

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук

заведующего кафедрой фармакологии

государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Прошина Сергея Николаевича на диссертационную работу

Безнина Глеба Владимировича на тему:

«Структурно-функциональные основы нарушений поведения на модели посттравматического стрессового расстройства у крыс», представленную на

соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

по специальностям 03.03.01 – физиология;

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность научного исследования очевидна, поскольку данная диссертационная работа посвящена проблеме изучения механизмов формирования психической травмы и посттравматических стрессовых расстройств (ПТСР) и поиску эффективных фармакологических средств, использование которых позволило бы корригировать уже сформированную патологию. ПТСР – это непсихотическая отсроченная реакция на травматический стресс: природные и техногенные катастрофы, боевые действия, утрата близких и т.д. В связи с этим ПТСР может вызвать психические отклонения практически у любого человека. Для ПТСР характерны длительно сохраняющиеся психологические и социальные последствия. В основе вызванных психической травмой поведенческих и эмоциональных расстройств (посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР)) может лежать нарушение структурной целостности и репаративных возможностей мозга, обусловленное дисбалансом активности нейромедиаторных систем. При этом расстройстве нарушается работа транспортеров дофамина в нейронах головного мозга. Сходство этиологических факторов, способных

привести к формированию ПТСР и других заболеваний, имеющих в своём составе депрессивный синдром, также указывает на возможную общность механизмов их развития. Одним из важных звеньев патогенеза ПТСР, также как большой депрессии и других аффективных расстройств, является нарушение метаболизма серотонина в ЦНС. В связи с этим одной из важнейших задач современной экспериментальной и клинической фармакологии является поиск, разработка и внедрение новых лекарственных средств, корригирующих нарушение когнитивной сферы и предотвращающих формирование структурно-функциональных нарушений в головном мозге при воздействии травматического стресса. С целью купирования симптомов, наблюдающихся у человека при ПТСР, используют антидепрессанты. Однако механизмы формирования ПТСР и депрессивных отклонений после переживания психотравмирующего опыта остаются недостаточно изученными. При этом антидепрессанты используются не столько для терапии ПТСР, сколько для лечения коморбидной симптоматики. Поэтому поиск новых препаратов из других фармакологических групп, обладающих более высокой активностью и, при этом, отсутствием побочного действия является важнейшей задачей экспериментальной и клинической фармакологии. Это и определяет безусловную актуальность диссертационной работы Безнина Г.В.

Задачи исследования корректно представляют условия, на которых раскрыта цель диссертационной работы, а выводы логично отражают выполнение поставленных задач исследования.

Структура диссертации. Диссертация построена по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, объекты, материалы и методы исследования, главу результатов собственных исследований, которая состоит из трёх логически выстроенных подразделов, обсуждение, заключение, выводы и список литературы, содержащий 298 научных источников, 79 из которых отечественных и 219 иностранных. Материалы иллюстрированы 23 рисунками и 12 таблицами.

Достоверность и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Диссертационная работа Безнина Г.В. выполнена с использованием достаточного количества материала. Используются современные методы оценки поведения и структурно-

функциональных изменений в головном мозге животных при воздействии психотравмирующего фактора, которым является переживание ситуации угрозы жизни. Охарактеризован механизм действия агониста дофаминовых рецепторов прибибидила в коррекции поведенческих отклонений и предотвращения структурных изменений в головном мозге крыс. Проведён глубокий анализ проделанной работы по раскрытию механизмов, обуславливающих формирование ПТСР, после воздействия витального стресса, индуцированного гибелью партнёра.

Статистический анализ полученных экспериментальных данных проводили с использованием программного обеспечения SPSS 11.5 и Microsoft Office Excel 2010. Достоверность результатов оценивали с помощью общепринятых статистических методов: параметрического (t-критерия Стьюдента) и непараметрического (U-теста Манна-Уитни). Проверка статистических гипотез осуществлялась на уровне значимости 0,05.

