

**УТВЕРЖДАЮ:**

Директор Института высшей  
нервной деятельности  
и нейрофизиологии РАН,

профессор РАН, д.б.н. А.Ю. Малышев



« 26 » сентября 2022 г.

## **ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской Академии наук» на диссертацию Котовой Дарьи Андреевны «In vivo исследование редокс-процессов в клетках головного мозга при развитии ишемического инсульта на животных моделях с помощью генетически кодируемых биосенсоров», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – «молекулярная биология»

### **Актуальность темы выполненной диссертационной работы.**

Диссертационная работа Котовой Дарьи Андреевны посвящена актуальной проблеме расшифровки молекулярных механизмов, которые лежат в основе клеточной гибели при ишемии, что является важнейшей задачей для современных исследований в биологии и медицине, в том числе для поиска эффективных нейропротекторных лекарств. Церебральная ишемия приводит к запуску целой серии физиологических, биохимических, молекулярных и генетических механизмов. В результате происходит снижение нейронной активности из-за нарушения клеточной целостности, возникает ионный дисбаланс, глутамат-опосредованная эксайтотоксичность, нарушается регуляция внутриклеточного кальция, развивается

окислительный стресс, дисфункция митохондрий и апоптоз. Все это приводит к реакциям нейровоспаления и массовой гибели разных типов клеток в области повреждения.

В работе поставлена задача исследовать динамику некоторых биохимических параметров (в частности, рН, концентрацию  $H_2O_2$ , соотношение НАД<sup>+</sup>/НАДН) в тканях головного мозга крысы *in vivo* при развитии ишемического инсульта с помощью генетически кодируемых биосенсоров.

Вышесказанное отражает актуальность и практическую значимость диссертационной работы Котовой Дарьи Андреевны.

### **Научная новизна, теоретическое и научно-практическое значение диссертационного исследования**

Автором в процессе диссертационного исследования впервые с помощью высокочувствительного биосенсора HyPer7 и разработанной оптоволоконной техники регистрации сигнала была визуализирована динамика  $H_2O_2$  в клетках мозга крыс *in vivo* при развитии ишемического инсульта. Было обнаружено, что в клетках поврежденной области мозга генерация  $H_2O_2$  медленно нарастает, достигая максимальных значений на следующие сутки с момента окклюзии артерии. На поздней стадии развития инсульта (от 20 часов) производство  $H_2O_2$  в митохондриях астроцитов выше, чем в нейронах поврежденной области. Кроме того, были охарактеризованы свойства рН-биосенсора SynHer3s в режиме двухфотонной микроскопии на препарате белка *in vitro*, а также в культуре живых клеток и на срезах мозга грызунов. Данное описание представляет большую практическую значимость, поскольку подход двухфотонной микроскопии через краниальные окна позволяет регистрировать не только флуоресцентный сигнал биосенсора, но и визуализировать клетки в глубоких слоях коры головного мозга.

Диссертационная работа Котовой Дарьи Андреевны относится к числу фундаментальных научных исследований и имеет большое научно-практическое значение. Представленная работа отличается высокой степенью новизны, и многие данные являются впервые полученными в мировой литературе. Полученные данные представляет интерес для широкого круга исследователей в нейробиологии, физиологии, молекулярной биологии. Результаты диссертационной работы могут быть использованы в научных исследованиях, в процессе обучения студентов биологических, медицинских и фармацевтических вузов, при разработке новых подходов для медицины.

#### **Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов.**

Достоверность полученных результатов подтверждается 8 публикациями автора в рецензируемых научных журналах с высоким международным рейтингом. Задачи исследования корректно сформулированы и соответствуют поставленной цели. Результаты экспериментов представлены в виде большого количества рисунков и таблиц. Выводы научного исследования вытекают из полученных в диссертационной работе результатов и полностью соответствуют поставленным задачам. Результаты исследований были представлены на международных симпозиумах и конференциях, таких как: VII Съезд биохимиков и X Российский симпозиум «Белки и пептиды», Всероссийская мультиконференция с международным участием **БИОТЕХНОЛОГИЯ - МЕДИЦИНЕ БУДУЩЕГО** и др. Достоверность результатов, научных положений и выводов не вызывает сомнений ввиду большого объема экспериментальных данных, корректно выбранных методов анализа, включая статистические методы. Используемые в диссертационной работе методы, полученные результаты и сформулированные выводы полностью соответствуют научной специальности 1.5.3. – «молекулярная биология».

