

ОТЗЫВ

официального оппонента,

доктора медицинских наук, доцента Павлова Артёма Владимировича на диссертацию Эковой Марии Рафаэлевны на тему «Морфофункциональные изменения гиппокампа при моделировании комбинированного стресса», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.03.02 Патологическая анатомия, 03.03.04 Клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа М. Р. Эковой посвящена изучению морфофункциональных изменений гиппокампа крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев в норме и при моделировании комбинированного стресса.

Известно, что среди лимбико-ретикулярных структур головного мозга в реализации стресс-индуцированных реакций центральное положение занимает гиппокамп. Функционально он вовлечен в переработку когнитивной и эмоциональной информации, данные функции топографически локализованы в различных его участках, что позволяет оценивать изолированное влияние стрессовых ситуаций на инволюцию нейронов гиппокампа. Также гиппокамп играет важную роль в контроле состояния гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы в качестве своеобразного надгипоталамического центра. Нарушения, регистрирующиеся в регуляции указанной системы, приводят к снижению адаптационной функции организма к воздействию факторов внешней среды и выживанию во время стресса. Изучение данных процессов имеет важное значение для понимания механизмов повреждения головного мозга при старении. В последние годы накоплено немало сведений о морфофункциональных изменениях гиппокампа в процессе старения, однако большинство исследователей не описывают различия в citoархитектонике и иммунофенотипе функционально обособленных участков полей гиппокампа: дорсальном и вентральном отделах. Вместе с тем получение значимой

информации о морфологических особенностях этих участков представляется актуальным.

Следует отметить, что при моделировании различных стрессовых воздействий чаще используются молодые животные, а основные механизмы, с помощью которых стресс вызывает нейродегенеративные изменения и повреждения в дорсальном и вентральном отделах гиппокампа стареющего организма, остаются неясными. В этом аспекте проведенное автором экспериментальное изучение морфофункциональных изменений гиппокампа представляет несомненный научный интерес и, безусловно, является актуальным.

Степень обоснованности научных положений и выводов, достоверность полученных результатов

Научные положения диссертационной работы обоснованы грамотным методологическим подходом к исследованию. Достоверность полученных автором результатов основана на достаточном объеме выборки, грамотном планировании экспериментальной работы, использованием как классических гистологических методов исследования, так и современных методов иммуногистохимии. Результаты исследования проиллюстрированы большим количеством микрофотографий, графиков и таблиц.

Научная обоснованность положений и выводов, сформулированных в диссертации, подтверждается также проведенным с помощью современных адекватных методов статистики корректным анализом фактического материала, а именно оценивалась нормальность распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка с последующим применением непараметрического критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney, U-test). Для оценки справедливости гипотезы о существовании различий между выборками рассчитывали критический уровень статистической значимости с учетом поправки Бонферрони.

Достоинством работы является использование программного морфометрического анализа, при котором было произведено несколько тысяч измерений, что определяет объективность проделанной работы.

Результаты, полученные автором, можно рассматривать как достоверные и значимые, а на основании представленного объема морфометрических данных можно говорить о репрезентативности исследования и возможности экстраполяции результатов на генеральную совокупность. Выводы логично и закономерно вытекают из содержания работы.

Научная новизна исследования

В диссертации М. Р. Эковой впервые на основании комплексного морфологического исследования, включающего в себя оценку иммунофенотипа с применением программной компьютерной морфометрии, дана развернутая характеристика морфофункциональных изменений в дорсальном и вентральном отделах гиппокампа у крыс зрелого и старческого возрастов. Показано, что повреждения нейронов, сопровождающиеся увеличением экспрессии caspase-3, преобладают в дорсальном отделе гиппокампа. В работе впервые выявлено зависящее от возраста снижение экспрессии сериновой рацемазы, наиболее выраженное в вентральном отделе гиппокампа, сопровождающееся перераспределением иммунореактивного материала в перикарионы нейронов пирамидного слоя из их дендритов, расположенных в радиальном слое. Автором впервые при исследовании NOS-зависимых механизмов с участием iNOS, eNOS, nNOS у крыс зрелого и старческого возрастов выявлены различия в уровнях экспрессии в нейронах, нейропиле, а также в эндотелии капилляров дорсального и вентрального отделов гиппокампа. С участием нейропротективных механизмов в дорсальном отделе гиппокампа у животных в возрасте 24-х месяцев обнаружено появление экспрессии BDNF в нейронах и его увеличение в астроцитах, при реализации процессов аутофагии в вентральном отделе гиппокампа показано выраженное увеличение экспрессии beclin-1 в нейронах пирамидного слоя в сочетании с регрессивными изменениями астроглии в виде уменьшения уровня экспрессии GFAP. В работе убедительно доказано, что при моделировании комбинированного стресса у крыс в возрасте 12-ти месяцев наиболее выраженные признаки повреждения обнаружены в нейронах пирамидного слоя СА3 дорсального отдела гиппокампа

