах. Так что этот вопрос также хотелось бы уточнить. Но сделанные замечания ни в коем мере не снижают ценность данной работы и Дарья Андреевна, несомненно, заслуживает присуждения кандидата биологических наук. Спасибо за внимание.

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Спасибо. Дарья Андреевна, будете отвечать?

Котова Д.А., соискатель

А можно пожалуйста включить презентацию? Я хочу показать некоторые слайды. Ну я начну отвечать, наверное, на вопрос про пятый вывод. Там, где мы оценивали спектральные характеристики рН-биосенсора SypHer3s. Почему и возник этот вопрос. Да, мы охарактеризовали спектральные характеристики биосенсора в двухфотонном режиме. Как было сказано ранее, спектры в однофотонном и двухфотонном режиме возбуждения флуоресценции биосенсора значительно различаются. Поскольку довольно хорошо охарактеризован рН-биосенсор SypHer3s, который был еще опубликован еще в 2018 году Юлией Ермаковой, охарактеризованы и его спектральные характеристики, и протестирован на препарате белка, и в клеточных моделях, и также неоднократно проводились эксперименты, в т.ч. нами, на животных моделях, мы хорошо представляем, чего ожидать от этого белка именно в однофотонном режиме возбуждения флуоресценции. Но когда мы проводим измерения в двухфотонном режиме, то из-за некоторых изменений в спектре возбуждения, могут наблюдаться некоторые отхождения от общепринятых представлений: как ведет себя белок и в клеточных моделях, и конечно же на животных моделях. Поэтому мы показали именно то, что несмотря на то, что спектр возбуждения флуоресценции отличается, мы можем проводить эксперименты на клетках, и с использованием животных моделей с использованием краниальных окон для прижизненной регистрации сигнала в коре головного мозга. Также отвечая на следующий вопрос про то, что мы в коре также регистрировали сигнал, но про это не было сказано отдельно в тексте диссертации. Действительно, известно, что различные области мозга проявляют различную уязвимость к ишемии *in vivo* и я хотела бы обратить внимание на то, что в используемой нами модели в работе подход регистрации различных биохимических параметров с помощью различных генетически кодируемых биосенсоров позволяет проводить эксперименты именно на принципиально новом уровне. Мы можем регистрировать в конкретной координате головного мозга, в определенных клетках и в компартментах. И на самом деле, сейчас мы проводим много экспериментов в т.ч. на коре головного мозга. Здесь представлен один из срезов именно после прижизненной регистрации, т.е. с помощью оптических волокон мы также регистрируем сигналы в коре головного мозга. Наиболее интересным для нас сейчас являются эти колебания рН в зоне пенумбры. И сейчас мы как раз участвуем в работе над статьей по описанию этих явлений. На вопрос про корреляцию я уже ответила, поэтому на этом, наверное, все.

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Так, спасибо, второй оппонент у нас Силачев Денис Николаевич, доктор биологических наук из института Белозерского, МГУ. Пожалуйста.

Силачев Д.С., официальный оппонент

(Излагает отзыв, отзыв положительный).

Добрый день, уважаемые члены диссертационного совета, коллеги. Светлана Викторовна уже достаточно много сказала, я хотел бы отметить актуальность проведенной работы, и обратиться к практической части этого вопроса. К сожалению, большинство изучаемых нервных препаратов не показало своей эффективности и, видимо, проблемой является то, что мы не до конца понимаем патогенетические механизмы протекания ишемического инсульта с последующей стадией реперфузии. И безусловно, нуждаемся в новых инструментах для изучения различных биохимических реакций в головном мозге. Данная работа является пионерской в этой области, где

диссертант, используя различные детекторы, смог на разных уровнях организации живого показать течение различных биохимических процессов, что с одной стороны, меняет наше представление о протекающих процессах, и ставит следующие вопросы по их изучению. Также мне хочется подчеркнуть сложность, методическую сложность данной работы, которую можно принципиально разделить на 3 большие блока: это работа по использованию методов молекулярной биологии, клеточной биологии, физиологии - патофизиологии, что требует от экспериментатора высокого мастерства, поскольку каждый метод имеет свои особенности, сложности, и Дарья Андреевна с этим со всем отлично справилась. Такие выводы можно сделать на основании полученных результатов диссертационной работы. И у меня имеется несколько замечаний, на которые бы я хотел бы обратить внимание и понять. Как уже было сейчас сказано, что головной мозг является гетерогенным с точки зрения повреждений и данный процесс повреждения нервных клеток может развиваться достаточно быстро, и хотелось бы понять в изучаемой области, где был вставлен световод, оценивалась ли динамика гибели клеток, и производилась ли её корреляция с изучаемыми биохимическими показателями. А второй вопрос: поскольку оценивалась также функция астроцитов, например рН астроцитов, то, когда происходит имплантация датчика, световода, то вокруг раневого канала может образовываться так называемый глиомезодермальный рубец астроцитов. Мог ли он повлиять на изучение, искажение результатов исследования? Тем не менее, все эти вопросы не влияют на качество выполненной работы, и они только с точки зрения интерпретации данных или некоего акцента недостаточного в проведенной работе, а в целом, проведенная работа, безусловно, является пионерской, и Дарья Андреевна заслуживает звания кандидата биологических наук. Спасибо!

