

ОТЗЫВ

**официального оппонента Баклаужева Владимира Павловича на
диссертационную работу Шевченко Романа Васильевича
«Транстравматическая эпидуральная электростимуляция спинного мозга в
сочетании с двигательной тренировкой в модели на мини-свиньях»,
представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук
по специальности 3.3.3. Патологическая физиология в диссертационный
совет 21.2.012.02 при ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России**

Актуальность темы диссертационного исследования

Травматическое повреждение спинного мозга традиционно относится к числу наиболее тяжелых и прогностически неблагоприятных состояний в неврологии и нейрохирургии. Частота травмы спинного мозга (ТСМ) составляет около 25 на 1 миллион населения, т.е., в Российской Федерации ежегодно происходит более 3000 новых случаев, а доля лиц молодого трудоспособного возраста среди пострадавших достигает 80%. Столь высокая медико-социальная значимость проблемы обусловлена не только стойкой утратой двигательных и сенсорных функций, но и развитием тяжелых вторичных осложнений: хронической нейропатической боли, спастичности, пролежней, инфекционных и сердечно-сосудистых нарушений, приводящих к пожизненной инвалидизации.

С патофизиологических позиций, ключевым фактором, определяющим тяжесть и прогноз ТСМ, является каскад вторичных повреждений, разворачивающийся в острой и подострой фазах травмы и включающий ишемию, эксайтотоксичность, окислительный стресс, нейровоспаление, апоптоз и реактивный глиоз. Именно на эти процессы может быть направлено патогенетическое воздействие, способное ограничить распространение зоны повреждения и создать условия для нейромодуляции в реабилитационном периоде лечения. В этом контексте эпидуральная электростимуляция спинного мозга рассматривается как один из наиболее перспективных методов нейромодуляции. Однако существующие протоколы преимущественно

ориентированы на стимуляцию сегментов ниже уровня повреждения, что не позволяет в полной мере задействовать регенеративный потенциал транстравматических нейронных сетей.

Диссертационное исследование Р.В. Шевченко, выполненное на клинически релевантной модели контузионной травмы грудного отдела спинного мозга у мини-свиней, направлено на восполнение этого пробела. Разработанный автором протокол двухуровневой (выше и ниже эпицентра травмы) эпидуральной электростимуляции (ЭЭС) в сочетании с двигательной тренировкой может стать новым патогенетически обоснованным подходом к нейрореабилитации. Проведенные пилотные исследования имеют важное значение для понимания механизмов формирования транстравматических связей.

Работа выполнена в рамках приоритетного направления научно-исследовательской деятельности ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России и поддержана грантом Российского научного фонда № 16-15-00010. Полученные результаты полностью соответствуют стратегии научно-технологического развития Российской Федерации в области высокотехнологичного здравоохранения и персонализированной медицины.

Научная новизна результатов исследования

Научная новизна диссертационного исследования Р.В. Шевченко документально обоснована и заключается в разработке и пилотных испытаниях оригинального протокола двухуровневой нейромодуляции, а также в попытке раскрыть его патофизиологические механизмы, способствующие посттравматическому морфофункциональному восстановлению спинного мозга.

Впервые на патогенетически релевантной модели контузионной травмы грудного отдела спинного мозга у мини-свиней экспериментально апробирована двухуровневая эпидуральная электростимуляция, включающая транстравматическое воздействие на уровне Th5, непосредственно прилежащем к эпицентру повреждения, и стимуляцию центрального генератора паттерна шагания на уровне L2.

С патофизиологической точки зрения, особую ценность представляют данные о потенциальных клеточных и молекулярных эффектах двухуровневой ЭЭС. Автором впервые зарегистрировано антиапоптотическое действие в ответ на стимуляцию сегментов, прилежащих к эпицентру травмы, что проявляется в достоверном снижении количества Caspase3-позитивных клеток и уменьшении экспрессии белка теплового шока Hsp27. В каудальных отделах доминирует противовоспалительный эффект, выражающийся в ограничении реактивного астроглиоза и активации микроглии. Установлен также факт сохранения пула олигодендроцитов в ростральных сегментах, что создает морфологическую основу для ремиелинизации аксонов.

Принципиально новым и клинически значимым является описание возможного нейропротекторного действия двухуровневой ЭЭС на скелетную мускулатуру. Впервые показано, что разработанный протокол не только предотвращает денервационную атрофию камбаловидной мышцы, сохраняя ее массу и среднюю площадь поперечного сечения мышечных волокон, но и поддерживает медленный фенотип (тип I) этой мышцы, критически важный для постурального контроля и устойчивости к утомлению. В условиях ТСМ, сопровождающейся функциональной разгрузкой и перестройкой мышечных волокон в сторону быстрых гликолитических типов, сохранение медленного фенотипа под действием ЭЭС является важным патофизиологическим наблюдением, которое коррелирует с частичным восстановлением произвольной двигательной активности задних конечностей.

