

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук Обуховой Лидии Александровны на диссертацию Сергея Андрея Владимировича «Иммуноморфологическая и морфометрическая характеристика тормозных и возбуждающих нейронов коры головного мозга человека в норме и при хронической ишемии», представленную на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Актуальность избранной темы. Диссертация Сергея А. В. посвящена актуальной проблеме современной медицинской науки – исследованию структурно-функциональных особенностей коры головного мозга человека в норме и в условиях хронической ишемии.

Хроническая ишемия мозга является широко распространенным заболеванием в большинстве стран мира, в том числе, в России. По данным ВОЗ сосудистые поражения головного мозга занимают третье место среди причин смертности. Неуклонно прогрессирующее течение заболевания, высокая степень инвалидизации пациентов в трудоспособном возрасте определяют большую медицинскую и социальную значимость данной проблемы. Для эффективной адресной терапии, профилактики, совершенствования диагностических технологий необходимы точные знания клеточных и патофизиологических механизмов развития хронической ишемии мозга.

Несмотря на значительный прогресс в изучении клеточной организации коры головного мозга, расшифровке «биохимических каскадов», приводящих к гибели нейронов при острой и хронической ишемии, целый ряд вопросов требует дальнейших исследований. В настоящее время принято считать, что одним из главных механизмов гибели нейронов при ишемии является их эксайтотоксическое повреждение, поэтому детальные исследования возбуждающих и тормозных систем в коре головного мозга человека с использованием современных методов визуализации и морфометрии нейронов являются чрезвычайно важными. Исследование нейронной организации неповрежденных участков коры различных долей головного мозга человека представляет большой интерес для фундаментальной нейробиологии.

В диссертационной работе Сергея А. В. проведено исследование цито- и синаптоархитектоники коры головного мозга человека в условиях хронической ишемии на биопсийном интраоперационном материале с использованием современных методов иммуногистохимического окрашивания нервной ткани и автоматизированного морфометрического анализа изображений, поэтому важность и своевременность данной работы не вызывает сомнений.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна. Научные положения и выводы диссертации Сергея А. В. основаны на достаточном для решения поставленных задач объеме материала. Исследование выполнено на аутопсийном и интраоперационном биопсийном материале, всего исследованы 78 образцов ткани головного мозга, из них 38 взяты

у пациентов с хронической ишемией во время операций по поводу удаления опухолей мозга: 19 из зоны ишемии – основная группа, 19 образцов содержали неповрежденные участки мозга – группа сравнения. Контрольную группу составили 40 образцов аутопсийного материала, взятого у 5 людей, погибших в результате несчастных случаев. Группы сформированы с использованием рандомизации. Исследование проведено с соблюдением этических норм и правил, одобрено Этическим комитетом Омской государственной медицинской академии. Исследование хорошо спланировано.

Для сбора исходной информации использован адекватный комплекс методов: классические гистологические окраски серийных срезов (гематоксилином и эозином, тионином) с последующей световой микроскопией; иммуногистохимическое окрашивание нейронспецифической енолазы, синаптофизина, глиального фибриллярного кислого белка, кальбиндина, нейропептида Y, с последующей флюоресцентной микроскопией и цифровой микрофотосъемкой. Проведен автоматизированный компьютерный анализ изображений с помощью усовершенствованной автором программы ImageJ. Статистический анализ выполнен в соответствии с принципами доказательной медицины. Научные выводы объективно и полноценно отражают результаты проведенного исследования.

Морфологические изменения документированы микрофотографиями отличного качества, количественные морфометрические данные представлены в 30 таблицах, на диаграммах и графиках.

Идея работы основана на современных представлениях о структурно-функциональной организации тормозных и возбуждающих систем коры головного мозга человека, о механизмах ишемического повреждения нейронов, нейропротекции и нейропластичности.

Результаты исследования тщательно проанализированы и обсуждены с привлечением современной зарубежной и отечественной литературы. Все положения и выводы основаны на фактах, полученных лично автором. Основные результаты диссертации опубликованы в 9 научных трудах, из них 4 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендуемых для публикаций основных результатов исследования. Результаты доложены на международных научных конференциях различного уровня. Таким образом, достоверность и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе, сомнений не вызывают.

