

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию
Варенцова Вячеслава Евгеньевича
«Особенности активизации нейрогенеза в обонятельных луковицах
крыс при экспериментальных воздействиях (экспериментально-
морфологическое исследование)»,
представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук
по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Варенцова Вячеслава Евгеньевича посвящена актуальной теме - оценке особенностей постнатального развития обонятельных луковиц (ОЛ) и процесса нейрогенеза в раннем возрастном периоде. Нейрогенез в раннем постнатальном периоде и в зрелом мозге вызывает пристальный интерес неврологов и нейробиологов. В норме образование и включение в ингибирующую сеть обонятельных луковиц новых интернейронов рассматривается как одна из форм пластичности мозга и является не столько восстановительным, сколько адаптационным механизмом, перестраивающим существующую нейронную сеть в ответ на различные стимулы. Интенсивность нейрогенеза в ОЛ модулируется разнообразными физиологическими процессами и внешними стимулами. В экспериментах с сенсорной депривацией показано, что критическим периодом (Yamaguchi, 2005) для дифференцировки и выживания нейронов обонятельных луковиц у грызунов является период 14-28 дней после рождения. Вместе с тем, данные о возрастных особенностях клеточного состава нейрогенных ниш на протяжении первого полугодия жизни крыс неполны. Несмотря на ограниченность нейрогенеза в ОЛ человека, по сравнению с грызунами, предполагается, что его функциональное значение сходно.

Другой аспект исследования нейрогенеза в ОЛ состоит в совершенствовании экспериментальных моделей для целей экспериментальной неврологии. В целом, состояние нейрогенеза в ОЛ — чувствительный маркер различных патологических процессов. Изменения в ростральном миграционном потоке, интенсивности пролиферации нейрональных предшественников в субвентрикулярной зоне, дифференцировки и выживания нейронов в ОЛ

продемонстрированы на различных моделях патологий ЦНС. Так, изменения нейрогенеза в ОЛ являются одним из ранних признаков нейродегенерации при моделировании болезни Паркинсона, Альцгеймера, обнаруживаются при эпилепсии и депрессии.

Оценка нейрогенеза в ОЛ у грызунов активно используется и для исследования нейропротекторного эффекта и влияния на когнитивные функции перспективных препаратов. Однако, однозначных критериев до настоящего времени не выработано. Вместе с тем, использование обонятельных луковиц грызунов как модельной системы требует детальной морфологической характеристики разных этапов их онтогенеза и всестороннего анализа изменений в ответ на экспериментальные воздействия.

Исходя из изложенного выше, поставленный автором вопрос о пластичности нейрогенеза и отзывчивости его фаз на воздействия в раннем возрасте имеет принципиальное значение для нейробиологии. Современность и актуальность диссертационного исследования Варенцова В.Е. «Особенности активизации нейрогенеза в обонятельных луковицах крыс при экспериментальных воздействиях» связана как с нерешенными вопросами формирования и функционирования нервной системы, так и с надеждами на возможности фармакологической коррекции или клеточной терапии нейродегенеративных, демиелинизирующих заболеваний, острых нарушений мозгового кровообращения и других патологий. Можно заключить, что заявленная тема диссертационного исследования Варенцова В.Е. современна и актуальна.

Степень обоснованности научных положений и выводов, достоверность и новизна результатов

Выводы основаны на значительном экспериментальном материале, полученном и обработанном автором. Количество животных, взятых в исследование, позволяет сделать вывод о репрезентативности групп. Исследование проведено с применением современных чувствительных методов иммуногистохимии, а использованная панель антител для выявления нестина, даблкортина, Ki-67 и nNOS достаточна для представленных автором

доказательных заключений о динамике пролиферативной активности и количестве новообразованных клеток, находящихся на разных этапах дифференцировки. Традиционные гистологические методы дополняют проведенное исследование. Высокое качество микрофотографий, представленных в работе, свидетельствует о достоверности результатов. Для количественного анализа автор применил методы компьютерной морфометрии, реализованные с помощью известного программного обеспечения, что определяет корректность проведенных измерений. Выбранные автором показатели информативны, статистические методы применены правильно. Эти подходы позволили получить новые, принципиально важные и достаточно полные представления об особенностях нейрогенеза в ОЛ крыс при экспериментальных воздействиях. Проведенный автором анализ литературы и критическое сопоставление с собственными результатами позволяет заключить, что выводы и научные положения диссертации высоко достоверны.

