

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

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»

Актуальность диссертационной работы Котовой Д.А. не вызывает сомнения. Возможность прижизненной визуализации и регистрации биохимических изменений в клетках в норме и при повреждении открывает новые возможности для изучения патогенеза ряда социально значимых заболеваний, эффективность лечения которых в настоящее время не высока. Поэтому разработка инструментов и методов исследования динамики изменений биохимических параметров в определенных типах клеток и даже в заданных компартментах этих клеток в режиме реального времени крайне актуальны. Особенно это необходимо для изучения баланса быстро меняющихся показателей, таких как рН, короткоживущих активных форм кислорода (АФК), показателей редокс-статуса клетки, роль которых в патогенезе ряда полисистемных заболеваний хорошо известна.

С участием Котовой Д.А. были сконструированы генетически кодируемые биосенсоры и созданы аденовирусные частицы, несущие гены биосенсоров, для изучения динамики изменения рН, концентрации H_2O_2 , соотношения НАД⁺/НАДН в режиме реального времени в цитозоле и митохондриях нейронов и астроцитов в классических моделях гипоксически-ишемического повреждения мозга. Хорошо известно, что неконтролируемая генерация АФК и нарушение регуляции окислительно-восстановительной системы клеток мозга лежат в основе патогенеза инсульта. На созданной для моделирования гипоксии/реоксигенации клеточной культуры установке с помощью вирусов AAV9 с генами биосенсоров для регистрации рН (SypHer3s), H_2O_2 (HyPer7) в цитоплазме и митохондриях, а также сенсора SoNar (регистрация соотношения НАД⁺/НАДН) цитоплазматический вариант были проведены ряд исследований на культуре нейронов гиппокампа мыши. Уже в течение первых минут гипоксии наблюдалось падение рН как в митохондриях, так и в большей степени в цитозоле, которое восстанавливалось только при нормализации уровня кислорода. При этом неселективное ингибирование монокарбоксилатных транспортеров лактата предотвращало развитие ацидоза. Интересно, что вопреки ожиданиям, гипоксия не вызывала накопления H_2O_2 и генерации АФК ни в цитозоле, ни в митохондриях культивируемых нейронов гиппокампа. Незначительная и кратковременная генерация H_2O_2 при гипоксии в обоих исследуемых компартментах нейронов была обнаружена в среде с 2-х кратным повышением глюкозы. Эффект был более выражен в цитозоле, чем в митохондриальном матриксе. Таким образом, эксперименты на первичной культуре нейронов

гиппокампа позволили не только получить интересные данные, но и выявить компартменты нейронов, где изменения исследуемых показателей в ответ на гипоксию/реоксигенацию наиболее выражены. В опытах *in vivo* Котовой Д.А. были использованы генетические конструкции для аденоассоциированных вирусных частиц с биосенсорами SynHer3s с локализацией в цитозоле и NuPer7 с локализацией в митохондриальном матриксе, имеющих промоторы, специфичные для астроцитов или нейронов. Для проведения опытов на крысах в режиме реального времени была сконструирована оптическая установка для двухканальной оптоволоконной фотометрии в глубоких слоях мозга. Было показано, что окклюзия средней мозговой артерии и последующая реоксигенация вызывает стремительное снижение рН в цитоплазме нейронов хвостатого ядра и последующая реперфузия не восстанавливала рН до контрольных значений у части животных. Котовой Д.А. впервые удалось проследить динамику генерации H_2O_2 в митохондриях нейронов стриатума после ишемии. Оказалось, что увеличение уровня H_2O_2 происходит медленно, достигая максимальных значений только на следующие сутки с момента окклюзии среднемозговой артерии. При этом уровень H_2O_2 в митохондриях астроцитов выше, чем в нейронах поврежденной области.

Котова Д.А. сформулировала 5 положений, которые логически вытекают из полученных результатов и соответствуют поставленной цели и задачам. Все результаты получены в ходе исследований с использованием междисциплинарных подходов и значительного количества современных методов исследования и обработки полученного материала.

Достоверность представленных Котовой Д.А. результатов не вызывает сомнения, поскольку они были получены на биологических системах разного уровня сложности, с помощью валидированных методов в условиях обширной коллаборации. Полученные в диссертационной работе результаты, научные положения и выдвигаемые автором гипотезы полностью отражены в автореферате, в публикациях в престижных журналах и доложены на научных конференциях. Однако значительное количество соавторов в публикациях и отсутствие в диссертации и автореферате пункта «Личный вклад автора диссертационной работы» затрудняют оценку работы, проведенной лично Дарьей Андреевной.

Структура диссертации Котовой Д.А. вполне традиционна. Диссертация изложена на 119 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего в себя 307 ссылок и содержит 31 рисунок и 1 таблицу.