Научная новизна работы состоит в том, что впервые в эксперименте на крысах обосновано научное положение, что однократный витальный стресс, вызванный обстоятельствами гибели сородича от действий хищника. На модели ПТСР у крыс, вызванной переживанием обстоятельств смерти партнёра и угрозе собственной жизни, впервые продемонстрировано формирование длительно сохраняющихся и не исчезающих спонтанно структурно-функциональных нарушений в головном мозге. Охарактеризованы морфологические и иммуногистохимические изменения в ЦНС при ПТСР у животных: гибель нейральных клеток в СА1, СА2 и СА3 областях гиппокампа, супраоптическом ядре гипоталамуса, коре больших полушарий, подавление нейрогенеза в зубчатой фации гиппокампа и субвентрикулярной зоне стенки боковых желудочков. Выявлен ранее не описанный феномен асимметричности в повреждении нейральных клеток гиппокампа. Впервые зарегистрирован феномен исчезновения иммуногистохимической реакции на ядерный белок нейральных клеток NeuN в гиппокампе и коре головного мозга после травматического стресса. Выявлены различия в структурно-функциональных нарушениях в мозге между 9 и 25 сутками после перенесения животными психогенной травмы. Впервые продемонстрирован коррегирующий механизм действия агониста дофаминовых рецепторов прибибидила на расстройство когнитивной сферы в модели ПТСР, включающий

нейропротективный эффект изучаемого фармакологического препарата в отношении структурных нарушений головного мозга крыс при травматическом стрессе.

Научно-практическая значимость. На основании иммуногистохимического исследования апробированы новые критерии оценки структурных и функциональных нарушений в головном мозге животных в модели травматического стресса. Результаты диссертационного исследования могут быть предложены в клинику при разработке методов фармакологической коррекции и ведения больных с ПТСР и депрессивными отклонениями. Основные результаты исследования внедрены в учебный процесс различных кафедр Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ для преподавания медицинских, медико-биологических и психологических дисциплин, в Санкт-Петербургском государственном педиатрическом университете МЗ РФ, Санкт-Петербургском институте психологии и акмеологии, Санкт-Петербургском университете МВД РФ, Санкт-Петербургском институте внутренних войск МВД РФ, используются в научной работе Научно-исследовательского института экспериментальной медицины СЗО РАМН, а также при подготовке информационно-методической литературы

Выводы диссертации, сформулированные на основе анализа полученных данных, правомерны, логичны и корректны и отвечают поставленным задачам.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ, из них 5 в журналах, рекомендуемых ВАК. Материалы диссертации широко представлены на конгрессах, школах-конференциях, съездах в том числе международных.

Общая характеристика работы. Во введении обоснована актуальность выбранной темы, с указанием смежных работ последних лет.

Глава 1 посвящена обзору литературы, выстроенному из 10 подразделов, изложенных на 38-и листах. Глава содержит современные представления о понятии «стресс». Раскрывает понятия травматического стресса и психической травмы. В подразделе 1.2. соискатель даёт определение посттравматического стрессового расстройства (ПТСР), его патогенез, клиническую манифестацию, долговременные психологические и социальные последствия. В подразделе 1.3. характеризует

нарушение принципа регуляции отрицательной обратной связи в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковом тракте, как основу для функциональных нарушений в ЦНС при стрессовых расстройствах, аффективной патологии и депрессии. В подразделе 1.4. приводятся примеры структурных изменений головного мозга при ПТСР и депрессиях, что логично продолжает подраздел 1.3. В последующих подразделах (1.4.-1.10) соискатель раскрывает механизмы развития структурных и функциональных нарушений при ПТСР, медиаторные концепции таких нарушений, проблемы моделирования данных патологий и современные морфологические подходы для исследований нарушений, возникающих как результат травматического стресса.

Обзор написан грамотно как в литературном, так и в научном смыслах. Информация подаётся конкретно в привязке к теме диссертации и в доступной форме.

В главе «Объекты, материалы и методы» описана модель витального стресса. Валидные методики регистрации и оценки поведения животных и современные иммуногистохимические подходы для оценки структурных изменений в головном мозге экспериментальных животных в используемой модели позволяют обеспечить получение достоверных данных. Полученные в ходе исследования результаты получили адекватную статистическую обработку.

Результаты собственных наблюдений представлены подробно, в соответствии с планом работы. Глава 3 состоит из трёх подразделов. Таблицы и рисунки читаются легко, каждую таблицу и рисунок сопровождает дополнительная информация в виде примечания. Результаты гистохимических и иммуногистохимических исследований сопровождаются иллюстрацией в виде микрофотографий, отцифрованных в цветном формате с разрешением высоко качества. В главе 3 отражено влияние психогенной травмы (переживание гибели сородича от действий хищника) на поведение крыс и структурные изменения головного мозга в краткосрочном и в отдалённом периоде, а также на фоне введения препарата пирибедил. При моделировании психогенной травмы крысам представлялась полная возможность избежать нахождения в травматической ситуации и покинуть террариум. Однако подавляющее большинство животных не справлялось с решением этой задачи. Автор подробно характеризует изменения изучаемых физиологических показателей, морфологических признаков и

