

ВІДГУК

офіційного опонента – доктора медичних наук, професора,
завідувача кафедри патологічної анатомії і судової медицини Запорізького
державного медичного університету

Тертишного Сергія Ігоровича

на дисертаційну роботу Кихтенко Олени Валеріївни

«Патологічна анатомія гемато-енцефалічного бар'єру при гіпоксичному
стресі в перинатальному періоді».

подану до захисту в спеціалізовану вчену раду Д 64.600.03 при Харківському
національному медичному університеті на здобуття наукового ступеня
доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.02 – патологічна анатомія.

Актуальність обраної теми

Гіпоксичне ураження головного мозку, що відбувається у період його розвитку представляє серйозну медичну та соціальну проблему нашого часу. Перинатальна травма головного мозку є однією з основних причин смерті у новонароджених дітей, а також однією з провідних причин інвалідності протягом усього життя, включаючи церебральний параліч, сенсорні порушення, судорожні і когнітивні розлади. Незважаючи на істотні успіхи і досягнення сучасної репродуктивної медицини, акушерства, інтенсивної терапії новонароджених ця проблема не перестає бути актуальною. Достатньо привести невтішну статистику: у світовій практиці гіпоксично-ішемічна енцефалопатія в період новонародженості виставляється, як діагноз в 1.8 - 25 на 1000 новонароджених. Поряд з цим за десятирічний період рівень загальної інвалідності дітей збільшився на 78%. Відомо, що до 70% причин дитячої інвалідності обумовлені перинатальними факторами. Серед них п'яте місце, за даними ВООЗ, займає асфіксія новонароджених і згідно з даними світової статистики вона є причиною 23% всіх випадків смерті новонароджених.

Треба відзначити, що в даний час вивчаючи проблему перинатальної гіпоксії все більше уваги приділяється стану та особливостям адаптаційно-компенсаторних механізмів, що відбуваються в головному мозку. Серед цих процесів важливе місце належить становленню і функціонуванню механізмів гомеостазу і в першу чергу бар'єрних механізмів. У цьому руслі важливим є вивчення структурних і функціональних порушень гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ).

Відомо, що ефекти гіпоксії-ішемії ведуть до підвищення проникності гематоенцефалічного бар'єру. Однак важко в повній мірі проаналізувати великий обсяг інформації про можливі механізми, які впливають на порушення гематоенцефалічного бар'єр в мозку новонародженого. Ці порушення можуть бути пов'язані як з незрілістю основних структурних компонентів ГЕБ у недоношених дітей, а також з розвитком при гіпоксії ексайтотоксичності, виснаження енергетичних запасів і утворення вільних радикалів, що може призводити до наростаючих дистрофічних змін, селективної загибелі і руйнуванню основних складових компонентів ГЕБ - ендотеліоцитів, перицитів, базальних мембран. Морфологічні основи таких змін в перинатальному періоді залишаються маловивченими і становлять предмет даного дослідження.

Вивчаючи фундаментальні морфо-функціональні аспекти перинатальної гіпоксії і зокрема структурні зміни ГЕБ, не можна обійти стороною стан нейро-ендокринної системи, яка забезпечує певний рівень адаптації до гіпоксичного впливу.

Важливу роль у розвитку структурних змін ЦНС при гіпоксичному стресі відіграють гіпофізарна система і епіфіз, які беруть участь в тонкій регуляції майже всіх видів обміну речовин. Епіфіз мозку та адренкортикотропоцити аденогіпофіза можуть бути «сигнальними» структурами, морфофункціональний стан яких свідчить про рівень адаптації або наявність дезадаптації організму. Однак структурні зміни цих систем при

перинатальній гіпоксії, в належній мірі, практично не відображені у вітчизняних і зарубіжних дослідженнях.

Враховуючи вищезазначене можна зробити висновок, що поглиблене комплексне дослідження проблеми структурно-функціональних особливостей гемато-енцефалічного бар'єру у взаємовідношенні зі станом нейроендокринної системи при гіпоксичному стресі в перинатальному періоді є безумовно актуальним та перспективним.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій.

Метою дисертаційного дослідження було виявлення патологоанатомічних змін у компонентах гемато-енцефалічного бар'єру плодів та новонароджених, що перенесли в перинатальному періоді гіпоксичний стрес. В якості «маркера» еустресу та дістресу досліджували морфофункціональний стан епіфізу мозку та адренкортикотропоцитів гіпофізу. Встановлені завдання відображають у повному обсязі предмет дослідження для досягнення обраної мети.