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Спасибо, Денис Николаевич! Дарья Андреевна, вперед.

Котова Д.А., соискатель

Спасибо большое за все представленные замечания. На самом деле, они наталкивают на много размышлений и хотелось бы поэтапно ответить на все из них. Отвечая на вопрос, про оценку степени повреждения ткани головного мозга и насколько целесообразно определение значений рН через 24 часа после моделирования ишемии, считаю целесообразным это измерение. Поскольку как видно на срезах головного мозга, представленных на указанном рисунке, мы наблюдаем флуоресценцию, и фиксируем флуоресцентный сигнал даже в поврежденной области головного мозга, что говорит о целостности структуры клеток хоть и с измененным метаболическим статусом. Стоит отметить, что в ходе измерения флуоресцентного сигнала от биосенсоров как для перекиси водорода, так и для измерения динамики рН, мы действительно, наблюдали падение флуоресценции в обоих каналах измерения как при 405, так и при 490 нм. Однако благодаря этому уникальному свойству рациометричности используемых в работе биосенсоров, это не сказывается на рацио сигнала, когда мы делим интенсивность возбуждения флуоресценции при 490 нм на 405 нм. Кроме того, на представленных ранее рисунках было видно, что значения рН у ряда животных возвращается к исходным значениям, что было бы невозможно в случае тотальной гибели ткани. Также стоит отметить, что белок не может сохранять свои функции, флуоресценцию, во вне клеточном пространстве в таком режиме, поскольку при разрушении клеток и возможном попадании белка в межклеточное пространство, сенсор быстро фотообесцвечивается, что делает невозможным дальнейшие измерения. И наконец, зона окрашивания красителем ТТХ является скорее зоной повреждения клеток, и не говорит о тотальной гибели ткани, поскольку, как я уже ранее говорила, окрашивание ТТХ позволяет сделать вывод о работе дегидрогеназных систем,

восстанавливающих ТТХ до формазана ярко-красного цвета. По степени окраски судят именно об окислительной способности клеток головного мозга, что косвенно свидетельствует о повреждении. Отвечая на след вопрос, на данном рисунке видно, что зона ишемии совпадает с зоной флуоресценции и имплантацией оптических волокон, как это представлено на данном слайде. То есть у нас есть именно зона, по которой, если внимательно приглядеться, видно, что это зона имплантации оптических волокон. Она также совпадает с флуоресцентным сигналом от биосенсора и с зоной инсульта. Следующий вопрос про то, могло ли повлиять на искажение сигнала наличие раневого канала, и формирования вокруг него глиомезодермального рубца. Стоит отметить, что в данной работе мы не оценивали степень активации астроцитов, которое, конечно, имеет место быть при различных вмешательствах в головной мозг. Однако от времени имплантации оптических волокон до проведения операции по окклюзии средней мозговой артерии проходит около 4 недели. Таким образом, возможные воспалительные процессы, которые могут возникать при имплантации оптических волокон, к моменту проведения операции, не должны сохраняться. Основная цель данной работы — это оценить именно влияние ишемии на различные редокс-процессы клеток головного мозга. Поскольку эффект ишемии должен перекрывать все другие возможные процессы, связанные с особенностью используемой модели. Мы показали это на серии ложноперирированных животных, в которых мы не наблюдали подобных изменений, но которые наблюдали в экспериментальной группе. И также стоит отметить, что используемый в данной работе биосенсор NuPer7 является крайне чувствительным сенсором, который может воспринимать малейшие изменения редокс-состояния клеток, что имеет место быть и при воспалительных реакциях. Поскольку мы не видим подобных изменений на флуоресцентный сигнал биосенсора NuPer7, то мы предполагаем, что значимые воспалительные реакции перед проведением эксперимента у нас не наблюдаются.

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Спасибо! Так, значит, теперь следующее - у нас дискуссия. Кто хотел бы выступить? Никто? А, вот Дмитрий Александрович.