и в CA1 вентрального отдела, сопровождающиеся увеличением количества нейронов с признаками апоптоза в дорсальном отделе гиппокампа; у крыс в возрасте 24-х месяцев отмечаются менее выраженные признаки повреждения в сочетании с менее выраженной активацией аутофагии по оценке экспрессии beclin-1.

В рамках проведенного исследования при сравнительном анализе морфофункциональных изменений гиппокампа под влиянием стрессового воздействия выявлено наиболее выраженное снижение уровня экспрессии сериновой рацемазы в вентральном отделе гиппокампа у крыс в возрасте 12-ти месяцев, увеличение – у 24-х месячных животных, что сочетается с прогрессирующим снижением нейрональной пластичности и угнетением BDNF-опосредованных нейропротективных механизмов. Впервые при воздействии комбинированного стресса проведено иммуногистохимическое исследование изоформ NO-синтаз (iNOS, eNOS, nNOS) в гиппокампе, выявлено увеличение экспрессии iNOS, наиболее выраженное у 12-ти месячных животных в вентральном отделе гиппокампа, снижение экспрессии - у 24-х месячных животных в вентральном отделе на фоне увеличения экспрессии в дорсальном отделе, что сочетается с выраженным снижением экспрессии eNOS в эндотелии капилляров, нейропиле радиального слоя дорсального отдела гиппокампа в обеих возрастных группах при увеличении удельного количества eNOS-иммунопозитивных нейронов у 24-х месячных крыс в пирамидном слое.

Автором на основании анализа полученных морфологических данных о реализации процессов клеточной гибели, адаптации, включая различные механизмы нейропластичности, сформулирована научно-теоретическая концепция о цитоархитектонической и иммунофенотипической регион-специфической гетерогенности гиппокампа у крыс зрелого и старческого возрастов в норме и под влиянием комбинированного стресса.

Значимость для науки и практики

Представленная работа имеет несомненную научную и практическую значимость. Теоретическая значимость работы состоит в получении

приоритетных данных об особенностях изменений нейронов различных цитоархитектонических областей и пространственной иммунофенотипической гетерогенности гиппокампа при старении, а также при воздействии комбинированного стресса. Важное значение имеют результаты, полученные с применением иммуногистохимического метода, которые вносят вклад в понимание функционирования дорсального и вентрального отделов гиппокампа, что может послужить основой для разработки способов фармакологической коррекции с применением веществ, обладающих нейро- и стресспротекторными свойствами в лечении и профилактике возрастных нарушений структуры и функций головного мозга.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа объемом 216 страниц машинописного текста построена по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, описание материала и методов исследования, изложение полученных результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Работа содержит 8 таблиц и 88 рисунков. Список использованных литературных источников содержит 288 работ как российских, так и зарубежных авторов.

Во **введении** автором раскрыта и доказана актуальность темы диссертации, степень ее разработанности. Диссертантом четко сформулирована цель исследования, для реализации которой предусматривается решение 4 конкретных задач. Данный раздел содержит сведения о научной новизне, теоретической и практической значимости работы. Здесь же сформулированы положения, выносимые на защиту, которые обоснованы грамотным методологическим подходом к исследованию. Представлена информация об апробации работы и публикациях, результатах внедрения исследования в педагогический процесс, научную и практическую работу, отражен личный вклад автора в данную работу.

В главе 1 диссертации представлен аналитический обзор данных литературы по изучаемой проблеме. Глава состоит из трех частей, в которых освещается гистологическая характеристика гиппокампа на этапах старения и его физиологическое значение, приводятся современные данные о морфологических изменениях в гиппокампе при различных видах стресса и роли стресса в возникновении и развитии нейродегенеративной патологии. На основании критического анализа данных в тексте обзора выделены нерешенные вопросы и обоснована необходимость диссертационного исследования.

