

О Т З Ы В

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Бгатовой Наталии Петровны на диссертационную работу Горбуновой Анны Владимировны на тему «Реорганизация гиппокампа белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.22 - клеточная биология

Актуальность исследования Горбуновой А.В. определяется ключевой ролью гиппокампа в осуществлении когнитивных функций, обучения и памяти. В частности, в связи с новой короновирусной инфекцией возрастает число переболевших с тяжелыми неврологическими осложнениями, с развитием синдрома хронической усталости, депрессии и когнитивной дисфункции. В основе этих заболеваний лежит нарушение микроциркуляции и гипоксия мозга. Поэтому исследование базовых структурных изменений компонентов гиппокампа при ишемии является особенно важным для разработки стратегий коррекции функциональных нарушений в центральной нервной системе.

Целью своей работы Горбунова А.В. поставила изучение структурно-функциональных изменений нервной ткани гиппокампальной формации белых крыс после 20 минутной окклюзии общих сонных артерий для определения проявлений адаптивных, компенсаторных и репаративных механизмов.

Научная новизна

Научная новизна работы заключается в том, что автором впервые проведено комплексное гистологическое, иммуногистохимическое и морфометрическое изучение серийных срезов гиппокампа и зубчатой фасции головного мозга белых крыс. Автором впервые выявлены различия в нейроцито-, глиоцито- и синаптоархитектонике, ядерно-цитоплазматическом и нейроглиальном отношениях полей СА₁, СА₃, СА₄ и зубчатой фасции головного мозга белых крыс в норме. Впервые показан гетерохромный и гетероморфный

характер мелкоочаговых изменений в гиппокампе после 20 минутной окклюзии общих сонных артерий. Автором впервые описаны механизмы элиминации дегенеративно измененных темных нейронов и участие каспаза-3 в адаптационных и восстановительных процессах.

Впервые отмечено, что после 20 минутной окклюзии общих сонных артерий в изученных отделах наряду с необратимыми повреждениями развиваются процессы компенсаторно-восстановительной реорганизации нейроглиальных комплексов.

Показано возрастание экспрессии *GFAP* и увеличение нейроглиального индекса. Обнаружено, что развитие астроглиоза, сопровождалось усложнением астроглиоархитектоники за счет разветвления мелких отростков астроцитов. Показано, что отмеченные изменения носили очаговый характер и различались по степени и времени проявления.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Научная значимость диссертационной работы заключается в получении новых знаний об интеграции астроцитов, олигодендроцитов и микроглиоцитов в единую защитно-восстановительную saniрующую систему головного мозга. Проведенные автором обобщения и анализ экспериментального исследования расширяют существующие представления о морфологии головного мозга экспериментальных животных в норме и после острой глобальной ишемии.

В исследовании получены важные данные для понимания процессов повреждения, компенсации и восстановления, происходящих в гиппокампе и зубчатой фассии белых крыс в разные сроки после 20 мин окклюзии общих сонных артерий. Полученные результаты могут быть внедрены в обучающие курсы биологических и медицинских факультетов по гистологии и клеточной биологии.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Обоснованность представленных в диссертационной работе научных

положений и выводов основывается, прежде всего, на корректно поставленных задачах, применении адекватных современных методов исследования и статистической обработки данных. Соискатель грамотно использовал иммуногистохимические маркеры изучаемых клеток и процессов. Полученные данные проиллюстрированы микрофотографиями высокого качества, графиками, таблицами, детально и грамотно обсуждены с привлечением современных литературных данных. Обоснованность научных положений, заключений основывается на согласованности данных эксперимента и научных выводов.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. В своей работе Горбунова А.В. использовала современный методологический подход к планированию и выполнению исследований. Исследование проведено на достаточном количестве экспериментальных животных. Материалы проведенного исследования широко апробированы на научных конференциях и конгрессах международного уровня.

По теме диссертационной работы опубликовано 17 печатных работ, 11 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, из них в базе данных Scopus - 5. Горбунова А.В. является соавтором патента и зарегистрированной программы для ЭВМ. Кроме того, работа выполнена при поддержке гранта Фонда Содействия Инновациям по программе "УМНИК" «Разработка программного продукта для морфометрического анализа нервной ткани при диагностике заболеваний головного мозга».