Долгих Д.А., член диссертационного совета

У меня вопрос, скорее, так сказать, относится к заключению, которое мы даем и к списку работ. Вот ежели посмотреть на этот список работ там, по-моему, 8 работ и мы говорим, что это работы, в которые диссертант внес основной либо существенный вклад. Но, к сожалению, в этом списке работ нет ни одной работы, где диссертант занимает первую позицию. Есть работа, где он занимает с равным вкладом третью позицию. Наверное, это все-таки к руководителю диссертанта, почему, так оказалось, что мы говорим, что это основной вклад, а получается, что по крайней мере два человека внесли более основной вклад в эту работу. В этом смысле я могу поделиться некоторой практикой с ученого совета в МГУ, когда они заимствовали, это такой же ученый совет как и у нас по естественным наукам, они заимствовали практику гуманитарных советов, когда оценивается вклад каждого из участников в печатных листах. Ну например, работа состоит, имеет 5 печатных листов. Конечно, когда я это узнал, я подумал, что это странно..

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Дмитрий Александрович, ну это формальность.

Долгих Д.А., член диссертационного совета

...Ну это формальность, но ежели мы говорим, что работа 5 печатных листов, а вклад диссертанта — это 3 листа. Да, конечно, это основное. Два — это основное. Но если

один, то тут получается работа, про которую можно сказать основной, там 25 или даже больше авторов и третья позиция. Вот я не знаю, можно ли из этой формальной фразы убрать: “основной вклад” и оставить только “существенный вклад”. Наверное, этого делать не стоит. Просто на будущее, я не знаю, руководителям надо, наверное, на это обращать больше внимания на то, чтобы диссертант, который выходит на защиту, чтобы у него было первое место, и чтобы не было никаких сомнений, что вклад основной. Спасибо.

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Да, пожалуйста.

Билан Д.С., научный руководитель соискателя

Категорически не согласен с этим утверждением. Вклад основной, и мне кажется, что целью любого учёного является сделать хорошую работу, и вот та статья, про которую Вы говорите, если посмотреть, там огромное количество авторов и, наверное, более 7 стран, т.е. там огромное количество людей, и понятное дело, что разные люди участвовали. Там есть физики, которые разрабатывали, там были какие-то биологи, там были какие-то люди, которые делились опытом. И пытаться людей под звездочками, да, тех, кто вносит основной вклад, пытаться как-то еще их ранжировать, мне кажется, что это совсем неправильно. Это как раз то, к чему сводится индикаторность, индикаторная наука и т.д. Я, например, по опыту сотрудничества с различными другими учеными из разных стран в разделе acknowledgement, указано, что такие-то участники выполнили равный вклад, а например, очередность людей под звездочками была оценена жеребьёвкой, которую они провели, попивая вино на такой-то лужайке в Финляндии, например.

Мирошников А.И., председатель

Иногда по алфавиту.

Билан Д.С., научный руководитель соискателя

...Это нормально. Поэтому ранжировать людей, ещё тех, которые внесли основной вклад, я с этим категорично несогласен, и я думаю, что просто должна быть гордость, что большой коллектив сделал большую работу. Эта работа ценится, цитируется, поэтому я готов с этим спорить сколь угодно.

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Ок, спасибо. Нет, это вообще, конечно, спорный вопрос, потому что, если Вы видите статью даже в Nature по, например, структуре генома, где авторов целая страница, да? А статья всего 4 страницы, попробуйте, так сказать, разделить вклад.

Долгих Д.А., член диссертационного совета

Можно я скажу еще раз?

Ну, во-первых, мне работа оценить понравилась, и я, конечно, буду голосовать “За”, так сказать, к чему призываю всех членов ученого совета. Но вы поймите, что где-то, так сказать, например, в ВАКе, люди будут смотреть на это дело. Если подойдут формально, то скажут, а где же тут основной вклад?

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Ну, Дим, в ВАКе люди понимают это.

Долгих Д.А., член диссертационного совета

Ну тем не менее, лучше соблюдать какие-то формальные вещи. И у нас, по-моему, так сказать, на навем защитном совете, когда-то говорилось, что нехорошо, когда нет ситуации, когда диссертант является первым автором. По-моему, это даже Александр Габирович говорил.

Олейников В.А., учёный секретарь

Вообще ни в каких правилах это не прописано, в ВАКовских правилах ничего этого не прописано.

Долгих Д.А., член диссертационного совета

Конечно нет, это что-то типа хорошего тона. Что-то такого..

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Да нет.

Олейников В.А., учёный секретарь

До сих пор не возникало ни одного вопроса.

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Так, коллеги..

Долгих Д.А., член диссертационного совета

Ну у меня тогда конкретный вопрос, почему тогда эти два первых человека, которые стоят раньше, вклад неосновной. Значит, он тоже основной, понимаете? Основной это какой? 50%? 40%?30%? Вот такой момент.

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Хорошо..

Долгих Д.А., член диссертационного совета

Давайте тогда все так и оставим в этом заключении, но на будущее хорошо бы это иметь в виду. Спасибо.

Олейников В.А., учёный секретарь

Татьяна Владимировна хочет выступить.

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Татьяна Владимировна, пожалуйста.