Для цього автор вивчила спочатку архівний матеріал. Було досліджено та проаналізовано дані з протоколів розтинів 834-х випадків перинатальної загибелі плодів та новонароджених від гіпоксичного ураження.

В рамках морфологічного дослідження було вивчено 94 випадки аутопсії антенатально загиблих плодів внаслідок дії перинатальної гіпоксії та 89 випадків загибелі новонароджених протягом першого місяця постнатального онтогенезу від тяжкої летальної гіпоксично-ішемічної енцефалопатії. Також досліджено матеріал від 123-х експериментальних тварин (щурят), яким моделювалась перинатальна гіпоксія різного ступеню тяжкості.

Для вивчення патологоанатомічних особливостей досліджуваних структур використовували як традиційні, так і спеціальні морфологічні методики (забарвлення за Ніслем, Кахалем, Фельгеном-Росенбеком, Браше, Гоморі, Малорі). Для постановки імуногістохімічних реакцій із

пероксидажною візуалізацією в якості первинних антитіл було використано спектр МКАТ, що включав маркери до GFAP (клон GA-5, LabVision), VEGF (клон VG1), Ki-67 (Ab-4, LabVision), caspase-3 (клон CPP32, LabVision), фактор Вілебрандта (Cell Marque, USA). Імуноморфологічне дослідження із люмінісцентною візуалізацією виконано з використанням кролячих сироваток (моноклональних антитіл (МКА)) до колагенів (I, III и IV) (виробник Serotec, UK), до клітин-індукторів апоптозу с МКА CD₉₅ та до ендотеліну-1 (Novocastra LaboratoriesLtd.,UK). В роботі також використано електронно-мікроскопічні методики.

Отримані результати статистично оброблені за допомогою методів варіаційного, альтернативного та кореляційного аналізу.

Роботу відрізняє чітко спланований алгоритм експериментальних і аутопсійних досліджень. Робота апробована на різному рівні, що є підсумком тривалого вивчення і особистого внеску автора в розробку теми.

Таким чином сучасний методичний рівень дисертаційної роботи, висока інформативність застосованих методів морфологічного аналізу та адекватність статистичної обробки отриманих результатів дозволяють вважати результати роботи, наукові положення, висновки і рекомендації достовірними і науково-обґрунтованими.

Наукова новизна одержаних результатів.

Дисертація безперечно характеризується новизною отриманих результатів. В результаті проведеного комплексного морфологічного дослідження автором вперше встановлені закономірності ембріо-фетогенезу гемато-енцефалічного бар'єру плодів та новонароджених, що виношені в умовах фізіологічної вагітності, а також в умовах хронічної внутрішньоутробної гіпоксії.

Вперше доповнено наукові дані про те, що тяжка хронічна внутрішньоутробна гіпоксія призводить до затримки диференціювання гліального апарату головного мозку, до гальмування збільшення відносного

обсягу мікроциркуляторного русла, до ушкодження капілярної стінки у вигляді потовщення базальних мембран і склерозу, а також до ушкодження ендотелію капілярів з вогнищевою деендотелізацією і надлишковою продукцією ендотеліну, до проліферації перицитів.

В динаміці розвитку гіпоксії легкого та середнього ступеня тяжкості виявлено, що пошкоджені компоненти гемато-енцефалічного бар'єру регенерують (часом надмірно), що зумовлює компенсацію їх функції за рахунок проліферації глії, ендотелію і перицитів.

Автором істотно уточнені патоморфологічні зміни, що виникають у компонентах гемато-енцефалічного бар'єру, при впливі гострої анте-інтранатальної асфіксії й динаміка цих змін у гострому та ранньому відновлювальному періодах гіпоксично-ішемічної енцефалопатії.

Встановлено ступінь виразності й характер клітинної загибелі макрогліоцитів, установлені фази та стадії зміни наповнення мозкового кровотока, а саме - судин мікроциркуляторного русла: виявлено патологічні зміни, що виникають у капілярній стінці - у базальних мембранах, ендотеліоцитах, перицитах.

Автором вперше, за допомогою кореляційного аналізу, були зіставлені патоморфологічні зміни у компонентах гемато-енцефалічного бар'єру з показниками морфофункціонального стану епіфізу мозку та адренкортикотропоцитів гіпофізу. Виявлені кореляційні зв'язки дозволили сформувати концепцію незворотного пошкодження компонентів гемато-енцефалічного бар'єру з летальним результатом як зриву компенсаторно-адаптаційних процесів організму – з одного боку, та з оборотним пошкодженням компонентів гемато-енцефалічного бар'єру зі сприятливим наслідком і успішною адаптацією – з іншого.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів.