Несмотря на значительное количество имеющихся современных исследовательских подходов, их возможности для изучения динамики многих биохимических процессов в реальном времени *in vivo* и особенно связанных с окислительно-восстановительными процессами, крайне ограничены. Проведенные Котовой Д.А. исследования позволили взглянуть на развитие некоторых патологических событий ишемического инсульта с первых его секунд. Сконструированная установка с использованием технологии

оптоволоконного интерфейса в сочетании с генетически кодируемыми сенсорами является уникальной базой для дальнейших исследований динамики биохимических параметров в режиме реального времени в тканях животных.

Принципиальных замечаний по представленной работе нет. Однако необходимо отметить некоторые недостатки в тексте:

- Рисунок 1 невнятный. Не хватает обозначения причинно-следственных связей (эффектов) между элементами.
- В пункте 1.1.2. «Окислительный стресс при развитии ишемии головного... вероятно, пропущено слово «мозга»
- Не везде имеются ссылки на рисунки.
- В пункте 2.2.5. Получение очищенного препарата белка указано, что «очищенный препарат белка получали путем трансформации компетентных клеток...., согласно п.1.6.2». В диссертации нет такого пункта. Вероятно, речь идет о пункте 2.1.6.
- В пункте 2.2.5. Получение очищенного препарата белка ничего конкретно не сказано о том, как получали и очищали белок.
- На стр. 84 сказано: «Для регистрации динамики рН, H₂O₂, соотношения НАД⁺/НАДН в тканях мозга крыс во время ишемического инсульта мы использовали соответствующие биосенсоры SypHer3s [232], Hyper7 [224] и SoNar [213]». Однако, уже на стр. 85 говорится о том, что «В данной работе мы не проводили регистрацию НАД⁺/НАДН *in vivo* с использованием биосенсора SoNar...»,
- На стр. 84 указано, что биосенсор SypHer3s использовали с локализацией в цитозоле нейронов, а Hyper7 с локализацией в митохондриальном матриксе», но уже на стр. 87 говорится, что «сравнивали динамику рН биосенсора SypHer3s в цитозоле и митохондриальном матриксе». При этом рисунок 28 и подписи к нему вопрос о том, с какой клеточной и внутриклеточной локализацией использовали биосенсор, не проясняют.

Хотелось бы порекомендовать автору сделать схемы постановки экспериментов на первичных культурах и в мозге крыс.

В диссертационной работе имеются моменты, которые требуют пояснения:

- 1) В пункте 3.1. стр. 68 указано, что «нами были получены и протестированы ... конструкции биосенсоров... Оценку локализации биосенсоров производили путем морфологического анализа клеточных структур». Однако в диссертации не удалось найти, как и где проводили анализ. То, что представлено на рисунке 19 пункта 3.1. не дает ответа на эти вопросы. На нем видно, что биосенсор SypHer3s локализован в клетках повсеместно, кроме, пожалуй, ядрышка.
- 2) На стр. 87 сказано, что «тяжесть инсульта никак не коррелировала с тем, возвращается рН нейронов к исходным значениям или нет». А как контролировали тяжесть инсульта и почему был сделан такой вывод?
- 3) Пункт 5 выводов не раскрыт так, чтобы с ним можно было согласиться или не согласиться. Указано, что: «Охарактеризованы свойства рН-биосенсора SypHer3s...», но о каких свойствах идет речь, не понятно. Тем более, что на

стр. 74 сказано, что «мы полностью охарактеризовали свойства рН-биосенсора SupHer3s», но рисунок 22, который, вероятно, должен иллюстрировать свойства сенсора, плохого качества и не имеет необходимых пояснений в подписи к нему или в тексте.

- 4) Хорошо известно, что различные области мозга проявляют различную уязвимость к ишемии *in vivo*. Кроме того, как нейроны, так и астроциты, выделенные из разных областей мозга, демонстрируют различную уязвимость и антиоксидантный статус даже при помещении в первичную культуру. В тесте диссертации было сказано, что «мы также тестировали регистрацию в более чем двух координатах, например, одновременно в коре и стриатуме каждого полушария», но иллюстрации или описания этих экспериментов отсутствуют.

Однако, указанные замечания не снижают ценность диссертационной работы Котовой Дарьи Андреевны, которая представляет собой научно-квалификационную работу, полностью соответствующую 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:

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник,
заведующая лабораторией
«Молекулярная нейробиология»
Академии биологии и биотехнологии
им. Д.И. Ивановского
Федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего образования
«Южный федеральный университет»
344090, г. Ростов-на-Дону, проспект Стачки, дом 194/1
Тел. +7 (918) 509-21-85.
e-mail: svdemyanenko@sfedu.ru

Демьяненко Светлана Викторовна

22 сентября 2022 г.



Демьяненко С.В.

Член
Совета
Южного университета
Мирошниченко О.С.