

## ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
Лизуновой Натальи Владимировны  
на тему: «Оптический подход к изучению инсульта: кортикальная активность  
и гемодинамические изменения в модели фототромбоза у мышей»,  
по специальности 1.5.5. – «Физиология человека и животных»

### **Актуальность темы исследования и научная новизна работы**

Диссертация Лизуновой Натальи Владимировны посвящена новому перспективному методу изучения активности коры мозга лабораторных животных – широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН). Цель работы – оценить возможности данного метода для изучения последствий фотоиндуцированной ишемии и сформировать комплекс критериев для оценки тяжести инсульта данным методом.

ШОН позволяет оценивать активность нейронов коры мозга как напрямую, за счет регистрации внутриклеточной концентрации кальция у животных, нейроны которых экспрессируют белковый сенсор, так и опосредованно, по оценке изменений концентрации разных форм гемоглобина в капиллярной сети. Одновременная регистрация гемодинамического и нейронального сигналов позволяет исследовать нейрососудистое сопряжение. На основе регистрации гемодинамического сигнала работает такой используемый в клинике метод как функциональная магнитно-резонансная томография (фМРТ). Однако интерпретация данных фМРТ основана на теории нейрососудистого сопряжения и до конца неясно, как различные патологии влияют на это сопряжение. На данный момент, несмотря на большое количество научных работ в области патофизиологии и лечения инсульта, эта патология занимает второе место в списках причин смерти в мире. Поэтому исследование изменений нейроваскулярного сопряжения, индуцированных инсультом, является актуальной задачей как для

тщательного понимания патофизиологии инсульта, так и для правильной интерпретации данных фМРТ в клинике. Преимущество ШОН – возможность наблюдения за морфологическими и функциональными изменениями в коре мозга в хроническом эксперименте. Такой новый подход в отличие от традиционных позволяет получать большее количество данных с одного и того же животного, что позволяет минимизировать разбросы, учитывать индивидуальные особенности животных, повысить эффективность исследований, в соответствии с биоэтическим принципом «3R».

### **Структура и содержание диссертации**

Работа Н.В. Лизуновой изложена на 163 страницах, построена по традиционному плану и состоит из глав: Введение, Обзор Литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждения, Заключение, Выводы, Список сокращений, Список литературы. Работа проиллюстрирована 101 рисунком, список литературы содержит 190 ссылок, из них 9 на русском языке.

В обзоре литературы систематизированы современные методы нейровизуализации, применяемые в клинике и доклинических исследованиях, отмечены их основные преимущества и недостатки. Особое внимание уделено методу широкопольной оптической нейровизуализации, принципу метода, его возможностям. Наталья Владимировна проанализировала научные работы, выполненные с применением данного метода, указав на методические особенности проведенных исследований. Часть обзора посвящена современным представлениям о функционировании сетей мозга в разных физиологических состояниях, а также механизмам нейроваскулярного сопряжения, которое можно исследовать методом ШОН. Кроме того, представлен обзор современных методов моделирования инсульта на животных и обоснован выбор модели фотоиндуцированной ишемии. В целом, данный раздел демонстрирует владение Лизуновой Н.В. современной информацией в области широкопольной оптической нейровизуализации и изучаемой проблемы, а также умение анализировать научную литературу.

В работе использованы такие классические методы, как гистологическое окрашивание по Нисслю, магнитно-резонансная томография, флуоресцентная микроскопия *in vitro* на первичных нейрон-глиальных культурах мышей. Автором освоены и модифицированы методы широкопольной оптической нейровизуализации, хирургические манипуляции с лабораторными мышами для подготовки животных к исследованиям методом ШОН. Лизунова Н.В. внесла значительный вклад в разработку подходов для анализа данных ШОН, создала и зарегистрировала в Роспатенте программу для автоматизации анализа данных ШОН.