Овчинникова Т.В., член диссертационного совета

Спасибо большое. Я вообще не планировала выступать, но вот учитывая возникшую дискуссию всё-таки хотела положить небольшую, так сказать, гирю на другую чашу весов, поскольку имела счастливую возможность наблюдать за тем, как развивалась эта работа, когда Даша училась в аспирантуре: на различных аттестациях, на различных докладах, претендентов на стипендии и т.д. мы видели, как много с каждым разом добавляется именно той работы, которая определяет личный вклад автора, и поэтому я считаю, что...Вообще все работы, которые выходят из группы, под руководством Дмитрия Сергеевича, они всегда вызывают, я могу сказать такую “белую зависть”...

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Татьяна Владимировна, вообще в наших ученых советах всегда работы, конечно, высокого уровня.

Овчинникова Т.В., член диссертационного совета

...Высокого уровня, да, в данном случае, конечно, нет никаких сомнений, и я всех призываю голосовать “За”. Вот буквально после защиты мы еще будем рассматривать заключение по диссертации другого бывшего нашего аспиранта - Костюка Александра, который тоже вышел из этой группы, и там тоже прекрасная работа. И я думаю, что мы все будем свидетелями целого цикла работ из этой группы, который завершится блестящей защитой докторской диссертации Дмитрия Сергеевича. Поэтому я думаю, всем нужно проголосовать за эту работу. Я призываю всех к такому, понимая озабоченность Дмитрия Александровича (Долгих) в таком общем виде, но в данном конкретном случае, я думаю, мы совершенно спокойно можем голосовать за эту работу и за присуждение кандидатской степени.

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Спасибо, Татьяна Владимировна.

Ну что, благодарности, Даш, заключайте.

Котова Д.А., соискатель

Спасибо всем огромное за предоставленную мне возможность сейчас выступать и защищать свою диссертацию! Хотела бы выразить особую благодарность всему своему коллективу нашей большой лаборатории, который с момента моего первого появления в лаборатории претерпела значительные изменения, и сейчас люди, с которыми я взаимодействовала, сейчас находятся как и в Федеральном центре мозга, так и в РНИМУ им. Пирогова, так и те, кто остались в нашей группы. Это уникальная возможность набраться большого опыта и прекрасное взаимодействие с людьми. Мне хотелось бы особенно поблагодарить своего научного руководителя Билана Дмитрия Сергеевича за то, что на протяжении всего моего научного пути в лаборатории, он всегда направлял, помогал ценными советами, и поддерживал. Благодарю всю нашу группу, которая, насколько я знаю, находится сейчас в этом зале, особенно группу, которая сосредоточена на *in vivo* исследованиях, а именно тех самых соавторов статьи, про которых мы говорили: и Кельмансона Илью Владимировича, и Иванову Александру Дмитриевну, Храмову Юлию, Катруху Веронику, которая недавно присоединилась к нашему коллективу, и каждого члена нашей дружной большой группы за то, что мы были рядом, вместе решали под час очень сложные задачи. Безусловно, эта работа не состоялась бы без тесного и продуктивного сотрудничества с лабораторией фотоники и нелинейной спектроскопии МГУ под руководством Алексея Михайловича Жёлтикова. Особую благодарность выражаю своим оппонентам за очень ценные замечания и советы, за такой скрупулёзный подход к прочтению моей кандидатской диссертации. Хотела бы отдельно поблагодарить Светлану Викторовну за то, что она смогла присутствовать сегодня, здесь, на моей диссертации. Спасибо диссертационному совету, спасибо всем присутствующим здесь лицам. И, конечно, хотела поблагодарить всех членов моей семьи, друзей, которые меня поддерживали, помогали двигаться дальше даже в непростые моменты. Спасибо большое!

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Спасибо, спасибо. Коллеги, значит, скажите пожалуйста, замечания по проекту заключения есть? Нет. Тогда мы сделаем так: мы сейчас проголосуем, а во время голосования тогда, пока идет подсчет голосов, мы решим вопрос о новых кандидатах на защитном совете. Пожалуйста, голосуем.

(Идет тайное голосование)

Олейников В.А., ученый секретарь

Счетная комиссия отработала. Просмотрела все бюллетени, проверила и пересчитала. По ходу защит. Котова Дарья Андреевна. Присутствовало на заседании 21 член совета. Роздано бюллетеней - 21. Оказалось в урне - 21. "За" - 21. Против и недействительных - нет. Так что утвердить.

Мирошников А.И., председатель диссертационного совета

Спасибо. Поздравляем новых кандидатов. Есть предложение утвердить.

(Далее идет голосование по проекту заключения совета. Проект заключения совета принимается единогласно.)

Спасибо вам большое.

Председатель
диссертационного совета

д.х.н., академик РАН Мирошников А.И.

Учёный секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

