

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Жданкиной Анны Александровны на диссертацию Кисель Алены Андреевны «Демиелинизация в условиях ишемии головного мозга у крыс», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – Физиология.

Актуальность темы диссертационной работы.

Острые нарушения мозгового кровообращения входят в тройку основных причин потерь трудоспособности, инвалидизации, смертности населения в наиболее развитых странах. По данным международного эпидемиологического исследования (World Development Report), каждый год в мире около 9 млн. человек переносят инсульт и более половины из них умирают. Средняя заболеваемость инсультом в РФ у взрослых составляет 460,3 на 100 тыс. населения в год. В нашей стране проживает более 1 млн. человек, перенесших инсульт, 80% из которых являются инвалидами.

Изучение механизмов повреждения и компенсации центральной нервной системы после ишемии головного мозга до сих пор остаются актуальной задачей исследователей во всем мире, решение которой позволит улучшить эффективность реабилитационных мероприятий, разработать новые методы прогнозирования восстановления неврологических функций, осуществлять вторичную профилактику инсульта.

Процессы демиелинизации в условиях ишемии головного мозга до конца не изучены, однако известно, что белое вещество мозга чувствительно к ишемии, а миелинизация поврежденных аксонов играет важную роль в процессе восстановления утраченных функций после инсульта. На сегодняшний день не существует неинвазивных технологий нейровизуализации при нарушениях мозгового кровообращения, позволяющих количественно оценить содержание миелина в сером веществе.

Разработка таких методов чрезвычайно важна для клинических и фундаментальных исследований в нейробиологии.

Научная новизна исследования.

Исследование А.А. Кисель посвящено изучению динамики процесса демиелинизации на моделях локальной и тотальной ишемии головного мозга крыс с использованием гистологических, иммуногистохимических методов исследования и метода количественной оценки содержания миелина с помощью картирования макромолекулярной протонной фракции. Ранее подобных исследований не проводилось. Автором впервые получены данные о том, что демиелинизация более выражена при локальной ишемии, причем первоначально однородный очаг поражения к 30 суткам после операции подразделяется на зоны снижения и увеличения плотности миелина, то есть наглядно продемонстрирован процесс реорганизации мозговой ткани. Показано, что значение макромолекулярной протонной фракции в очаге поражения после локальной ишемии сходно с динамикой демиелинизации, определяемой с помощью гистологического и иммуногистохимического методов, демонстрирует высокую специфичность в отношении миелина, не зависит от количества нейронов и микроглии.

Значимость для науки и практической деятельности полученных соискателем результатов.

Полученные автором фундаментальные знания о процессах демиелинизации структур головного мозга при ишемии различного генеза представляют значительный интерес для нейробиологов, нейрофизиологов, неврологов с точки зрения понимания закономерностей повреждения, восстановления и реорганизации центральной нервной системы.

Прижизненный неинвазивный метод картирования миелина является принципиально новым инструментом нейровизуализации при ишемических повреждениях головного мозга. Гистологическая валидация метода картирования MPF, его точность, воспроизводимость и доступность дают возможность внедрения в клиническую практику, как уникального

инструмента мониторинга потери и восстановления миелина при острых и хронических нарушениях мозгового кровообращения.

Модель исследования, выстроенная автором, служит базой для изучения действия различных биологически активных веществ в условиях моделирования ишемии головного мозга у крыс.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ №14-45-00040 «Неинвазивное количественное картирование миелинизации серого вещества головного мозга у животных» 2014–2018 гг., проекта по Программе повышения конкурентоспособности ТГУ СИ4 по теме «Комплексное исследование механизмов регенерации мозга на моделях тотальной ишемии мозга и рассеянного склероза» 2015–2016гг. и государственного задания Минобрнауки России №18.2583.2017/4.6 «Неинвазивное количественное картирование миелинизации на основе магнитно-резонансной томографии для клинической диагностики неврологических заболеваний и аномалий развития головного мозга» 2016–2017гг.

