

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,

созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 26.10.2022 г. № 26

О присуждении **Котовой Дарье Андреевне**, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «*In vivo* исследование редокс-процессов в клетках головного мозга при развитии ишемического инсульта на животных моделях с помощью генетически кодируемых биосенсоров» по специальности 1.5.3. Молекулярная биология принята к защите 15 августа 2022 г. (протокол заседания № 21) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе ИБХ РАН, (адрес: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10; действует на основании Приказов Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021).

Соискатель Котова Дарья Андреевна, 07 марта 1995 года рождения, в 2019 году соискатель окончила магистратуру Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» по направлению «биохимия».

С 2019 по 2022 гг. обучалась в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук (ИБХ РАН). В настоящий момент работает в должности младшего научного сотрудника в группе метаболических основ патологии ИБХ РАН.

Диссертация выполнена в группе метаболических основ патологии отдела метаболизма и редокс-биологии ИБХ РАН.

Научный руководитель - кандидат биологических наук Билан Дмитрий Сергеевич, старший научный сотрудник, заведующий группой метаболических основ патологии ИБХ РАН.

Официальные оппоненты:

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

Демьяненко Светлана Викторовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией «Молекулярная нейробиология» Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, Москва в своем **положительном** отзыве, подписанном Никитиным Евгением Сергеевичем, доктором биологических наук, ведущим научным сотрудником Лаборатории клеточной нейробиологии обучения, и утвержденным директором института Высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, профессором РАН, д.б.н. Малышевым Алексеем Юрьевичем, указала, что 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.

Соискатель имеет 17 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 8 работ, общим объемом 8 печ. л. в рецензируемых научных изданиях из списка, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций (входят в базы данных Web of Science и Scopus). В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме, в которые Д.А. Котова внесла основной либо существенный вклад, включают:

1. Kelmanson IV*, Shokhina AG*, **Kotova DA***, Pochechuev MS, Ivanova AD, Kostyuk AI, Panova AS, Borodinova AA, Solotnikov MA, Stepanov EA, Raevskii RI, Moshchenko AA, Pak VV, Ermakova YG, van Belle GJC, Tarabykin V, Balaban PM, Fedotov IV, Fedotov AB, Conrad M, Bogeski I, Katschinski DM, Doepfner TR, Bähr M, Zheltikov AM, Belousov VV, Bilan DS. *In vivo* dynamics of acidosis and oxidative stress in the acute phase of an ischemic stroke in a rodent model // *Redox Biology*. – 2021. – Т. 48. – С. 102178. **Авторы внесли равный вклад в работу.*

2. Chebotarev AS, Pochechuev MS, Lanin AA, Kelmanson IV, **Kotova DA**, Fetisova ES, Panova AS, Bilan DS, Fedotov AB, Belousov VV, Zheltikov AM. Enhanced-contrast two-photon optogenetic pH sensing and pH-resolved brain imaging // *Journal of Biophotonics*. – 2021. – Т. 14. – №. 3. – С. e202000301.

3. Pochechuev MS, Bilan DS, Fedotov IV, Kelmanson IV, Solotnikov MA, Stepanov EA, **Kotova DA**, Ivanova AD, Kostyuk AI, Raevskii RI, Lanin AA, Fedotov AB, Belousov VV, Zheltikov AM. Real-time fiber-optic recording of acute-ischemic-stroke signatures // *Journal of Biophotonics*. – 2022. – С. e202200050.

4. Lanin AA, Pochechuev MS, Chebotarev AS, Kelmanson IV, Bilan DS, **Kotova DA**, Tarabykin VS, Ivanov AA, Fedotov AB, Belousov VV, Zheltikov AM. Cell-specific three-photon-fluorescence brain imaging: neurons, astrocytes, and gliovascular interfaces // Optics Letters. – 2020. – Т. 45. - №.4. – С.836-839.

5. Lanin AA, Chebotarev AS, Pochechuev MS, Kelmanson IV, **Kotova DA**, Bilan DS, Ermakova YG, Fedotov AB, Ivanov AA, Belousov VV, Zheltikov AM. Two- and three-photon absorption cross-section characterization for high-brightness, cell-specific multiphoton fluorescence brain imaging //Journal of Biophotonics. – 2020. – Т. 13. – №. 3. – С. e201900243.

6. Pochechuev MS, Lanin AA, Kelmanson IV, Bilan DS, **Kotova DA**, Chebotarev AS, Tarabykin V, Fedotov AB, Belousov VV, Zheltikov AM. Stain-free subcellular-resolution astrocyte imaging using third-harmonic generation // Optics Letters. – 2019. – Т. 44. – №. 12. – С. 3166-3169.