Достоверность и обоснованность научных положений и выводов

Достоверность результатов диссертационной работы определяется комплексным подходом к сбору и анализу данных, применением взаимодополняющих методик на разных уровнях исследования, а также использованием статистических методов, адекватных характеру распределения признаков в малых выборках (малый объем выборки диссертант компенсировал дизайном, исследования, включающим анализ большого количества технических повторов, что в целом, допустимо и не влияет на достоверность научных

положений, однако требует исключения феномена псевдорепликации). Тем не менее, взаимное подтверждение выявленных закономерностей независимыми методами позволяет с достаточной степенью уверенности говорить о надежности полученных результатов.

Обоснованность выводов диссертационной работы не вызывает сомнений и обеспечивается продуманным дизайном исследования, использованием современных высокоинформативных методик и корректной статистической обработкой данных.

Выбор экспериментальной модели (неполная контузионная травма на уровне Th8-Th9 у мини-свиней) является методологически оправданным. Свиньи, в отличие от мелких лабораторных животных, имеют анатомо-физиологические характеристики спинного мозга, максимально приближенные к человеческим, что существенно повышает трансляционную ценность результатов.

Методологическая база работы включает комплекс взаимодополняющих подходов, позволяющих оценить эффекты двухуровневой ЭЭС на разных уровнях – от молекулярного до системного. Для характеристики двигательных нарушений и их динамики применены поведенческий тест PTBS, видеоанализ кинематики суставов задних конечностей и электрофизиологические методы (регистрация МВП, М-ответа и Н-рефлекса камбаловидной мышцы). Для оценки структурных изменений в спинном мозге использован комплекс гистологических и иммунофлюоресцентных методов с специфическими маркерами (Caspase3, Hsp27, GFAP, Iba1, Olig2). Отдельное внимание уделено состоянию периферического нейромоторного аппарата – проведен морфометрический анализ камбаловидной мышцы (масса, площадь поперечного сечения волокон) и иммунофенотипирование мышечных волокон с оценкой соотношения медленных (тип I) и быстрых мышечных волокон, что позволило объективизировать нейропротекторное действие электростимуляции и на уровне скелетной мускулатуры.

Все 4 вывода и научное положение, выносимое на защиту, строго аргументированы, логически вытекают из полученных результатов и полностью соответствуют поставленным задачам.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Р.В. Шевченко изложена на 131 странице машинописного текста и построена по классическому академическому принципу, включающему введение, четыре главы, заключение, выводы, список литературы и иллюстративный материал. Работа содержит 22 рисунка и 4 таблицы, наглядно дополняющие текстовое изложение. Библиографический указатель включает 189 источников, в том числе ключевые работы отечественных и зарубежных авторов.

Во введении автор обосновывает актуальность темы, приводит эпидемиологические данные, четко формулирует цель и четыре задачи исследования, определяет научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, а также представляет научное положение, выносимое на защиту.

Первая глава «Обзор литературы» содержит систематизированный анализ современного состояния проблемы. Автор последовательно рассматривает патофизиологические механизмы первичного и вторичного повреждения спинного мозга, современные подходы к диагностике и лечению спинно-мозговой травмы. Особое внимание уделено методам электростимуляции спинного мозга: проанализированы различные протоколы стимуляции и обсуждены механизмы их действия. На основании проведенного анализа обоснована необходимость разработки двухуровневого подхода ЭЭС, объединяющего транстравматическую стимуляцию выше уровня повреждения и стимуляцию поясничного утолщения ниже эпикентра.

Вторая глава «Материал и методы исследования» содержит развернутое описание дизайна эксперимента, характеристики животных, протоколов хирургических вмешательств (имплантация электродов, моделирование контузионной травмы), методик электрофизиологического исследования, видеоанализа кинематики суставов, поведенческого тестирования, а также

гистологических и иммунофлуоресцентных методов с подробным перечнем примененных антител. Раздел статистического анализа выполнен корректно, с указанием используемых критериев.

В третьей главе «Результаты собственного исследования» представлены экспериментальные данные, разделенные по направлениям, соответствующим задачам работы. Результаты поведенческого тестирования, кинематического анализа суставов, электрофизиологических исследований (МВП, М-ответ, Н-рефлекс), а также гистологического и иммунофлуоресцентного анализа спинного мозга и камбаловидной мышцы изложены логично, проиллюстрированы качественными микрофотографиями и графическими материалами.

В четвертой главе «Обсуждение результатов» автор проводит анализ полученных данных, сопоставляя их с результатами мировых исследований, аргументированно обсуждает механизмы нейропротекторного действия двухуровневой ЭЭС и корреляцию структурных изменений с функциональным восстановлением. Автор критически оценивает ограничения исследования и обосновывает перспективы дальнейшей разработки темы.

В заключении подведены итоги работы. Выводы в количестве четырех пунктов сформулированы четко и полностью соответствуют цели и задачам исследования.

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 2 статьи в перечне ВАК, 2 статьи в изданиях Scopus и WoS, получен 1 патент. Автореферат полностью отражает основное содержание работы.