Глава 2 посвящена описанию материала и методов исследования. В ней приведена общая характеристика исследованного материала, в необходимом объеме дано описание использованных методов исследования, среди которых классические методы гистологического исследования, иммуногистохимический метод, а также методы статистической обработки, полностью соответствующие характеру проводимых исследований. Автор приводит панель использованных в исследовании первичных антител с указанием клона, фирмы, страны производителя, разведения, демаскировки антигенных детерминант, времени и условий инкубации, что обеспечивает воспроизводимость полученных результатов. Дано подробное описание моделирования комбинированного стресса, которое проводилось совместно с сотрудниками кафедры фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ, описаны экспериментальные группы животных: контрольные крысы в возрасте 12-ти и 24-х месяцев и стрессированные крысы в возрасте 12-ти и 24-х месяцев.

Глава 3 содержит описание полученных результатов, которое составляет основную часть работы (116 стр.). Глава состоит из трех основных разделов.

В первом разделе главы 3 приведены результаты исследования гиппокампа крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев. При использовании окрашивания тионином по методу Ниссля продемонстрированы особенности нейрогистологического строения дорсального и вентрального отделов гиппокампа крыс представленных возрастных групп. Установлено, что повреждения нейронов, преобладают в дорсальном отделе в СА3, а в

вентральном - в CA1. С использованием иммуногистохимического метода исследования с учетом изменения экспрессии различных изоформ NO-синтаз (iNOS, eNOS, nNOS), BDNF, GFAP, beclin-1, Hsp70, сериновой рацемазы и синаптофизина автором дана иммунофенотипическая характеристика дорсального и вентрального отделов гиппокампа крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев.

Во *втором и третьем разделах главы 3* представлена патоморфологическая и иммуногистохимическая характеристика с использованием вышеуказанных биомаркеров дорсального и вентрального отделов гиппокампа крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев при моделировании комбинированного стресса.

Результаты полученных исследований документированы микрофотографиями, графиками и таблицами, что подтверждает их объективность. Наличие отдельных заключений в подглавах существенно облегчает анализ полученных данных по каждому этапу исследования. В целом, представленные результаты характеризуются новизной и оригинальностью.

В главе «Обсуждение полученных результатов» автором на 16 страницах текста выполнен всесторонний анализ собственных данных и проведено сопоставление полученных результатов с имеющимися в литературе сведениями, что позволило сформулировать положения, выносимые на защиту и выводы, основанные на комплексном анализе качественных и количественных морфофункциональных изменений в дорсальном и вентральном отделах гиппокампа крыс зрелого и старческого возрастов в норме и при моделировании комбинированного стресса, это подчеркивает ценность и новизну исследования М. Р. Эковой.

Заключение основано на полученных результатах и их анализе, автор подводит итоги диссертационного исследования и обозначает перспективные направления дальнейшей разработки темы исследования.

Полученные результаты позволили автору сформулировать восемь выводов, которые соответствуют цели и задачам исследования. Автореферат соответствует материалам диссертации и полностью отражает ее содержание.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах

По материалам диссертации опубликовано 17 работ, 6 из которых – в журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

Вопросы и замечания

Принципиальных замечаний по содержанию работы Эковой М. Р. нет. В процессе знакомства с диссертацией возникли следующие вопросы:

1. В физиологических исследованиях на основании определенных функциональных особенностей принято выделять дорсальный и вентральный отделы гиппокампа. Каковы морфологические отличия дорсального и вентрального отделов гиппокампа крыс по результатам вашего исследования?
2. Чем обусловлен выбор животных только одного пола для вашего исследования?

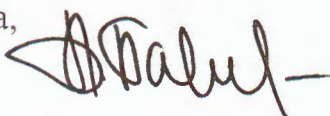
Предлагаемые вопросы не умаляют достоинства выполненного диссертационного исследования и носят дискуссионный характер.