7. Kostyuk AI, Demidovich AD, **Kotova DA**, Belousov VV, Bilan DS. Circularly Permuted Fluorescent Protein-Based Indicators: History, Principles, and Classification // International journal of molecular sciences. – 2019. – Т. 20. – №. 17. – С. 4200.

8. Kostyuk AI, **Kotova DA**, Demidovich AD, Panova AS, Kelmanson IV, Belousov VV, et al. Lipid metabolic changes in rat brain during permanent cerebral ischemia //Bulletin of Russian State Medical University. – 2019. – №. 1. – С. 46-52.

На диссертацию поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.б.н. Силачева Дениса Николаевича. Отзыв **положительный**, принципиальных замечаний к работе диссертанта нет, однако у оппонента имеется ряд вопросов, требующих пояснения:

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 оптоволоконка для лучшего понимания его анатомического расположения.

Отзыв официального оппонента д.б.н. Демьяненко Светланы Викторовны. Отзыв **положительный**, принципиальных замечаний по представленной работе нет, однако оппонент отмечает некоторые недостатки в тексте, а именно недостаток пояснений в тексте диссертации и к рисункам, отмечаются опечатки и отсутствие ссылок на некоторые рисунки. Также оппонент рекомендует диссертанту сделать схемы постановки экспериментов на первичных культурах и в мозге крыс.

Кроме того, оппонент указывает на ряд моментов, 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.

2. На стр. 87 сказано, что «тяжесть инсульта никак не коррелировала с тем, возвращается рН нейронов к исходным значениям или нет». Как контролировали тяжесть инсульта и почему был сделан такой вывод?

3. п.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 рис.74 сказано, что «мы полностью охарактеризовали свойства рН-биосенсора SypHer3S», но рис.22, который, вероятно, должен иллюстрировать свойства сенсора, плохого качества и не имеет необходимых пояснений и подписи к нему или в тексте.

3. 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 тексте 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.

Отзыв ведущей организации. Отзыв **положительный**, содержит следующее замечание:

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

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в областях, близких к тематике работы: редокс-биология, медицина, молекулярная биология и биохимия различных типов клеток, флуоресцентная микроскопия, патологическая физиология, что подтверждается сериями их публикаций в ведущих научных международных журналах. Оппоненты и представители ведущей организации обладают большим опытом исследовательской и экспертной работы и высокой квалификацией, которые позволяют им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, а также ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований была впервые визуализирована динамика H₂O₂ в клетках мозга крыс *in vivo* при развитии ишемического инсульта с помощью высокочувствительного биосенсора SyHer7 и разработанной оптоволоконной техники регистрации сигнала. Было обнаружено, что в клетках поврежденной области мозга генерация H₂O₂ медленно нарастает, достигая максимальных значений на следующие сутки с момента окклюзии артерии. На поздней стадии развития инсульта (от 20 часов) производство H₂O₂ в митохондриях астроцитов выше, чем в нейронах поврежденной области. С помощью биосенсора SyHer3s была визуализирована динамика pH *in vivo* в тканях мозга крыс при ишемическом инсульте. В течение нескольких секунд после начала ишемии ткань мозга испытывает значительный ацидоз (pH повсеместно снижается на ~0,5 единиц). Кроме того, были охарактеризованы свойства pH-биосенсора SyHer3s 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. В рамках данного исследования также была создана установка для моделирования условий гипоксии/реоксигенации для первичной культуры нейронов. Используя аналогичные биосенсоры, было показано, что биохимические процессы, происходящие в культивируемых клетках, значительно отличаются от событий, которые происходят при патогенезе *in vivo*. Тем не менее, исследования на клеточных культурах могут быть эффективно использованы для разработки систем скрининга и тестирования компонентов, влияющих на динамику биохимических процессов в условиях гипоксии.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что проведенные диссертантом исследования расширяют наше понимание биохимических процессов, происходящих во время ишемического инсульта. В данной работе было продемонстрировано существенное различие в динамике исследуемых процессов в нейронах в условиях гипоксии *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, результаты, полученные в ходе выполнения данной диссертационной работы, расширяют понимание процессов, происходящих в острой фазе ишемического инсульта. Также было показано, что скорость продукции H₂O₂ в митохондриях астроцитов по сравнению с нейронами поврежденной области мозга на поздней стадии развития инсульта различается. Это наблюдение может в дальнейшем представлять интерес при выборе терапевтической мишени для разработки лекарственных средств.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что созданная в настоящей работе платформа исследования с применением генетически кодируемых биосенсоров может быть использована для

выполнения любых других задач по изучению биохимических процессов в тканях мозга в норме и патологии. Возможность не только выбрать интересующий биосенсор, но и локализовать его в определенном типе клеток и отдельных компартментах, обеспечивает высокую информативность данного экспериментального подхода и гибкость в постановке задач.

