

## ОТЗЫВ

Официального оппонента

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»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология».

Работа Котовой Дарьи Андреевны посвящена разработке молекулярных инструментов для исследования протекания биохимических процессов, связанных с поддержанием редокс-состояния биологической системы *in vitro* и *in vivo* с последующим их применение для изучения патогенетических механизмов протекания процессов ишемии и реперфузии в головном мозге. Ишемический инсульт остается грозным заболеванием, вызывающим высокую смертность и инвалидизацию пациентов. Несмотря на множество предложенных терапевтических подходов, их клиническая трансляция не удалось. Одной из причин может являться недостаточность понимания патогенетических механизмов протекания ишемического инсульта. Предполагается, что развитие окислительного стресса может вносить существенный вклад в повреждение головного мозга во время фазы ишемии и реперфузии, однако антиоксидантная терапия не нашла своего клинического применения, что может быть связано с недостаточной изученностью процессов развития окислительного стресса в тканях головного мозга. В первую очередь это определяется несовершенством методических подходов изучения патологических процессов в системах *in vitro*. Разработка новых белковых сенсоров различных биохимических реакций и метаболитов позволяет перейти на организменный уровень изучения механизмов патогенеза. Однако, применение каждого нового биосенсора требует скрупулезной верификации метода на различных уровнях организации живого и последующего подтверждения на экспериментальных животных моделях. В представленной диссертационной работе автор провёл комплексное исследование влияния ишемии и последующей реперфузии на динамику изменения в ткани стриатума перекиси водорода, изменения pH, а также НАДН/НАД<sup>+</sup> на модели фокальной ишемии головного мозга. Результаты работы обладают научной новизной и расширяют текущие научные представления о роли окислительного стресса и метаболических нарушений при острых патологических состояниях головного мозга.

Диссертационная работа Котовой Дарьи Андреевны представляет собой хорошо спланированное и логично выстроенное исследование. Выводы, научные положения и рекомендации обоснованы результатами исследования. Использование современных методов молекулярной биологии, клеточной биологии и патофизиологии, достаточное количество биологических повторов экспериментов подтверждают достоверность результатов диссертационного исследования, сформулированных на их основе научных положений и выводов. Результаты диссертации представлены в 13 публикациях, из них 8 статей в научных журналах (входят в перечень ВАК РФ, индексируются в WoS и/или Scopus), и были многократно доложены на российских научных конференциях и симпозиумах.

Работа написана по традиционной схеме, и изложена на 119 страницах. Она состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, который содержит 307 источников. Диссертация содержит 31 рисунок и 1 таблицу.

В разделе «Введение» автор обосновывает актуальность темы исследования, на основе изучения научной литературы, формулирует его цель и задачи. Задачи данной работы заключались в регистрации динамики рН, концентрации  $H_2O_2$  и соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН в цитозоле и митохондриальном матриксе культивируемых нейронов мыши, выделенных из гиппокампов эмбрионов, в условиях гипоксии/реоксигенации с использованием биосенсоров *SypHer3s*, *Hyper7* и *SoNar*; исследовании динамики рН, концентрации  $H_2O_2$  и соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН в тканях мозга при развитии ишемического инсульта в режиме реального времени, а также исследовании, как данные биохимические параметры изменяются при патологии в разных типах клеток (в нейронах и астроцитах) и их компартментах (в цитозоле и матриксе митохондрий). Также задачей данной работы была отработка подхода тестирования флуоресцентных генетически кодируемых биосенсоров в режиме двухфотонной микроскопии на примере рН-биосенсора *SypHer3s*.

Обзор литературы посвящен рассмотрению общих патогенетических механизмов повреждения головного мозга в результате ишемии и реперфузии, особый акцент сделан на механизмы развития окислительного стресса. Отдельной главой рассмотрены экспериментальные подходы по моделированию ишемического инсульта на модельных системах *in vitro* и *in vivo*. Проведен анализ использования различных подходов для визуализации молекулярно-биохимических процессов при ишемическом инсульте. Диссертант рассмотрел современные направления по разработке и свойствам генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров, с акцентом на практическое применение для изучения патологических процессов в головном мозге. Проведенный обзор литературы полностью обосновывает поставленные цели и задачи исследования.

В разделе «Материалы и методы» автор достаточно подробно описывает использованные в работе экспериментальные подходы и методы для получения результатов в соответствии с поставленными задачами. Следует отметить широкий спектр применяемых в работе современных методов: создание генетически кодируемых биосенсоров, моделирование ишемической патологии на первичных культурах головного мозга и крысах, использование различных методов флуоресцентной микроскопии.