В работе впервые подробно охарактеризованы топографические особенности распределения маркеров пролиферации и нейрогенеза с неонатального периода до зрелого возраста крыс. Анализ изменений локализации и плотности nNOS-позитивных нейронов, проведенный в работе, представляет особенный интерес. Ранее неоднократно указывалось на значение NO-сигнального пути в нейрогенезе и в обонянии, однако эффекты NO в обонятельных луковицах недостаточно охарактеризованы и отличаются широким спектром — от нейромодулирующего до нейротоксического. Показанная автором возрастная динамика nNOS позитивных нейронов под действием капсаицина и нейропептида ТКPRPGP расширяет представления о роли NO в нейрогенезе. Кроме того, автором впервые получены подробные данные о компенсаторных изменениях и проведен пространственный анализ локализации маркеров нейрогенеза в ОЛ при экспериментальных воздействиях - неонатальном введении капсаицина и воздействии нейропептида ТКPRPGP. Получены важные морфологические подтверждения стимуляции пептидом ТКPRPGP нейрогенеза в ОЛ.

Ценность для науки и практики

Полученные автором результаты расширяют представления о пластических перестройках ОЛ у крыс раннего возраста. Основные результаты работы - детализация возрастных особенностей нейрогенеза ОЛ крыс и дифференцировки нейронов ОЛ в раннем периоде при разнонаправленных экспериментальных воздействиях важны для характеристики фундаментальных закономерностей компенсаторного процесса в ОЛ. Кроме того, проведенная работа имеет важное прикладное значение для верификации экспериментальных моделей необходимых для тестирования перспективных фармакологических препаратов. Внедрение полученных результатов в учебный процесс расширяет представления о репаративных возможностях нервной системы.

Объем и структура диссертации, полнота изложения материалов в опубликованных работах

Диссертация Варенцова В.Е. объемом 157 страниц построена по традиционному плану: «Введение», «Обзор литературы», «Материал и методы исследования», 4 главы собственных исследований, «Обсуждение результатов исследования», «Выводы», «Практические рекомендации» и список цитируемой литературы из 227 источников - 48 отечественных и 179 зарубежных авторов. Хорошо иллюстрирована, содержит 30 рисунков и графиков и 18 таблиц. Автором по теме диссертации опубликовано 27 научных работ, из них - 6 в журналах, включенных в перечень ВАК, 1 полнотекстовая статья в библиографической базе Scopus, 1 патент на изобретение. В автореферате и опубликованных работах в полном объеме отражены основные положения диссертации.

В главе «Обзор литературы» представлен аналитический обзор данных литературы. Глава состоит из шести частей, в которых освещаются современные данные по изучаемой проблеме. В конце литературного обзора автор резюмирует нерешенные вопросы и обосновывает необходимость диссертационного исследования.

Глава 2 посвящена описанию материала и методов исследования.

Приведена характеристика экспериментальных групп, обоснование и описание использованных автором моделей (интраназальное введение пептида ТКРРРРРРРР и подкожное введение капсаицина). В достаточном объеме дано описание методов забора, фиксации и подготовки гистологического материала, гистологических и иммуногистохимических методов исследования, морфометрии и обработки данных.

