

ОТЗЫВ

**на автореферат диссертации Лизуновой Натальи Владимировны
“Оптический подход к изучению инсульта: кортикальная активность и
гемодинамические изменения в модели фототромбоза у мышей”,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.5. – физиология человека и животных**

По оценкам Всемирной Организации Здравоохранения каждый год происходит около 12,2 миллионов новых случаев инсульта головного мозга. В целом, прогнозы утверждают, что каждый четвертый человек столкнется с данной патологией хотя бы раз на протяжении своей жизни. Среди озвученных чисел 7,6 миллиона случаев относятся к ишемическим инсультам, возникающим из-за снижения или прекращения мозгового кровотока, что составляет 62% от общего числа инцидентов. Из них 3,3 миллиона случаев заканчиваются летальным исходом. Таким образом ишемический инсульт оказывается одной из наиболее важных социально-значимых патологий, и несложно понять, почему усилия множества научных и медицинских коллективов по всему миру направлены на его изучение и разработку методов его ранней диагностики, а также терапии.

В последние десятилетия мы наблюдаем активное развитие подходов прижизненной визуализации метаболических событий в организме, поскольку подобные техники сопряжены со снижением количества артефактов измерений, а также позволяют получать гораздо больше информации. В качестве примеров таких методов функциональная магнитно-резонансная томография и спектроскопия в ближнем инфракрасном свете. Однако данные подходы обладают рядом недостатков, к которым относятся как относительно низкое пространственное разрешение, так и возможность регистрировать лишь ограниченный спектр параметров. Перспективным направлением в обсуждаемой области оказывается развитие оптических методов, в том числе тех, которые основаны на регистрации сигналов генетически кодируемых сенсоров. Работа Натальи Викторовны посвящена одной из таких техник, а именно широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН), что определяет высокую актуальность исследования.

В рамках представленной диссертации автором был разработан экспериментальный протокол по одновременной визуализации гемодинамических параметров и цитоплазматической концентрации кальция в тканях головного мозга. При этом анализ получаемых данных происходит при помощи оригинального программного пакета, представляющего самостоятельный научный интерес. Показано, что анестезия существенным образом влияет на амплитуду НвТ-ответа при сенсорной стимуляции, а также в значительной мере увеличивает функциональную связанность между различными зонами коры. Полученный результат подчеркивает важность изучения метаболизма мозга в период бодрствования. Одним из наиболее интересных наблюдений, описанных в диссертации, является достаточно высокая степень нейроваскулярного сопряжения, которая нарушается при развитии инсульта. При этом полученные данные свидетельствуют в пользу того, что сила этого нарушения растет по мере расширения очага. Кроме того показано, что характерной чертой более тяжелых инсультов оказывается потеря межполушарной корреляции в уровнях цитоплазматического кальция. Таким образом ШОН представляет собой перспективную технологию, способную исследовать, как именно патологии и потенциальные методы их терапии влияют на активность головного мозга. Автором также представлены данные о том, что обсуждаемый метод демонстрирует прогностическую способность. Так, диаметр очага, регистрируемый на первых минутах развития инсульта по сигналу генетически кодируемого сенсора, коррелирует с данными гистологической окраски и МРТ. Соответственно, ШОН может быть использована для ранней оценки тяжести повреждения. Не возникает сомнений, что описанные в диссертации результаты существенным образом расширяют современный арсенал диагностических инструментов.

Работа Натальи Владимировны выполнена на высоком методологическом уровне с использованием широкого набора современных техник. В частности, автор задействует

классические методы экспериментальной хирургии и физиологии, к которым относятся операции по установке краниальных окон, протокол фотоиндуцированной ишемии, оценка сенсомоторного дефицита и МРТ. Упомянутые подходы сочетаются с цитологическими и гистологическими техниками (получение первичных нейроглиальных культур, окраска срезов по Нисслю). В работе представлены сложные методы оптической визуализации метаболических процессов (оценка гемодинамических параметров на основании концентрации различных форм гемоглобина и регистрация сигнала генетически кодируемого сенсора GCaMP6f). Наконец, автор осуществила разработку оригинального программного пакета на языке программирования Python для анализа собранных данных.

Достоверность описанных в диссертации результатов не вызывает сомнений. Все они были обработаны адекватными статистическими методами и опубликованы в 3 рецензируемых изданиях (в том числе, в международных). Кроме того, на основании проделанной работы получено 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ. Тем не менее, у меня возник ряд замечаний и вопросов по представленному автореферату.

1. Автор утверждает, что GCaMP6f не способен проникать в ядро ввиду высокой молекулярной массы (51 кДа). Однако во многих работах показано, что наблюдаемый барьер пассивной диффузии через поровый комплекс лежит на границе около 60 кДа. В частности, сенсоры семейства *YuPer* (52 кДа) в условиях отсутствия сигнального пептида экспорта равномерно распределяются между цитозолем и ядром. И хотя для сенсоров семейства GCaMP действительно показана склонность к накоплению именно в цитозольной фракции (например, [10.1371/journal.pone.0108697](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108697)), едва ли размер белка является ключевым фактором, объясняющим данный феномен. Кроме того, существуют статьи, в которых авторы специально модифицируют обсуждаемые пробы, чтобы устранить их попадание в ядро ([10.1038/s41467-018-03719-6](https://doi.org/10.1038/s41467-018-03719-6)).

2. Для сенсоров семейства GCaMP показана определенная чувствительность сигнала к pH (например, [10.1038/srep38276](https://doi.org/10.1038/srep38276)). Нельзя исключать, что на их оптические параметры влияют и другие факторы, такие как ионная сила, осмолярность или молекулярная скученность. При этом в автореферате не описаны эксперименты с какими-либо контролями, позволяющими исключить подобные процессы.

3. Во многих случаях на рисунках в качестве показателя погрешности указаны величины SEM. Однако SEM лучше подходит для константных величин, которые не обладают собственной дисперсией, а обладают лишь дисперсией измерения. При этом в случае объектов, характеризующихся определенным разбросом, важно соотносить силу эффекта с гетерогенностью популяции.

4. При обсуждении данных на Рисунке 8А (нейроваскулярное сопряжение) важнее оперировать не величинами r , а доверительными интервалами коэффициентов корреляции. Потому что слабая корреляция может быть статистически значимой при достаточном объеме выборок. То же самое касается Рисунка 11В (потеря сопряжения при увеличении очага), Рисунка 13Б (сопоставление очагов по ШОН и окраске тканей) и Рисунка 14Б (сопоставление очагов по ШОН и МРТ). Особенно это важно в контексте последних двух случаев, поскольку использование определенного метода в диагностических целях оправдано лишь в случае высокой предсказательной силы.

5. На мой взгляд, сформулированные Выводы не в полной мере соответствуют обозначенной Цели, которая заключалась в разработке критериев для оценки морфофункциональных изменений коры мозга. Какие, все-таки, критерии автор может предложить для оценки тяжести (или других параметров) ишемического инсульта по ШОН?

Высказанные замечания не влияют на высокий научный уровень представленной работы и носят дискуссионный характер. Считаю, что работа Лизуновой Натальи Владимировны “Оптический подход к изучению инсульта: кортикальная активность и гемодинамические изменения в модели фототромбоза у мышей” полностью соответствует требованиям “Положения о присуждении ученых степеней”, утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года (в актуальной редакции), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5. – физиология человека и животных.

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
руководитель группы метаболических основ патологии
Института биоорганической химии
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Билан Дмитрий Сергеевич

18.12.2024

М.П.