Результаты исследования Сергеева А. В. являются **новыми**. Выявлены новые закономерности перестройки тормозных и возбуждающих систем коры головного мозга человека в условиях хронической ишемии. Впервые установлено, что метаболическая активация сохранившихся нейронов сопровождается реорганизацией межнейронных отношений – усилением тормозных влияний интернейронов на возбуждающие пирамидные нейроны коры головного мозга, что подтверждается увеличением количества ингибирующих аксосоматических синаптических комплексов. Впервые выявлены изменения, свидетельствующие о развитии нейропротективных и нейропластических процессов в коре

головного мозга при хронической ишемии – усиление экспрессии кальбиндина, снижающего концентрацию ионов кальция внутри клеток и уменьшающего тем самым вероятность их эксайтотоксического повреждения, компенсаторная активация тормозных интернейронов и нейроглии.

Получены новые количественные данные о численной плотности нейронов и глиальных клеток в различных слоях неповрежденной коры лобной, теменной, височной, затылочной долей, что вносит существенный вклад в описание структуры коры головного мозга в норме. Впервые дана количественная характеристика размеров, формы и тинкториальных свойств нейронов в коре головного мозга человека в норме и при хронической ишемии с использованием автоматизированного анализа изображений (программа ImageJ).

Результаты исследования Сергеева А. В. являются **значимыми для медицинской науки, исследовательской и клинической практики**. Получены новые знания, расширяющие современные представления о механизмах структурно-функциональных преобразований тормозных и возбуждающих систем коры головного мозга человека в условиях хронической ишемии. Особый интерес представляют данные количественного анализа тинкториальных свойств нервных клеток с помощью метода построения диаграмм пиксельного распределения цветных изображений, полученных с препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином. Внедрение этого метода позволит проводить объективный анализ архивных материалов. Результаты исследования целесообразно учитывать в работе патоморфологических лабораторий для более точной оценки состояния нервной ткани, в клинической практике для разработки адекватных стратегий лечения и профилактики хронической ишемии мозга.

Результаты диссертационной работы Сергеева А. В. представляют интерес для клеточной биологии, цитологии, гистологии, неврологии, патологической анатомии, патологической физиологии и должны быть включены в лекционные курсы соответствующих дисциплин в медицинских высших учебных заведениях.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность. Диссертационная работа Сергеева А. В. содержит все необходимые разделы: введение, обзор литературы, главы собственного исследования, включающие главу «Материал и методы исследования», 2 главы с описанием результатов собственных исследований, «Обсуждение результатов», выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список литературы, список иллюстративного материала.

Во введении хорошо показана актуальность исследования структурно-функциональной организации коры головного мозга с точки зрения фундаментальной науки, однако было бы логично подчеркнуть медицинскую и социальную значимость проблемы. Цель исследования соответствует теме и заявленной специальности, замечаний к ней нет. Сформулированы 7 конкретных задач; к ним есть небольшое замечание: в 3,4,5 задачах указано, что будет исследовано и для чего, такая формулировка никаких возражений не вызывает, но в 1,2,6 и 7 задачах говорится только о том, какие показатели планируется исследовать, можно было и

здесь сказать, для чего. В разделе «Научная новизна» полно отражены новые результаты работы. Однако относительно повышенного содержания NSE в нейронах необходимо было уточнить, что это выявлено во всех долях мозга, поскольку для коры лобной доли данная закономерность была описана ранее, другими исследователями. В разделе «Практическая значимость» автор корректно дает оценку новых знаний, полученных благодаря проведенному исследованию, и обозначает перспективы по их практическому использованию.

В диссертации Сергеева А. В. 7 положений, выносимых на защиту. Они содержат все наиболее важные результаты, полученные автором. Но, на мой взгляд, их слишком много и они слишком мелкие, их без ущерба можно было укрупнить и сделать более концептуальными.