Раздел «Результаты и их обсуждение» состоит из четырех частей. В первых двух разделах рассматриваются вопросы получения и тестирование генетических конструкций биосенсоров для регистрации  $H_2O_2$ , рН и соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН в тканях мозга крыс и на клеточных культурах. Автор описывает эксперименты, доказывающие работоспособность сенсоров и их применимость для анализа метаболизма в тканях головного мозга. В последующих двух разделах описываются результаты экспериментов по анализу динамики внутриклеточной концентрации  $H_2O_2$ , соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН и

pH на первичных культурах головного мозга и динамики ацидоза и концентрации перекиси водорода в тканях мозга крыс при развитии ишемического инсульта.

В работе Котовой Д.А. получен ряд принципиально важных новых данных. Обнаружено, что в условиях гипоксии происходит резкое снижение pH в нейронах и постепенное его повышение в фазу реоксигенации, с детальным анализом по компартментам в клетке. Более того, была продемонстрирована роль монокарбоксилатных транспортеров в развитии ацидоза в культуре нейронов в условиях гипоксии/реоксигенации. Полученные результаты исследований позволили перейти диссертанту на более сложную модельную систему - моделирование ишемического инсульта на крысах. Используя модель эндovasкулярной окклюзии средней мозговой артерии и разработанную оптоволоконную технику регистрации сигнала, а также сенсор NuPer7 была впервые визуализирована динамика  $H_2O_2$  в клетках мозга крыс *in vivo* при развитии ишемического инсульта. Полученные данные результаты имеют принципиальную научную новизну, демонстрирующие течение окислительного стресса в динамике на живом организме без влияния различных артефактов, присущих исследованиям *in vitro*.

Результаты, полученные в работе, являются базой для дальнейших исследований патогенетических механизмов развития ишемического инсульта. Значительным достижением данной работы является разработанная методология детекции сигнала в головном мозге, используя оптоволоконную визуализацию сигнала. Дальнейшие исследования могут проводиться, основываясь на разработанных методических подходах в данной диссертации, используя различные биосенсоры. Также предложенные подходы могут найти широкое применение для анализа механизмов действия нейропротекторных препаратов.

Принципиальных замечаний по представленной работе нет. Однако требуется уточнение нескольких методических аспектов, которые не были обсуждены, но имеют важное значение для интерпретации полученных экспериментальных данных:

1. Оценивалась ли гибель нейронов и астроцитов стриатума во временные точки анализа сигнала?
2. Считает ли диссертант целесообразным определение значения pH через 24ч после моделирования ишемии в зоне стриатума, где клетки к этому время погибают, о чем свидетельствует окраска среза головного мозга ТТХ на рисунке 27Б. О чем полученные данные могут свидетельствовать и какие процессы определяются во временной точке 24 ч после моделирования ишемии головного мозга? Данный вопрос касается и других используемых сенсоров.
3. Проводился ли морфометрический анализ распространения вируса в ткани от места трансплантации оптоволоконного зонда?
4. Могло ли влиять на искажение сигнала наличие раневого канала и формирование вокруг него глиомезодермального рубца, в особенности в экспериментах по изучению метаболических процессов в астроцитах?

5. На рисунке 27 желательно было представить микрофотографию головного мозга, где был бы отмечен раневой канал от оптоволоконного луча для лучшего понимания его анатомического расположения.

Однако в целом, данные замечания относятся скорее к представлению и интерпретации экспериментальных данных, а не к их качеству, и никоим образом не умаляют высокой научной значимости и практической ценности полученных результатов и не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы Котовой Д.А. Оценивая работу в целом, следует отметить, что Дарья Андреевна Котова продемонстрировала уверенное владение темой исследования и современными методами, умение грамотно излагать материал, обобщать и анализировать полученные экспериментальные данные. Используемые в ходе выполнения работы экспериментальные подходы и методы адекватны поставленным задачам, достоверность результатов не вызывает сомнения. Выводы, сделанные на основании полученных результатов, являются чёткими, научно обоснованными и отражают все стороны работы.

Таким образом, диссертационная работа Котовой Дарьи Андреевны «*In vivo* исследование редокс-процессов в клетках головного мозга при развитии ишемического инсульта на животных моделях с помощью генетически кодируемых биосенсоров» 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."

Официальный оппонент



Силачев Денис Николаевич

доктор биологических наук,  
заведующий лабораторией биохимии  
двигательных систем Научно-исследовательского  
института физико-химической биологии  
имени А.Н. Белозерского МГУ имени М. В. Ломоносова,  
отдел функциональной биохимии биополимеров  
119992, город Москва, Ленинские горы д.1. стр.40

Тел. +79057921301

silachevdn@genebee.msu.ru

05.10.2022