иммуногистохимических маркеров у животных опытной группы в сравнении с животными контроля, а также на фоне введения препарата пирибедил. В ранние сроки эксперимента физиологические тесты убедительно показывают значимое снижение исследовательской активности и повышение уровня тревожности у животных, подвергшихся витальному стрессу в сравнении с животными, у которых не было опыта переживания гибели сородича от действий хищника. На препаратах мозга крыс, фиксированного через 9 суток после воздействия витального стресса обнаруживали многочисленные диффузно расположенные гиперхромные и сморщенные нейральные клетки и прежде всего в подкорковых структурах – гиппокампе и супраоптическом ядре (СОЯ) гипоталамуса. При этом наибольшие повреждения зарегистрированы в популяции клеток поля СА3. Реакция нейральных структур при окраске по Нислю полностью соответствовала иммуногистохимической реакции на конститутивный белок ядра нейронов (NeuN). Снижение или полное отсутствие иммуногистохимической реакции на белок NeuN в нейральных клетках коры больших полушарий носило ассиметричный характер: большая выраженность данного повреждения была характерна для левого полушария мозга. На препаратах контрольных животных таких изменений не регистрировали. Нейрогенез, оцененный с использованием иммуногистохимической реакции на ядерный антиген клеточной пролиферации (PCNA), был значимо снижен, а у отдельных особей полностью подавлен, в гиппокампе и субвентрикулярной пролиферативной зоне латеральной стенки боковых желудочков мозга (СВЗ) крыс, подвергшихся витальному стрессу. При регистрации пролиферирующих клеток отмечали их расположение единично, а не кластерами, как это было выявлено в норме. В гиппокампе и СВЗ контрольных животных нейрогенез был не изменён. На позднем сроке после воздействия острого витального стресса у травмированных животных по сравнению с интактными крысами регистрировали существенное ослабление нормальной коммуникативности, большую длительность состояния иммобильности и более низкий по длительности уровень пассивного плавания. Таким образом, у крыс после психогенной травмы на длительных сроках также сохранялись признаки депрессивности, что свидетельствует о развитии у таких животных устойчивого постстрессового состояния. В отдалённые сроки структурные изменения головного

мозга у травмированных крыс характеризовались тем, что практически все нейросекреторные клетки СОЯ гипоталамуса были гиперхромными или повреждёнными. Наибольшее скопление повреждённых клеток было характерно для поля СА3. При подсчёте частоты поврежденных нейронов в гиппокампе отмечалась асимметричность повреждения – она была характерна для левого полушария мозга. При проведении иммуноцитохимической реакции на NeuN у крыс, подвергнутых воздействию витального стресса, в отличие от контрольных животных, выявляли области снижения интенсивности реакции на данный белок в гиппокампе и коре больших полушарий мозга. Регистрировали существенное ослабление иммуногистохимической реакции на NeuN в тех участках областей коры больших полушарий, на которые проецировались соответствующие им пучки мозолистого тела. Описанное структурное нарушение во всех исследованных областях имело асимметричное распределение – преобладало повреждение структур левого полушария. У животных после психогенной травмы нейрогенез в гиппокампе, особенно в зубчатой извилине, был почти полностью подавлен. Интенсивность пролиферации в СВЗ характеризовалась как ослабленная. Кроме того, регистрировали клетки позитивные на ядерный антиген клеточной пролиферации в областях не характерных для локализации пролиферирующих клеток у интактных животных: таламус, гипоталамус стриатум. Нарушения в структурах головного мозга, выявленные на позднем сроке после психогенной травмы, имели более выраженный характер, чем регистрировавшиеся в раннем периоде. Оценка структурных изменений в головном мозге крыс, однократно подвергавшихся действию острого витального стресса и получавших в постстрессовый период пирибедил, показала, что частота повреждённых клеток в гиппокампе у таких животных была ниже, чем в экспериментальной группе без коррекции, но выше по сравнению с интактными. Локальные выпадения пирамидных нейронов в гиппокампе у животных на фоне получения пирибедила была также ниже по сравнению с травмированными крысами не получавшими коррекцию. Нейропротективного эффекта в отношении структурных нарушений в СОЯ гипоталамуса у животных после психогенной травмы на фоне получения препарата зарегистрировано не было. По морфологическим и иммуногистохимическим характеристикам клетки, выявленные с помощью

реакции на белок ядра нейронов, у животных из группы коррекции были близки к интактным. Нейрогенез в гиппокампе и СВЗ у животных, получавших препарат, был менее подавлен по сравнению с крысами, пережившими витальный стресс, но не получавших пирибедил. В нехарактерных для локализации пролиферирующих клеток областях головного мозга у крыс, получавших после психогенной травмы дофаминиметик, в отличие от травмированных животных, не получавших пирибедил, клетки, позитивные в иммуногистохимической реакции на ядерный антиген пролиферации клеток (PCNA) не регистрировались.