Виявлено зміни та закономірності, а також нові можливі патогенетичні ланки механізмів розвитку порушень функціонування центральної нервової системи у індивідуумів, які піддалися впливу гіпоксії в перинатальному періоді. Встановлені кореляційні зв'язки між показниками ушкодження компонентів гемато-енцефалічного бар'єру та морфофункціональним станом пінеалоцитів епіфізу мозку та адренкортикотропоцитів гіпофізу дозволяють вважати, що дані ендокринні структури приймають найбезпосереднішу участь у формуванні та становленні адаптаційних механізмів у випадку ішемії мозку, а їх вичерпаність призводить до летального наслідку.

Було виявлено морфологічні особливості ушкодження та динаміка змін фаз адаптації, компенсації та декомпенсації в структурах, що складають гемато-енцефалічний бар'єр та які корелюють із морфофункціональним станом епіфізу мозку та адренкортикотропоцитами гіпофізу.

Результати роботи мають вагоме значення, так як дозволяють створити теоретичну базу для розробки та впровадження нових методів гормональної замісної терапії для контингенту хворих дітей з перинатальним гіпоксичним ураженням центральної нервової системи.

Результати проведених досліджень впроваджені в навчальний процес на кафедрі патологічної анатомії Харківського національного медичного університету, а також у навчальний та науковий процеси кафедри госпітальної педіатрії та неонатології №1 Харківського національного медичного університету, кафедри патоморфології з курсами судової медицини, гістології, цитології та ембріології медичного факультету Сумського державного університету, кафедри патологічної анатомії, судової медицини та медичного законодавства Луганського державного медичного університету; в наукову роботу центральної науково-дослідної лабораторії Донецького національного медичного університету; в роботу патологоанатомічних відділень КЗОЗ «Харківський міський перинатальний

центр», КЗОЗ «Обласна дитяча клінічна лікарня», КЗОЗ «Обласна клінічна лікарня – Центр екстреної медичної допомоги та медицини катастроф», КЗОЗ «Харківська міська клінічна лікарня швидкої та невідкладної допомоги ім. проф. О.І. Мещанінова», КЗОЗ «Обласна дитяча клінічна лікарня», КЗОЗ «Харківська міська багатопрофільна лікарня №18», КЗОЗ «Ізюмська центральна міська лікарня», Вінницького обласного патологоанатомічного бюро та Тернопільського обласного патологоанатомічного бюро.

Повнота викладу матеріалу дисертації в опублікованих працях і авторефераті.

Результати, отримані в ході дослідження широко представлені у власних публікаціях. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 23 статті (у тому числі 12 одноосібних), з яких 20 статей представлені в наукових фахових виданнях України, 2 статті – у закордонних наукових виданнях: опубліковано 14 тез у матеріалах Всеукраїнських та міжнародних науково-практичних конференцій; отримано 6 деклараційних патентів на корисну модель.

Автореферат за своєю структурою відповідає встановленим вимогам щодо докторських дисертацій. Його зміст повністю відображує усі основні положення, висновки та практичні рекомендації, що викладені у дисертації.

Структура і зміст дисертації.

Матеріали дисертації викладено державною мовою на 440 сторінках машинописного тексту. Дисертація побудована за загальноприйнятою схемою з елементами монографічного стилю написання. Дисертація викладена державною мовою, містить анотацію, вступ, перелік умовних позначень, основну частину, висновки, практичні рекомендації, список використаних джерел, додатки. Робота ілюстрована за допомогою 103-х таблиць та 104-х рисунків, в тому числі за допомогою 94 мікрофотографій.

Анотація дисертації подана двома мовами, зі списком публікацій здобувача, що віддзеркалюють основні результати дослідження та засвідчують апробацію отриманих матеріалів. Ключові слова відповідають основному змісту наукової праці та відображають тематику дослідження.

У «Вступі», дисертант обґрунтовує актуальність обраної теми дисертації, формулює мету і завдання дослідження, наукову новизну і практичну значимість роботи, висвітлює сутності наукової проблеми.

Розділ 1. «Огляд літератури» викладено на 23 сторінках машинописного тексту. В даному розділі автор послідовно аналізує літературні дані, починаючи з питань нормальної ембріології, гістології, анатомії та фізіології гемато-енцефалічного бар'єру головного мозку та ролі нейроендокринної та ендокринної систем у регуляції гомеостазу головного мозку. Також аналізуються літературні дані, що стосуються питань патогенезу і взаємовідносин нейроендокринної і ендокринної систем та гемато-енцефалічного бар'єру у випадку гіпоксичних станів.