Результаты работы проиллюстрированы большим количеством графиков и диаграмм, данные обработаны с применением соответствующих статистических методов. Полученные результаты подтверждают перспективность использования данных ШОН для исследования последствий фотоиндуцированной ишемии у мышей. Автором выбраны наиболее показательные и стабильные параметры тяжести инсульта, которыми оказались межполушарная связанность функциональных зон коры на 1 сутки после инсульта и степень нарушения нейроваскулярного сопряжения на 1 сутки после фотоиндуцированной ишемии. Данные параметры коррелировали с размером очага инсульта и степенью сенсомоторного дефицита у животных. Несмотря на разбросы в значениях параметров ответа в коре на сенсорный стимул, сенсорная стимуляция позволяет отслеживать изменения в локализации и размере функциональной зоны, что может быть полезно при исследованиях нейропластичности в более длительных хронических экспериментах. Показана высокая корреляция между размерами очага, определенными с помощью ШОН и такими методами, как МРТ и гистологии, что указывает на возможность использования данного метода для определения размера повреждения в динамике.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность**

Достоверность, научная новизна и практическая значимость полученных результатов не вызывает сомнений, выводы соответствуют результатам. Научные выводы работы основываются на применении передовых методов изучения активности мозга и интеграции различных подходов для анализа функциональных изменений после инсульта у лабораторных животных. В исследовании был использован системный подход, сочетающий современные алгоритмы обработки данных, качественную статистическую верификацию и использование нескольких взаимодополняющих методик.

Особое внимание уделено изучению нейроваскулярного сопряжения, которое анализировалось с помощью широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН). Автор исследовал реакции соматосенсорной коры на сенсорные стимулы и проводил корреляционный анализ спонтанной активности, что позволило выявить нарушения согласованности нейрональной и гемодинамической активности в поражённых зонах мозга. Выводы подкреплены многократной проверкой данных и их воспроизводимостью, а использование различных методов, таких как МРТ, гистологические исследования и ШОН, обеспечило объективную оценку изучаемых процессов.

Такой интегративный подход позволил не только уточнить механизмы, лежащие в основе изменений мозговой активности при инсульте, но и предложить новые критерии для количественной оценки степени поражения и динамики восстановления.

### **Вопросы и замечания по диссертации**

В целом работа выполнена на высоком уровне и не вызывает существенных замечаний. При прочтении рукописи возник ряд вопросов:

1. При анализе серий изображений используется их сжатие, что приводит к ухудшению пространственного разрешения. Почему нельзя использовать биннинг в процессе съемки, сразу получая изображения 87x64 пикселей? Это

могло бы повысить скорость съемки и таким образом улучшить временное разрешение съемки. Кроме того, проводилось сглаживание, что еще больше уменьшает локальный контраст. Какое получается итоговое пространственное разрешение получаемых изображений?

2. Стр. 116-117 сказано: «Поскольку размер молекулы GCaMP6f превышает размер ядерной поры и без адресной метки сенсор не может попасть в ядро, изменения сигнала GCaMP6f отражают изменения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ).» При подобной интерпретации экспериментов необходимо указать ссылку на литературный источник, либо на собственные данные, подтверждающие соотношение размеров белкового  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсора и ядерной поры.

3. В работе область повреждения методом ШОН определяли по кальциевому сигналу, можно ли измерить с помощью ШОН очаг повреждения у нетрансгенных мышей?

### **Заключение**

Вместе с тем, указанные вопросы носят дискуссионный характер и не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация Лизуновой Натальи Владимировны «Оптический подход к изучению инсульта: кортикальная активность и гемодинамические изменения в модели фототромбоза у мышей» отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.5. – «Физиология человека и животных» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Лизунова Наталья Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности по специальности 1.5.5. – «Физиология человека и животных»

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных механизмов нейропатологий Института биофизики клетки Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Бережнов Алексей Валерьевич

06.12.2024

Контактные данные:

тел.:

e-mail:

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

1.5.2. – биофизика, 1.5.22. – клеточная биология

Адрес места работы:

142290, Московская область, г. Пушкино, ул. Институтская, д. 3,

Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Тел.: ; e-mail:

*Подпись Бережнова Алексея Валерьевича удостоверяю.*  
*Ученый секретарь ИФК*