Результаты исследования А.А. Кисель представлены на отечественных и международных форумах, опубликованы в 20 научных работах, 5 из которых – публикации в журналах, рекомендованных ВАК РФ для опубликования материалов кандидатских и докторских диссертаций, из них 2 статьи в зарубежных научных журналах, входящих в Web of Science, 2 статьи в российском научном журнале, переводная версия которого входит в Web of Science.

Обоснованность и достоверность результатов и выводов диссертации.

В диссертации использован материал, полученный от 78 крыс. Объектом исследования служил мозг крыс.

Работа имеет оригинальный и хорошо продуманный дизайн: две модели ишемии головного мозга – трехсосудистая модель тотальной ишемии и модель локальной ишемии мозга путем окклюзии среднемозговой артерии с несколькими временными точками забора материала.

Для получения достоверных данных в работе использованы научно обоснованные современные методы исследования: исследование неврологического дефицита экспериментальных животных, МРТ-сканирование с реконструкцией параметрических карт T_1 , T_2 , PD, MPF, ADC; гистологический метод выявления миелина люксолем быстрым синим; иммуногистохимические методы выявления антител к основному белку миелина MBP, к белку NeuN зрелых нейронов и к белку Iba1 микроглии.

Статистический анализ проводился при помощи пакета программ STATISTICA 10.0. Для оценки достоверности различий между группами по шкале неврологического дефицита в обеих сериях использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Значимость различий между полушариями и между зонами в пределах ишемического очага для экспериментальных групп оценивали с помощью двухвходового дисперсионного анализа с повторными измерениями и коррекцией Greenhouse-Geisser на множественность измерений. Значимость попарных различий между группами проясняли с помощью последующего post-hoc анализа с использованием критерия LSD Fisher. Для измеренных МРТ, гистологических и иммуногистохимических параметров были определены процентные изменения, которые были проанализированы с помощью дисперсионного и корреляционно-регрессионного анализа. Для оценки различий динамических изменений гистологических и томографических параметров проводили одноходовый дисперсионный анализ с фактором «группа» (контроль и экспериментальные группы согласно временным точкам) с последующим post-hoc анализом попарных различий с помощью критерия LSD Fisher. Взаимосвязь между томографическими и гистологическими переменными была проанализирована с помощью коэффициента корреляции Пирсона (R). С помощью алгоритма пошагового удаления переменных были протестированы множественные регрессионные модели для определения комбинации количественных МРТ параметров,

наиболее точно отражающей изменения степени миелинизации в условиях ишемии.

Таким образом, тщательный подбор материала, использование современных методических приемов и методов исследования, применение адекватных методов статистического анализа обеспечило обоснованность и достоверность полученных в настоящей работе результатов и выводов.

Автором установлено, что повреждение миелина наблюдается как при тотальной, так и при локальной ишемии головного мозга, однако характеризуется различной локализацией, динамикой и выраженностью.

Метод картирования макромолекулярной протонной фракции MRF позволяет с высокой точностью и специфичностью количественно оценить содержание миелина в условиях ишемического повреждения мозга.

Структура и общая характеристика диссертации.

Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, главы собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, содержащего выводы, списка сокращений и списка литературы. Общий объем диссертации составляет 153 страницы машинописного текста, фактические данные проиллюстрированы 20 рисунками и включают 9 таблиц. Библиографический список содержит 303 источника, из них 5 на русском и 298 на иностранных языках.

Содержание диссертации полностью соответствует содержанию и качеству опубликованных работ. Тема диссертации соответствует заявленной специальности: 03.03.01 – Физиология.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Анализ текста диссертации показал, что работа написана грамотно, научным стилем, что свидетельствует о тщательности подготовки материала к защите.

Обзор литературы в диссертации написан скрупулезно и грамотно, с привлечением литературы по изучаемой тематике, весьма высок процент статей за последние 5 лет, преобладают статьи иностранных авторов.