В главе 3 описаны результаты собственных исследований. Глава состоит из четырех подразделов. Для интактных животных подробно описана морфология и возрастная динамика толщины слоёв ОЛ, площади и количества обонятельных гломерул, приведены измерения размеров нейронов митрального слоя, численные данные представлены в таблицах. Показано, что наиболее выраженные изменения претерпевают гломерулярный и наружный плексиформный слои ОЛ. На основании подсчета Ki-67 позитивных клеток проанализирована зависимость пролиферативной активности от возраста животных. Проведен анализ локализации и количества нестин- и даблкортин-позитивных клеток, исследованы возрастные особенности экспрессии n-NOS. Автором охарактеризованы изменения толщины слоев ОЛ и их связь с активностью нейрогенеза у контрольных животных. В последних двух разделах, аналогичным образом описаны изменения в эксперименте. На модели с введением нейропептида ТКРРРРРРРР автором представлено подтверждение усиления пролиферативной активности и увеличения экспрессии маркеров нейрональной дифференцировки в ОЛ и зависимости наблюдаемого эффекта от возраста животных. На модели с введением капсаицина продемонстрировано, что компенсаторный ответ на гибель нейронов, проявляется активизацией герминативной зоны обонятельного желудочка, сменяющейся усилением миграции нейрональных предшественников по ростральному миграционному тракту.

Глава 4 посвящена обсуждению результатов исследования. Автор суммирует полученные результаты и сопоставляет их с имеющимися в литературе сведениями, что позволило сформулировать положения, выносимые

на защиту и выводы.

Полученные результаты позволили автору сформулировать 11 выводов, отвечающих цели и задачам исследования.

Автореферат соответствует материалам диссертации и полностью отражает ее содержание.

Вопросы и замечания

В целом, результаты диссертационного исследования изложены последовательно и ясно, за исключением незначительных погрешностей в оформлении и непринципиальных опечаток. Однако, при анализе диссертации возникло несколько вопросов и замечаний:

1. Употребление в тексте термина «нейростимуляция» для описания эксперимента с нейропептидом ТКPRPGP требует уточнения, что именно стимулируется? Пролиферация нейрональных предшественников, выделение нейротрофинов, нейрональная активность?

2. Использование Ki-67 - универсального маркера пролиферации, без использования двойной метки, вызывает вопрос о типах пролиферирующих клеток, возможно, по данным литературы или собственным наблюдениям можно уточнить, какую долю из них составляют именно нейрональные предшественники?

3. В разделе материалы и методы не указано количество обработанных при подсчетах срезов и площадь анализируемых областей (поля зрения), а приведено только количество полей зрения на животное. Хотелось бы это уточнить.

4. В результатах по оценке окрашивания на n-NOS встречается интерпретация интенсивности окрашивания как "активности фермента", о чем нельзя утверждать по результатам ИГХ, поскольку по интенсивности окрашивания, с определенными ограничениями, можно судить о содержании белка, но не ферментативной активности.

Следует отметить, что обнаруженные неточности не имеют принципиального значения и не снижают положительного впечатления о работе.

Заключение


По своей актуальности, структуре, научной новизне, методическому уровню, теоретической и практической значимости диссертация Варенцова Вячеслава Евгеньевича «Особенности активизации нейрогенеза в обонятельных луковицах крыс при экспериментальных воздействиях» полностью соответствует требованиям п. 16 Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденным приказом Сеченовского университета от 31.01.2020 г. №0094/Р, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Официальный оппонент:

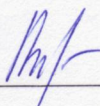
Воронков Дмитрий Николаевич, старший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии, Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр неврологии», кандидат медицинских наук по специальности 03.03.04. – клеточная биология, цитология, гистология.

ФГБНУ НЦН, Москва, 125367, Волоколамское ш. 80,

тел. 8(495)916-3472; E-mail: voronkov@neurology.ru


Воронков Д.Н.

Даю согласие на сбор, обработку и хранение персональных данных


Воронков Д.Н.

Подпись к.м.н., Воронкова Д.Н. заверяю

учёный секретарь ФГБНУ НЦН

кандидат медицинских наук



А. Н. Евдокименко

«21» сентября 2020 г