Объем и структура диссертации

Диссертация выполнена в классическом стиле, работа изложена на 163 страницах машинописного текста, состоит из введения, литературного обзора, главы собственных данных, обсуждения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 12 таблицами и 37 рисунками. Список литературы содержит 257 источников, в том числе 61 отечественных и 196 зарубежных авторов.

Глава I. В главе «Обзор литературы» отражены имеющиеся данные об

особенностях структурной организации гиппокампа, представления о нейропластичности, как механизме функционирования, защиты и восстановления нервной ткани головного мозга после повреждения, о морфологических проявлениях нейропластичности гиппокампа в постишемическом периоде, о феномине избирательности проявлений повреждения, нейропластичности и гетерогенности реорганизации межнейронных отношений гиппокампа после ишемии.

В главе «Материалы и методы» представлена характеристика экспериментального материала и методов его исследования. Из данной главы следует, что эксперименты проведены на крысах линии Вистар. Острую 20 минутную ишемию мозга моделировали путем окклюзии общих сонных артерий.

Головной мозг целиком с помощью автомата для гистологической проводки карусельного заключали в гомогенизированный парафин и получали серийные фронтальные срезы гиппокампа толщиной 4 мкм.

Использовали методы окраски на жизнеспособную ткань с помощью 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида, окраски гематоксилин-эозином и по Нисслю. Применяли иммуногистохимическую реакцию на *GFAP* (астроциты) и *p38* (синаптические терминалы), *MAP-2* (маркер нейронов) и *CASP3* (каспаза 3).

В работе были применены интересные морфометрические подходы с использованием программы ImageJ. Для анализа астроцитов использовался фрактальный анализ. Автор грамотно использовала статистический анализ. Оценку характера распределения исследованных величин проводили с помощью критерия *Shapiro-Wilk* (*Statistica* 8.0), проверку статистических гипотез - с помощью непараметрических методов. Использовались также критерий χ^2 и Фишера. Материал в работе представлен в процентах (95% доверительный интервал - 95% ДИ), как медиана (Q_2) нижний (Q_1) и верхний (Q_3) квартили.

В главе «Результаты собственных исследований, представленной пятью под главами, соискатель представляет данные о цитоархитектонике гиппокампа в норме и после 20 минутной окклюзии общих сонных артерий, о

морфометрической характеристике изменений цитоархитектоники гиппокампа, иммуногистохимическом исследовании структур межнейронной коммуникации нейронов гиппокампа, иммуногистохимическом исследовании роли плеiotропных белков апоптоза в нейропластической реорганизации межнейронной коммуникации нейронов гиппокампа, гистологической и иммуногистохимической характеристике нейроглиоцитов, особенностях структуры полей СА₁ и СА₃, зубчатой фассии и поля СА₄.

Автором показано развитие отека-набухания нервной ткани на 1–3 сут после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. При этом отмечено уменьшение доли нормохромных нейронов, вакуолизация и разрушение дендритов и синаптических терминалей. Выявлено, что изменения имеют диффузно-мелкоочаговый гетерохронный и гетероморфный характер и различаются между полями гиппокампа. Описаны механизмы деструкции нейронов путем коагуляционного некроза.

Показано, что разрушение и элиминация нейронов после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий сопровождались компенсаторно-восстановительной реорганизацией нейроглиальных комплексов и межнейронных взаимоотношений. Через 3 и 7 сут после окклюзии во всех отделах усиливалась экспрессия GFAP, увеличивался нейроглиальный индекс, возрастало количество клеток-сателлитов.

Обнаружено развитие астроглиоза, который проявлялся усложнением реорганизации астроглиоархитектоники за счет разветвления мелких отростков астроцитов. Показано, что в разных отделах гиппокампа эти изменения различались по степени и времени проявления. Максимальный перепад переменных «фрактальная размерность» и «лакунарность», характеризующих долю и форму отростков в пространстве, отмечен в молекулярном слое гиппокампа.