Замечания и вопросы по диссертации

К работе имеется ряд замечаний, требующих комментариев диссертанта.

1. В эксперименте на минипигах была не предусмотрена группа животных с изолированной стимуляцией ниже уровня травмы (L2-only). Диссертант объясняет причины, по которым эта группа не была сделана, однако, её наличие позволило бы доказать, что выявленные эффекты в спинном мозге и на уровне нейромышечной передачи обусловлены именно двухуровневой

транстравматической стимуляцией Th5+L2, а не обычной каудальной стимуляцией генератора шагания.

2. Основной функциональный результат носит преимущественно острый характер: кинематические показатели улучшаются при включённой L2-стимуляции, тогда как без ЭЭС опытная группа близка к контролю, что скорее свидетельствует об активации циклической активности шагового центра, нежели о восстановлении произвольной локомоции.
3. Требуются комментарии по примененной статистической обработке. Малый объём выборки ($n = 3$ на группу) компенсирован техническими повторами, однако диссертанту необходимо показать, что в анализе отсутствует псевдорепликация и что применение в качестве независимых переменных шагов, полей зрения, характеристик срезов и пр. не привело к искусственному занижению p -значений.
4. Анализу подвергалась только левая задняя конечность, автор обосновывает это тем, что поражение при выбранной модели симметрично, однако, анализ с двух сторон позволил бы получить в два раза больше данных (правда, с учётом комментария №3).
5. Оценка пяти шагательных движений при $n = 3$ на группу, возможно, недостаточна для надёжной характеристики локомоторного паттерна у крупного животного. Требуется комментарий диссертанта.
6. Количественный иммунофлюоресцентный анализ – методически уязвимое место в диссертации. Несмотря на то, что автор довольно подробно описывает методику унификации исследования в опытной и контрольной группе – остаётся риск систематической ошибки, связанной с индивидуальной вариабельностью размера патологического очага. (Особенно, если диссертант не проводил оценку вариабельности индивидуальных размеров очага – считая, что модель полностью стандартная). Не указано, проводился ли анализ флюоресцентных изображений в слепом режиме. При субъективном выборе ROI и пороговых значений в ImageJ отсутствие ослепления также создаёт высокий риск систематического смещения.

7. Относительная Hsp27- и GFAP-позитивная площадь не является прямым эквивалентом уровня экспрессии белка. Без строгой стандартизации экспозиции, пороговых значений и фона данный показатель имеет лишь полуколичественный характер.
8. Интерпретация маркеров Iba1, GFAP и Olig2 требует максимальной осторожности. Iba1 не различает фенотипы микроглии, GFAP-площадь не исчерпывает астроглиоз; а позитивность по Olig2 не доказывает ремиелинизацию. Для оценки ремиелинизации, в частности, необходимо в будущих исследованиях применить прямые методы анализа миелина (ИГХ MBP/PLP, окрашивание Luxol fast blue, электронная микроскопия).

Высказанные замечания не умаляют общую квалификационную и научно-практическую значимость работы, а лишь подчёркивают остроту и актуальность выбранного направления исследований и необходимость дальнейших экспериментальных изысканий. В целом работа подтвердила, что L2-стимуляция способна вызывать или усиливать шагоподобные движения у травмированных животных. Преимущества и параметры двухуровневой транстравматической стимуляции как патогенетического метода восстановления после травмы спинного мозга требуют дальнейшего тщательного изучения. Важно отметить, что в качестве пилотного исследования данная работа показала безопасность и переносимость двухуровневой стимуляции, при этом ряд патофизиологических феноменов были описаны впервые.

Заключение

Диссертационная работа Шевченко Романа Васильевича «Транстравматическая эпидуральная электростимуляция спинного мозга в сочетании с двигательной тренировкой в модели на мини-свиньях» является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи – раскрытия молекулярных и клеточных механизмов нейропротекторного действия двухуровневой

эпидуральной электростимуляции при травме спинного мозга, что имеет значение для патологической физиологии.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, а также степени обоснованности выводов диссертация полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Несмотря на сделанные замечания, Шевченко Роман Васильевич заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.3 – Патологическая физиология.

« 1 » 09. 2026г.

Официальный оппонент:

Доктор медицинских наук (03.01.04 – биохимия
(медицинские науки)), доцент, профессор РАН,
заведующий лабораторией нейрорегенерации,
заведующий отделом разработки клеточных
препаратов ФГБУ «ФЦМН» ФМБА России

 / Баклаушев Владимир Павлович

Подпись В.П. Баклаушева заверяю.
Учёный секретарь ФГБУ «ФЦМН»
ФМБА России, к.м.н.



 Л.Б. Завалий

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр
мозга и нейротехнологий» Федерального медико-биологического агентства
телефон: +7 (495) 2803550

адрес электронной почты: info@fccps.ru

почтовый адрес: 117513, г. Москва, ул. Островитянова, дом 1, строение 10