Розділ 2. «Матеріал та методи досліджень» відображає загальну характеристику предмету та об'єкту досліджень, а також включає стислий опис використаних матеріалів та методів дослідження. Використані методи дослідження сучасні, достатньо інформативні та адекватні меті, дозволяють у повному обсязі реалізувати конкретні завдання, поставлені в роботі.

Розділ 3 присвячен аналізу клінічних даних, які були отримані в ході вивчення архівного матеріалу (протоколи розтинів загиблих від впливу перинатальної гіпоксії плодів та новонароджених, історії пологів та історії хворіб їх матерів). Окремо аналізуються та узагальнюються клінічні дані про плодів та новонароджених, що загинули внаслідок гострої анте-, інтра-, та постнатальної асфіксії (підрозділ 3.1) та окремо– клінічні дані про плодів та новонароджених, що загинули внаслідок гострої анте-, інтра-, та постнатальної асфіксії, та були виношені в умовах хронічної внутрішньоутробної гіпоксії (підрозділ 3.2).

В розділах 4 та 5 надано дані, які отримані в ході дослідження компонентів гемато-енцефалічного бар'єру, епіфіза мозку та аденокортикотропоцитів гіпофіза у плодів, що загинули антенатально або інтранатально внаслідок асфіксії та були виношені в умовах фізіологічного перебігу вагітності (розділ 4) та в умовах хронічної внутрішньоутробної гіпоксії (розділ 5).

В розділ 6,7 викладено данні морфологічного дослідження гемато-енцефалічного бар'єру, епіфіза мозку та аденокортикотропоцитів гіпофізу новонароджених, що загинули на ранніх етапах постнатального онтогенезу від гіпоксично-ішемічної енцефалопатії та були виношені в умовах фізіологічного перебігу вагітності (розділ 6) або в умовах хронічної внутрішньоутробної гіпоксії (розділ 7).

Розділ 8 присвячено експериментальному дослідженню. Експеримент було проведено на щурятах, яким моделювалась перинатальна гіпоксія різного ступеню важкості – легка та сублетальна. Досліджено компоненти гемато-енцефалічного бар'єру, епіфіз мозку та аденокортикотропоцити гіпофізу з використанням широкого спектру сучасних імуногістохімічних методик.

В розділі 9 викладено дані електронно-мікроскопічного дослідження компонентів гемато-енцефалічного бар'єру при дії летальної перинатальної гіпоксії (матеріал аутопсій) та сублетальної (експериментальний матеріал).

Позитивною характеристикою рецензованої дисертації є чітка структура, логічна послідовність викладення матеріалу та переконлива аргументація.

Підсумовує проведені дослідження розділ 10 «Обговорення отриманих результатів», який ґрунтується на співставленні результатів власних досліджень із літературними даними. Цей розділ повністю відображає положення які сформульовані та обґрунтовані автором. Аналізуючи та узагальнюючи результати власних досліджень дисертант проілюстрував їх таблицями та діаграмами.

Висновки закономірно впливають з аналізу і узагальнення результатів дослідження та повністю відповідають положенням, що були сформульовані в меті та завданнях дослідження.

Список літератури складається з сучасних наукових джерел і містить 406 найменувань (обсягом 44 сторінки), з яких 237 – кирилицею, 169 – латиницею.

У додатках автором приведено список публікацій за темою дисертації. відомості про її апробацію, та спостереження випадків аутопсій плодів та новонароджених, які демонструють дані, наведені у розділах 4,5,6,7.

Зауваження та побажання до дисертації та автореферату щодо їх змісту й оформлення.

Оцінюючи дисертаційну роботу та автореферат Кихтенко О.В. в цілому позитивно, слід відмітити ряд недоліків:

- зустрічаються поодинокі невідповідності посилань в тексті на деякі рисунки: рис.5.1; рис.5.4.
- абсолютну кількість клітин, автор чому то подає в тексті у екземплярах:
- частину кількісних морфометричних показників для більшої наочності можна було б дати в вигляді діаграм.
- відмічаються деякі орфографічні помилки: ”замінного“ замість ”замісного“ (стор. 333)
- деякі мікрофотографії недостатньо інформативні: рис. 4.6, 6.2, 7.7, 7.17.
- в розділі «Обговорення отриманих результатів» немає необхідності знову давати таблиці з кількісними показниками.