В целом материал подан в открытой для анализа форме. В конце всех разделов имеются подытоживающие абзацы, в которых расставлены необходимые акценты.

Обсуждение результатов и заключение представлено на 14-ти листах, с использованием литературных источников по данной тематике.

Выводы соответствуют цели и задачам работы и подробно характеризуют основные полученные результаты диссертационного исследования.

Замечания. Диссертация, в целом, оценивается положительно. Принципиальных замечаний нет. Но следует отметить, что нумерация рисунков начинается с цифры 2 (рис. 2.1. на стр. 57). В подписях к рисункам, где представлено гистологическое исследование головного мозга, указано, что: «Иммуноцитохимическая реакция на» и т.д. Представляется, что, если автор проводит окрашивание с соответствующими антителами гистологических срезов, то речь идёт об иммуногистохимической реакции. Высказанные соискателю замечания скорее носят редакционный характер – эти замечания не снижают высокой теоретической и практической значимости данного исследования.

Вопросы.

1. Почему выбраны временные интервалы в 9 и 25 дней, а не в 9 и 40 дней?
2. По какому критерию животных, переживших гибель сородича от действий хищника, отбирали для оценки структурных изменений головного мозга?


3. Почему не проводилось сравнительное изучение с областью голубого пятна, которая, как к настоящему времени уже известно, активно реагирует на стрессовые воздействия изменением баланса нейромедиаторов, а, следовательно, может отреагировать и структурно-функциональными изменениями?
4. Ядерный антиген клеточной пролиферации может активно участвовать в пролиферативных процессах, но в покоящейся клетке может принимать участие в процессах репарации. Возможно, что появление клеток, позитивных в иммуногистохимической реакции по этому антигену в структурах мозга, для которых присутствие пролиферирующих клеток не характерно, объясняется появлением в этих структурах мозга клеток в стадии репарации, а не пролиферации?
5. Ослабление или подавление нейрогенеза у крыс после психогенной травмы также имело ассиметричный характер, как и ассиметричное распределение структурных нарушений?
6. Чем объяснить, что на ранних сроках после витального стресса у крыс наибольшая плотность расположения гиперхромных и сморщенных клеток была характерна для поля СА3, а наиболее выраженное ослабление иммуногистохимической реакции на NeuN регистрировалось в поле СА2?
7. На поздних сроках после воздействия витального стресса наблюдали отчетливое ослабление иммуногистохимической реакции на NeuN в тех участках областей коры больших полушарий, на которые проецировались соответствующие им участки мозолистого тела. На ранних сроках после психогенной травмы значимое ослабление иммуногистохимической реакции на NeuN было также характерно для более глубоких зон коры?

Заключение. Диссертационная работа Безнина Глеба Владимировича «Структурно-функциональные основы нарушений поведения на модели посттравматического стрессового расстройства у крыс» по актуальности темы, объему исследований, методической обоснованности, научной новизне, значимости полученных результатов и сделанных на их основе выводов является

завершенным научным квалификационным исследованием, выполненным под руководством доктора медицинских наук, профессора Цикунова Сергея Георгиевича и доктора медицинских наук Коржевского Дмитрия Эдуардовича, в котором решена актуальная научная задача по выявлению при воздействии витального стресса структурно-функциональных изменений в головном мозге, которые не исчезают спонтанно, и обнаружению дофаминергических механизмов, предотвращающих формирование структурных нарушений в головном мозге.

Диссертационная работа полностью соответствует требованиям п.7 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013г. №842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а соискатель заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 03.03.01 – «Физиология» 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология»

Заведующий кафедрой фармакологии государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
доктор медицинских наук

 С.Н. Прошин

194100 Санкт-Петербург

ул. Литовская, 2

E-mail: spb@gpma.ru

Тел.: 4165259



Подпись _____
Достоверяется _____
Помощник ректора _____
«03» _____ 2014 г.

Прошина С. Н.

А. Водрова С. А.