Необходимо отметить содержание и детальность главы «Материалы и методы», в которой тщательно подобран арсенал использованных методов и методик, описанных подробно, что дает возможность другим ученым при необходимости воспроизвести указанные методические приемы в своей работе.

В главе «Результаты исследования» автором представлены данные об особенностях демиелинизации в головном мозге крыс после тотальной и локальной ишемии головного мозга в динамике, документированные микрофотографиями и МРТ-картами высокого качества. Цифровые данные подтверждены таблицами и графиками, дающими полную информацию о проведенных количественных исследованиях.

Очень интересна находка автора об увеличении плотности миелина по периферии очага поражения к 30-м суткам после локальной ишемии, которая отражает феномен ремоделирования в центральной нервной системе.

Автором проведено сопоставление результатов морфологических и иммуногистохимических исследований с данными метода картирования МРФ, что дало возможность сделать вывод о его высокой точности и специфичности относительно прочих клеточных компонентов центральной нервной системы, а также позволило провести количественную оценку потерь миелина при окклюзии средней мозговой артерии.

Обсуждение собственных результатов автор проводит объективно, с привлечением результатов близких по тематике литературных источников.

Замечания и вопросы к работе.

В целом, высоко оценивая полученные автором результаты, перспективность для теоретической и практической медицины, следует высказать отдельные замечания и вопросы.

1. В тексте диссертации встречаются невыверенные грамматические и стилистические ошибки: стр. 9, 18, 21, 22, 23, 28, 31, 41, 80, 86, 94.

2. В главе «Материалы и методы» при описании цели использования реактивов при окрашивании люксолом быстрым синим автором допущены

неточности, например, в микротехнике не существует понятия «отмывка неспецифики».

3. Сравнительная временная характеристика двух моделей не в полной мере отражает их различия, так как нет полного соответствия по исследуемым контрольным точкам.

Указанные замечания относятся большей частью к оформлению диссертации, не снижают общего положительного впечатления от работы и не имеют принципиального значения.

В дискуссии хотелось бы получить ответ на следующие вопросы:

1. Почему нейроны зубчатой извилины при тотальной ишемии оставались интактны?

2. Сравнивали ли Вы MPF карты мозга животных с тотальной и локальной ишемией? Если да, то как отличаются очаги в стриатуме, какие участки мозга, кроме гиппокампа, поражаются?

3. Как Вы думаете, почему в настоящем исследовании не удалось выявить вовлеченность структур контралатерального полушария в процесс повреждения, репарации и реорганизации?

4. Как сказывается толщина гистологического среза в 10 мкм при оценке результатов окрашивания миелина люксомем быстрым синим? Сравнивали ли Вы значения оптической плотности LFB срезов, полученных при помощи криостата и микротомы, который дает меньшую толщину среза?

Заключение.

Диссертация Кисель Алены Андреевны «Демиелинизация в условиях ишемии головного мозга у крыс», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.03.01 – физиология, является научно-квалификационной работой, содержащей решение научной задачи, посвященной закономерностям демиелинизации нейронов головного мозга при ишемии, а также демонстрирующей эффективность метода прижизненного картирования макромолекулярной протонной фракции для качественной и количественной оценки

миелинизации головного мозга, имеющей значение для физиологии, нейростологии, нейробиологии и медицины.

По степени актуальности, новизны и практической значимости результатов диссертационная работа Алены Андреевны Кисель соответствует требованиям п. 9 действующего «Положения о присуждении ученых степеней», предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присвоения искомой степени по специальности: 03.03.01 – Физиология.

15.11.2019

Официальный оппонент:

Профессор кафедры гистологии,
эмбриологии и цитологии
Сибирского государственного
медицинского университета

Доктор медицинских наук
(03.03.04 – Гистология, цитология, клеточная биология;
14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология),

Жданкина Анна Александровна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2; 8 (3822) 909-823, rector@ssmu.ru. <https://www.ssmu.ru/ru/>