Достоверность результатов исследования сомнений не вызывает: исследования проводились с использованием современных молекулярно-биологических, физиологических, биохимических и физических методов и подходов; данные были получены с использованием сертифицированного оборудования, воспроизводимость результатов неоднократно продемонстрирована. Результаты исследований были обработаны с использованием известных статистических критериев в соответствии с числом сравниваемых параметров. Материал, представленный в работе, опубликован в зарубежных рецензируемых научных журналах.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в планировании и проведении научных экспериментов, литературном поиске, сборе данных, разработке новых экспериментальных методик и методик анализа данных, интерпретации полученных результатов, участии в апробации результатов исследования на российских конференциях, подготовке публикаций. Все экспериментальные и теоретические исследования по теме диссертации проведены лично соискателем или при его непосредственном участии при содействии коллектива группы метаболических основ патологии под руководством Билана Д.С., к.б.н., с.н.с., а именно: к.б.н. Кельмансона И.В., аспирантки МГУ им. М.В. Ломоносова Ивановой А.Д. Содействие в создании экспериментальной оптической установки, а также технической поддержки во время проведения экспериментов оказывал коллектив Лаборатории фотоники и нелинейной спектроскопии МГУ им. М.В. Ломоносова.

Диссертационный совет 24.1.037.01 постановил, что диссертационная работа Котовой Дарьи Андреевны является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена научно-техническая задача разработки платформы для исследования различных патологий мозга, в т.ч. ишемического инсульта, с применением генетически кодируемых биосенсоров в сочетании с подходом оптоволоконной регистрации, что вносит существенный вклад в развитие исследований в области молекулярной биологии, биохимии, физиологии и медицины. Работа написана автором самостоятельно и содержит новые и актуальные научные результаты и по своему содержанию соответствует специальности 1.5.3. – Молекулярная биология. 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”, представленная на соискание ученой степени кандидата

биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; № 29.05.2017 г. № 650, , 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. №1690).

В ходе защиты диссертации были заданы следующие вопросы:

- 1) Ацидоз нейронов является положительным или скорее отрицательным эффектом ишемии?
- 2) Стоит ли бороться с ацидозом и в какой момент?
- 3) Есть ли какие-либо объективные параметры, по которым оценивали тяжесть последствий ишемического инсульта?

Соискатель Котова Д.А. ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию:

- 1) Ацидоз является одним из факторов, благодаря которым нейроны выживают при гипоксии. В условиях недостаточного количества энергии нейроны и клетки окружения переходят на иной способ получения энергии: с окислительного фосфорилирования на гликолиз. В ходе гликолиза происходит массовая продукция лактата, который образуется как в самих нейронах, так и в клетках глии. Возможно, благодаря транспорту лактата из астроцитов в нейроны через монокарбоксилатные транспортеры, нейроны выживают. Таким образом, отвечая на вопрос, ацидоз нейронов в первое время ишемии является, скорее, положительным эффектом, благодаря которому нейроны выживают, однако с течением времени ацидоз может негативно влиять на их функциональный статус.
- 2) В настоящее время мы находимся на стадии изучения этого явления. Мы также проводим регистрацию флуоресцентного сигнала как в центре инсульта, так и в зоне пенумбры. Но по предварительным данным, можно сказать, что снимать закисление имеет смысл не сразу, а через какое-то время.
- 3) После проведения эксперимента мы делали 2 мм срезы головного мозга крысы, далее производили окрашивание специальным красителем ТТХ. По степени окрашивания мы определяли объем поврежденной области головного мозга (белое окрашивание соответствует зоне поврежденной области), который оценивали с помощью программы ImageJ. После чего производили сравнение двух групп животных, у которых рН восстанавливался до исходного уровня и у которых не восстанавливался. После проведенной статистической обработки данных мы не обнаружили разницы между сравниваемыми группами животных по объему повреждения головного мозга после инсульта.

На заседании 26 октября 2022 г. диссертационный совет постановил: за решение научной задачи по исследованию *in vivo* редокс-процессов в клетках головного мозга при развитии ишемического инсульта на животных моделях с помощью генетически кодируемых биосенсоров, имеющей важное значение для исследований в области молекулярной биологии и медицины, присудить Котовой Дарье Андреевне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 7 докторов наук (по научной специальности рассматриваемой диссертации 1.5.3 – Молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 21, против - 0, действительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета

академик РАН Мирошников А. И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В. А.

27 октября 2022 г.