Хотілось би почути думку автора про наступне:

1. Чи спостерігалась відмінність в архітектоніці кори мозку у плодів які були виношені при фізіологічній вагітності та померли від асфіксії і плодів які були виношені в умовах хронічної внутрішньоутробної гіпоксії і також померли від асфіксії?

2. Які механізми виникнення значного відсотку (75% за даними автора) лептоменінгіальних крововиливів в ранні терміни гестації (в 16-20 тижнів)?
3. По ходу дослідження неодноразово описується наявність тромбів в судинах головного мозку. Які фактори ініціюють тромбоутворення при перинатальній гіпоксії і яку роль в цьому відіграє порушення структур гематоенцефалічного бар'єру?
4. При гострій постнатальній гіпоксії і при її поєднанні з хронічною внутрішньоутробною гіпоксією значно посилюється ангиогенез за даними експресії фактору росту ендотелію (VEGF), однак це не забезпечує сприятливі наслідки перинатальної гіпоксії. Чому?

Питання стосуються складних дискусійних проблем, не впливають на загальний високий науковий рівень дисертації й не піддають сумніву результати, отримані автором.

Рекомендації щодо використання результатів дисертації в практиці.

На основі результатів даного дослідження була сформована концепція розвитку летальних перинатальних гіпоксичних уражень як зриву компенсаторних механізмів в головному мозку. Становлення механізмів адаптації мають гормональну регуляцію, що показано на прикладі епіфізу мозку й адренкортикотропоцитів гіпофізу. Таким чином надане теоретичне обґрунтування для розроблення нових можливих методів профілактики, лікування та реабілітації новонароджених з перинатальним гіпоксичним ураженням на основі гормональної замісної терапії.

В ході роботи показано, що нащадки, які перенесли легку нелетальну перинатальну гіпоксію та вижили, мають структурні особливості порушення в компонентах, що складають гемато-енцефалічний бар'єр, та в таких важливих стрес-організуючих ендокринних утворюваннях, як епіфіз мозку та

адренкортикотропоцити гіпофізу. Тому діти, що мають в анамнезі перенесене гіпоксичне ураження легкого ступеню важкості, потребують особливої уваги з боку педіатрів, дитячих невропатологів, ендокринологів.

Пріоритетність досліджень підтверджена 6-ма отриманими корисними моделями. На основі даного дослідження було розроблено та запатентовано метод визначення ступеню тяжкості хронічної внутрішньоутробної гіпоксії (впровадження цього методу до роботи практичних установ охорони здоров'я дозволить лікарям - неонатологам, педіатрам, патологоанатомам, на основі оцінки антропометричних параметрів плоду та новонародженого ретроспективно оцінювати ступінь тяжкості та тривалість впливу такого шкідливого фактору, як хронічна внутрішньоутробна гіпоксія); метод оцінювання ступеню виразності апоптозу на препаратах, забарвлених за Ейнарсоном (впровадження даного методу до роботи патологоанатомічних відділень дозволить у значній мірі скоротити як матеріальні, так і часові витрати, під час дослідження процесів масової клітинної загибелі у тканинах); метод кількісної оцінки вмісту різноманітних антигенів у біологічних тканинах при використанні імуногістохімічних методів дослідження із подальшою люмінісцентною мікроскопією (впровадження даної методики до практичної роботи патологоанатомічних відділень дозволить вивчати і отримувати точніші та об'єктивніші дані про кількісний вміст тих або інших антигенів у тканинах біологічних зразків).

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Кихтенко О. В. «Патологічна анатомія гемато-енцефалічного бар'єру при гіпоксичному стресі в перинатальному періоді» на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук відповідає спеціальності 14.03.02 – патологічна анатомія. Робота є самостійним закінченим науковим дослідженням, в якому отримано нові наукові обґрунтовані дані, які мають істотне теоретичне та практичне значення для медицини і в сукупності вирішують важливу наукову проблему.

Таким чином, вважаю, що робота відповідає встановленим вимогам пункту 10 “Порядку присудження наукових ступенів”, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 року (із змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 року та № 1159 від 30.12.2015 року) щодо докторських дисертацій, а сам здобувач заслуговує присудження наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю “14.03.02 – патологічна анатомія”.

Офіційний опонент:

Завідувач кафедри патологічної
анатомії і судової медицини

Запорізького державного
медичного університету,

доктор медичних наук, професор



С.І. Тертишний
Власноручний підпис С.І. Тертишний
ПІДТВЕРДЖУЮ
Нач. відділу кадрів Запорізького
державного медичного університету
«___» _____ 20__ р. Підпис *Тертишний*

Рудукалова Т.М.