Обзор литературы написан хорошим литературным языком, четко структурирован, содержит сведения по всем разделам проведенного исследования. В обзоре подробно проанализированы имеющиеся в литературе сведения о гистологическом и цитологическом строении коры головного мозга. Обсуждаются проблемы морфологии и морфометрии нервной ткани, обусловленные характером исследуемого материала (аутопсийный или биопсийный), обсуждаются возможности различных методов идентификации нейронов и нейроглии, подробно описаны иммуногистохимические маркеры нейронов, нейроглии и синапсов, изложены современные представления о механизмах ишемических поражений головного мозга и процессах восстановления поврежденных структур. Отдельная глава посвящена перспективным направлениям исследования коры головного мозга, в ней анализируются методологические и методические проблемы исследования структуры и функций нервной ткани. Имеются ссылки как на классические, хрестоматийные работы, так и на научные статьи, вышедшие за последние 5 лет, их более 30 %. Обзор литературы является одним из достоинств работы.

Глава «Материал и методы исследования» написана полно и квалифицированно. Четко представлен дизайн исследования. Имеется ссылка на заключение этического комитета по месту выполнения работы. Подробно описаны объект исследования, процедура забора материала, его фиксации, проводки, изготовления серийных срезов, детально описаны методы морфологического исследования с обоснованием их выбора, приведен протокол иммуногистохимического окрашивания срезов с указанием списка использованных реагентов. Приведены технические параметры микроскопа, использованного в работе, и алгоритм получения цифровых микрофотографий. Особо следует отметить раздел, посвященный автоматизированной компьютерной обработке изображений с помощью программы ImageJ и статистическому анализу полученных данных – детально описаны все этапы получения изображения, его подготовки к анализу и самого анализа. Все статистические критерии использованы обоснованно, в соответствии с типом данных. Выполненные на высоком профессиональном уровне морфологическое исследование, компьютерный анализ изображений и статистическая обработка данных являются несомненными достоинствами данной работы.

Анализ главы результатов собственного исследования. В первой главе большое

внимание уделено сравнительному исследованию численной плотности нейронов и их тинкториальных свойств на аутопсийном и биопсийном материале. Были получены важные с практической точки зрения результаты. Автор убедительно показал, что аутопсийный материал при определенных условиях обработки пригоден для проведения иммуногистохимического исследования коры головного мозга человека. Исследование различных участков коры на биопсийном интраоперационном материале позволило сделать обоснованный вывод о возможности использования удаленных от опухоли участков коры в качестве нормы (контроля). Результаты исследования неповрежденных участков мозга с помощью современных методов вносят ценный вклад в описание нормального строения коры головного мозга человека, поскольку в работе были изучены все ее слои в различных долях полушарий большого мозга.

Большой интерес представляет методический аспект диссертационной работы Сергеева А.В., касающийся использования методов компьютерного анализа изображений. В частности, детальное и квалифицированное описание способа изучения тинкториальных свойств нейронов и нейропиля коры головного мозга с помощью гистограмм пиксельного распределения на препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином. Способ разработан автором на основе программы ImageJ. Этот фрагмент работы может служить основой для методических рекомендаций по использованию автоматизированного морфометрического анализа в нейроморфологических исследованиях. Хорошее владение современными методами морфологического исследования является одним из достоинств данной работы.

В ходе исследования численной плотности и тинкториальных свойств нейронов показано, что хроническая ишемия приводит к снижению содержания нейронов и появлению значительного числа реактивно и деструктивно измененных клеток во всех слоях коры, однако во всех долях полушарий большого мозга наиболее выраженные изменения выявлены во II и V слоях. Возникает закономерный **вопрос**, с чем это связано? С различиями кровоснабжения слоев коры, метаболизма нейронов, функциональной специализацией их, или вызвано другими причинами? По данным литературы известно, что при хронической ишемии мозга происходит редукция сосудистого русла. Отмечали ли Вы в своем исследовании снижение плотности кровеносных капилляров в коре головного мозга при хронической ишемии?