## Содержание диссертации и её оценка

Диссертационная работа построена по традиционной схеме, изложена на 119 страницах машинописного текста и состоит из введения, детального обзора литературы, раздела «Материалы и методы», 3 разделов «Результатов и Обсуждения», заключения, выводов и списка литературы, включающего 307 наименований. Работа хорошо иллюстрирована 31 рисунком.

Во введении автором сформирована цель и задачи работы, показана актуальность темы, выявлены научная новизна и научно-практическая значимость исследования, приведены цели и задачи. В главе «Обзор литературы» рассматриваются основные классические и современные исследования по теме диссертационной работы. Автором проведен тщательный анализ зарубежных, отечественных и своих представлений о механизмах ишемии в мозге. Исходя из литературного анализа можно без сомнений сказать, что автору удалось провести анализ современного состояния проблемы и логически обосновать необходимость данного исследования. В главе «Материалы и методы исследований» описываются объекты и организация исследования, использованные экспериментальные методы исследования, фармакологические препараты и статистическая обработка полученных результатов. Подробно описаны экспериментальные процедуры, представлены схемы экспериментальных установок, приведен список использованного оборудования. В каждой экспериментальной серии результаты проиллюстрированы большим количеством рисунков. Глава «Результаты исследований и их обсуждение» хорошо структурирована и включает информацию о методах и результатах диссертационного исследования. В этой главе приводится сравнение полученных в диссертационной работе результатов с актуальными литературными данными. На основе полученных данных формулируются выводы в соответствии с заявленной целью, задачами и научными положениями.

Автору удалось показать, что генетически кодируемые биосенсоры в сочетании с подходом оптоволоконной регистрацией сигнала представляют

собой мощный инструментарий для исследования патологий мозга. Содержание диссертации соответствует содержанию автореферата и опубликованным статьям. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертационной работы.

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. Имеются также уточняющий вопрос к диссертанту, что в целом не влияет на общую положительную оценку работы.

#### **Вопросы:**

1. На рис. 21Б диссертации ответ на аппликацию лактата имеет циклический характер. Это случайность или ответ может быть в виде волн с периодом 600 секунд?

#### **Заключение:**

Диссертационная работа Котовой Дарьи Андреевны на тему «In vivo исследование редокс-процессов в клетках головного мозга при развитии ишемического инсульта на животных моделях с помощью генетически кодируемых биосенсоров» является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании проведенных автором исследований получены новые данные, совокупность которых можно квалифицировать как значительное научное достижение в области молекулярной биологии мозга. По актуальности, достоверности и новизне результатов, опубликованных в рейтинговых международных журналах, степени обоснованности научных положений и выводов диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Котова Дарья Андреевна несомненно достойна присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Диссертационная работа Котовой Дарьи Андреевны соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Отзыв обсужден и утвержден на открытом заседании лаборатории клеточной нейробиологии обучения ИВНД и НФ РАН 23 сентября 2022 г.

Ведущий научный сотрудник

Лаборатории клеточной нейробиологии обучения,

д.б.н.

Никитин Е.С.

Подпись д.б.н. Никитина Е.С. заверяю



Подпись Т. Кузьмина Е.С.  
УДОСТОВЕРЯЮ  
Док. канд. ИВНД и НФ  
Кузьмина Т.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН», лаборатория клеточной нейробиологии обучения.

Адрес: 117485 Москва, уд. Бутлерова, д.5А.

Тел: 8-495-334-70-00

E-mail организации: [admin@ihna.ru](mailto:admin@ihna.ru)

Сайт организации: <http://www.ihna.ru/>