Выявлено, что в процессе восстановления межнейронных коммуникаций в постишемическом периоде уменьшались проявления отека-набухания,

снижалось содержание темных нейронов, усиливались проявления реактивного астроглиоза, возрастало количество синаптических терминалей.

Полученные результаты подтверждаются корректным использованием методов морфологического и морфометрического исследования. Хорошо реализовано иммуногистохимическое типирование, иллюстрированное микрофотографиями высокого качества. Интересен фрактальный анализ.

Несомненным достоинством работы является выявленная реорганизация и роль астроглии в восстановлении нейронов и межнейронных отношений.

Обсуждение полученных результатов проведено на хорошем уровне с привлечением современных литературных источников. Выводы отражают суть диссертационной работы, логично вытекают из полученных автором фактических данных и соответствуют поставленным целям и задачам. Автореферат полностью отражает содержание диссертации, все основные положения и выводы.

Работа соответствует специальности 1.5.22. Клеточная биология.

Принципиальных замечаний по научному содержанию и оформлению работы не имеется. В качестве дискуссии хотелось бы получить от автора ответы на следующие вопросы:

В обсуждении результатов автор пишет: «Разные поля гиппокампа отличались реактивностью дренажно-детоксикационной функции — в поле СА₃ она была выше, чем СА₁, в норме. Это могло быть одной из причин разной чувствительности к ишемии пирамидных нейронов». С другой стороны, по мнению автора: «Вполне вероятно, что найденное нами сочетание высокой реактивности дренажно-детоксикационной функции и длительное сохранение высокой гидратации нейронов и отростков астроцитов в нейропиле можно рассматривать как возможный механизм саногенеза после ишемии и травмы».

Активация дренажно-детоксикационной системы автором определяется как проявления отека-набухания нейропиля, астроцитарных отростков.

Вопрос: что понимается под дренажно-детоксикационной функцией, что входит в ее структуру? Каков механизм детоксикации?

Автор говорит о роли макроглии, в частности визуализирует астроциты и описывает их структуру, не уделяя отдельного внимания клеткам, входящим в состав гематоэнцефалического барьера.

Вопрос: Изменялась ли цитоархитектоника астроцитов, связанных с эндотелием кровеносных капилляров гиппокампа?

«В зоне дегенеративного изменения нейронов увеличивалось содержание астроцитов, олигодендроцитов и микроглиоцитов»

Вопрос: как различали астроциты и олигодендроциты ?

Обобщая все вышесказанное, следует подчеркнуть, что диссертация Горбуновой А.В. представляет собой многогранный, комплексный труд, выдержанный в хорошем литературном стиле, хорошо иллюстрированный, который по методическому уровню и полученным результатам отвечает самым высоким требованиям и ставит новые вопросы для дальнейших исследований.

Заключение

Таким образом, по актуальности, методическому уровню, теоретической и практической значимости диссертационная работа Горбуновой Анны Владимировны является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача – исследованы структурно-функциональные изменения нервной ткани гиппокампальной формации белых крыс после 20 минутной окклюзии общих сонных артерий, имеющая существенное значение для клеточной биологии, цитологии и гистологии. Диссертационная работа Горбуновой А.В. полностью соответствует критериям положения «О порядке присуждения ученых степеней» (вместе с «Положением о присуждении ученых степеней»), утвержденного постановлением

Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 (ред. от 01.10.2018 с изм. от 26.05.2020), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.22 - клеточная биология.

Официальный оппонент:

Заведующая лабораторией ультраструктурных исследований Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»
доктор биологических наук, профессор
(03.03.04- клеточная биология, цитология, гистология)
телефон (383) 333-64-09, e-mail: nataliya.bgatova@yandex.ru



Наталия Петровна Бгатова

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук». 630060, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2.
телефон (383) 333-64-09 E-mail: lymphology@niikel.ru

Дата составления отзыва 27.01.2022

Бгатова Н.П.
Подпись _____
завещаю _____
Начальник ОК *Б.Г.*



Степаненко О.Н.