Интересные результаты получены при иммуногистохимическом выявлении нейрон-специфической енолазы в нейронах. Количественный анализ показал увеличение содержания этого маркера в нормохромных жизнеспособных нейронах. Ранее подобные изменения были выявлены в коре лобной доли. В настоящем исследовании компенсаторная активация метаболизма неповрежденных нейронов показана во всех изученных долях полушарий большого мозга, что свидетельствует об универсальном характере этой закономерности. Однако сделать вывод о состоянии функциональной активности нейронов только по экспрессии в них NSE нельзя, требуется оценка способности адекватного восприятия, переработки и передачи информации, состояния генетического аппарата клеток. Результаты исследования

синаптоархитектоники коры головного мозга показали, что в условиях хронической ишемии происходит выраженная перестройка межнейронных контактов. На фоне общей редукции синаптических комплексов аксосоматические синапсы были менее подвержены деструкции, а при пересчете площади синаптофизин-позитивного материала на один пирамидный нейрон его относительное содержание даже увеличилось. Это свидетельствует о том, что сохранившиеся неповрежденные нейроны поддерживают не только собственный метаболизм, но и функциональную активность нейронных сетей.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии кальбиндина и нейропептида Y в нейронах и глиального кислого фибриллярного белка позволило выявить комплекс защитных и восстановительных процессов при хронической ишемии, свидетельствующих о высокой пластичности коры головного мозга. В частности, выявлена компенсаторная активация тормозных интернейронов за счет реорганизации их отростков, что наряду с повышением экспрессии кальбиндина в пирамидных нейронах и реакцией астроцитарной глии должно приводить к снижению риска их эксайтотоксического повреждения.

Результаты исследования хорошо проанализированы, осмыслены и детально обсуждены. В конце главы приведена схема адаптивно-компенсаторной реорганизации нейронов и нейронных сетей коры головного мозга при хронической ишемии. Автор хорошо ориентируется в своих данных, четко систематизирует их, что является достоинством работы.

В диссертационной работе Сергеева А. В. 7 выводов, все они основаны на большом фактическом материале, полученном лично автором, содержат доказательства на положения, выносимые на защиту. Замечаний к первым трем выводам нет. Четвертый вывод, на мой взгляд, немного неполный. После его прочтения складывается впечатление, что с синапсами в коре при хронической ишемии совсем все плохо, все изменения носят только негативный характер, хотя в работе были выявлены и положительные моменты, показана относительная сохранность аксосоматических синапсов на пирамидных нейронах и даже увеличение содержания синаптофизина при пересчете на один нейрон. Пятый, шестой и седьмой выводы содержат только констатирующую часть, каждый из них можно было продолжить, сказав, о чем свидетельствуют указанные изменения, к чему приводят или могут привести в итоге.

В диссертации Сергеева А. В. имеются практические рекомендации по использованию предложенного автором метода компьютерного анализа тинкториальных свойств нейронов (на основе программы ImageJ) для более точной оценки состояния нервной ткани на гистологических срезах. Остается только пожелать автору донести эту информацию до широкого круга морфологов и патоморфологов, издав полноценные методические рекомендации.

В целом диссертация производит хорошее впечатление, она обладает внутренним единством, написана заинтересованно, хорошим литературным языком, аккуратно оформлена, хорошо иллюстрирована. Хотя в рукописи встречаются опечатки и неудачные выражения, они не умаляют достоинств работы. Основные результаты исследования опубликованы в изданиях,

рекомендованных ВАК. Автореферат полностью отражает содержание работы. Принципиальных замечаний к диссертационной работе Сергеева А. В. нет.

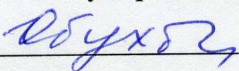
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Сергеева Андрея Владимировича на тему: «Иммуноморфологическая и морфометрическая характеристика тормозных и возбуждающих нейронов коры головного мозга человека в норме и при хронической ишемии», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей значение для развития нейроморфологии – на основании выполненного автором фундаментального исследования установлены закономерности структурно-функциональных преобразований тормозных и возбуждающих нейронов коры головного мозга человека в условиях хронической ишемии.

Диссертация соответствует требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней (постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук (14.03.01 – анатомия человека),
профессор кафедры физиологии факультета естественных наук
Новосибирского государственного университета



Обухова Лидия Александровна

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2.

телефон (383) 330-32-42, e-mail: rector@nsu.ru

22 января 2015 года