Заключение

Таким образом, диссертационное исследование Эковой Марии Рафаэлевны «Морфофункциональные изменения гиппокампа при моделировании комбинированного стресса», выполненное под руководством д.м.н. Н. В. Григорьевой и д.м.н., профессора А. В. Смирнова является завершенной научно-квалификационной работой и содержит решение актуальной научной задачи – выявление морфофункциональных изменений дорсального и вентрального отделов гиппокампа в норме при старении и при моделировании комбинированного стресса, что имеет существенное значение для патологической анатомии и клеточной биологии, цитологии, гистологии.

По своей актуальности, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности и новизне результатов, их значимости для науки и практики, полноте опубликованных материалов диссертация Эковой М. Р. соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции постановления Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Экова Мария Рафаэлевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.03.02 Патологическая анатомия и 03.03.04 Клеточная биология, цитология, гистология.

Доцент кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной, оперативной хирургии и топографической анатомии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук по специальностям: 03.03.04 Клеточная биология, цитология, гистология, 14.03.01 Анатомия человека, доцент



Павлов Артём Владимирович

390026, г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9
телефон +7 (4912) 46-08-82
e-mail: rzgmu@rzgmu.ru

«14» ноября 2017 г.

Подпись д.м.н., доцента А. В. Павлова заверяю:
Проректор по научной работе
и инновационному развитию
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
д.м.н., доцент



Сужков Игорь Александрович

Сведения
об официальном оппоненте
по диссертации Эковой Марии Рафаэлевны на тему «Морфофункциональные изменения гиппокампа при моделировании
комбинированного стресса» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук
по специальностям 14.03.02 – Патологическая анатомия, 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология
представленной в диссертационный совет Д 208.008.01 при Федеральном государственном бюджетном образовательном
учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

№ п/п	Фамилия, имя, отчество	Год рожде- ния, граж- данство	Место основной работы, адрес места работы, телефон, email	Ученая степень, шифр специальность	Ученое звание	Основные работы по профилю диссертации
1.	Павлов Артём Владимирович	1979, РФ	доцент кафедры сердечно- сосудистой, рентгенэндоваскулярной, оперативной хирургии и топографической анатомии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 390026 г. Рязань, ул.	Доктор медицинских наук (03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология, 14.03.01 – Анатомия человека)	доцент	1. Павлов, А. В. Изменение глио-сосудистых соотношений в сосцевидных телах головного мозга человека в позднем постнатальном онтогенезе [Текст] / А. В. Павлов, С. В. Савельев // Морфологические ведомости. – 2013. – № 1. – С. 35- 39. 2. Павлов, А. В. Возрастные изменения в медиальных ядрах сосцевидных тел головного мозга мужчин в возрасте от 17 до 75 лет [Текст] / А. В. Павлов // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2013. – Т. 41, № 1. – С. 111-113. 3. Павлов, А. В. Иммуногистохимическая

Высоковольтная, д. 9
+7 (4912) 46-08-82
vitrea@yandex.ru

характеристика возрастных трансформаций клеточного состава сосцевидных тел головного мозга людей разных полов [Текст] / А. В. Павлов, С. В. Савельев // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2013. – № 4. – С. 12-16.

4. Павлов, А. В. Возрастные изменения в структуре сосцевидных тел гипоталамуса человека [Текст] / А. В. Павлов // Вестник Ивановской медицинской академии. – 2013. – Т. 18, № 3. – С. 11-15.

5. Павлов, А. В. Гендерные особенности возрастной инволюции ядер сосцевидных тел гипоталамуса человека [Текст] / А. В. Павлов, С. В. Савельев // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 5-1. – С. 120-123.

6. Павлов, А. В. Архитектоника сосцевидных тел головного мозга человека при алкогольной болезни [Текст] / А. В. Павлов // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2014. – Т. 11, № 3. – С. 8-11.

7. Павлов, А. В. Гистологическая характеристика архитектоники сосцевидных тел головного мозга людей разного

						возраста [Текст] / А. В. Павлов, С. Р. Жеребятьева, Г. С. Лазутина, Н. В. Овчинникова // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2016. – Т. 33, № 5 (226). – С. 104-108.
--	--	--	--	--	--	---

Представленные выше данные подтверждаю, согласен на обработку персональных данных.

Официальный оппонент, доктор медицинских наук, доцент



А. В. Павлов

Подпись д.м.н., доцента А. В. Павлова заверяю:

Проректор по научной работе
и инновационному развитию
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,
д.м.н., доцент



И. А. Сучков