

## Отзыв официального оппонента

на диссертацию Вещицкого Александра Александровича

"Исследование морфофункциональной архитектуры сенсомоторных нейронных сетей спинного мозга кошки, обеспечивающих ходьбу в разных направлениях", представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.03.01 – физиология и 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**Актуальность избранной темы.** В последние два десятилетия физиология движения быстро развивается. Это связано с прогрессом в области робототехники, нейрореабилитации и протезирования. Большое значение в прогрессе этих направлений имеет исследование нейронной и иерархической организации локомоторных зон ЦНС. К настоящему времени накоплен большой экспериментальный материал о функционировании центрального генератора паттернов. Исследуется, как задается ритмика локомоторных движений и как реализуются конкретные паттерны активации скелетных мышц. Эти исследования проводились в основном при помощи электрической эпидуральной стимуляции спинного мозга и супраспинальных локомоторных областей ЦНС. Можно считать вполне надежно установленными уровни (сегменты спинного мозга, области ствола мозга) и амплитудно-частотные параметры электрической стимуляции, которые вызывают шагательные движения. Идентифицированы отдельные нейронные ансамбли, которые позволяют животному перемещаться на тредбане и даже по неподвижной опоре в условиях перерезки спинного мозга.

Вместе с тем, исследование локомоции практически всегда представляет собой исследование перемещения вперед. Это кажется вполне естественным, так как ходьба вперед, то есть к цели, считается главным вектором движения любого организма. Это особенно важно для хищников для быстрого сокращения дистанции до цели. С другой стороны, для выживания, причем не только животных - объектов охоты, но и хищников, движение в сторону и назад можно считать также эволюционно значимым, так как ходьба назад и в сторону позволяют избежать опасности, уклониться от препятствия или вовремя остановиться. Этому, на первый взгляд, неосновному, но, тем не менее, биологически и эволюционно очень важному аспекту перемещения в пространстве, и посвящена диссертационная работа А. А. Вещицкого. Поэтому, данная работа лежит в области современной парадигмы изучения движения, но в то же время нацелена на изучение практически неизвестного аспекта движения. В неврологии и вестибулологии при некоторых заболеваниях используется так называемая фланговая походка (ходьба в сторону приставным шагом) или перешагивание в качестве диагностического приема) и тесты, в которых применяется перешагивание через препятствие, движение вперед и

назад. В этой связи, данная тема, несомненно, актуальна и обладает потенциально большой научной новизной.

**Цель представленной работы** – изучение морфо-функциональной организации сенсомоторных нейронных сетей спинного мозга кошки, контролирующей ходьбу в направлении вперед и назад. Для достижения этой цели в качестве научных задач автором сформулированы следующие задачи 1) определить сегменты пояснично-крестцового утолщения спинного мозга кошки, электрическая эпидуральная стимуляция которых вызывает ходьбу задних конечностей в направлении вперед и назад; 2) выявить распределение маркера *c-Fos* в пояснично-крестцовом утолщении спинного мозга кошки после локомоции задних конечностей в направлении вперед и назад, вызванной электрической эпидуральной стимуляцией и 3) исследовать паттерны распределения интернейронов, маркированных разными кальций-связывающими белками. Другими словами, необходимо провести локацию нейронных ансамблей, специфически связанных с ходьбой вперед и назад в спинном мозгу в объеме координат спинальных сегментов и пластин Рекседа при помощи визуализации нейронов молекулярно-генетическими методами. Поставленные задачи адекватны цели исследования, а их решение должно привести к достижению цели.

В разделе "Обзор литературы" автором представлен исчерпывающий нейрофизиологический исторический анализ концепций генератора локомоции, описана цитоархитектоника серого вещества спинного мозга в виде организации пластин Рекседа, функции и типов интернейронов, которые участвуют в генерации шагания. Также, дано подробное описание функционального значения кальций-связывающих белков интернейронов спинного мозга в качестве маркеров активности нейрона. Это показывает, что автор представляет современное состояние исследований по теме диссертации, а также хорошо ориентируется в предшествующих работах.

**Степень обоснованности научных положений.** Методологическим преимуществом данной работы является то, что при помощи предложенных методов исследования можно связывать между собой структуру и ее функцию, то есть в данной работе карта функций спинальных нейронов фактически совмещается с морфологической картой спинного мозга. Такой научный подход считается одним из наиболее информативных к решению любой физиологической проблемы.

В данной диссертации, локация и идентификация интересующих автора нейронов и области их расположения в объемной системе координат серого вещества (пластины Рекседа, горизонтальный аспект) и сегментов спинного мозга (вертикальный аспект), проводится при помощи иммуногистохимических методов, связанных с маркировкой

нейронов при помощи двух белков, которые связывают ионы кальция - парвальбумин и кальбиндин, а также продукта гена *c-fos* который является признанным маркером нейрональной активности. Необходимость использования разных кальций-связывающих белков была связана с их специфической активностью в разных типах интернейронов.

В разделе "Материалы и методы" подробно представлены все методы, которые позволяют решить поставленные задачи - модель исследования генератора шагания, хирургические приемы и доступ к спинному мозгу, отбор материала, электрическая стимуляция спинного мозга, иммуногистохимическая идентификация интернейронов при помощи кальций-связывающих белков. Также, что особенно интересно, автор использовал высокотехнологичный метод цифровой обработки материалов, что позволило визуализировать на срезе спинного мозга активность интернейронов во время разных функциональных состояний кошки (ходьба вперед или назад). Такой подход представляется очень информативным и доказательным.

Для описания паттернов ходьбы вперед и назад автором использованы несколько общеупотребительных методов - 1) электромиография мышц конечностей во время ходьбы, 2) видеозахват движения, 3) динамометрия в точках опоры, 4) потенциометрия. Для запуска ходьбы вперед и назад автором используется электростимуляция спинного мозга на уровне разных сегментов и тредбан. Таким образом, методический и технологический аспекты исследования представляют собой сильную сторону данной диссертации. Статистическая обработка в виде применения непараметрического критерия Манна-Уитни для оценки различий распределения нейронов в спинном мозгу и использования иерархической линейной модели для оценки суставных углов может считаться соответствующей задачам исследования.

Автор опубликовал научные результаты в журналах соответствующего профиля с высоким импакт-фактором, что указывает на хороший уровень предварительного рецензирования данной диссертации. Также, результаты обсуждены на многочисленных профильных конференциях, что указывает на их достаточную апробацию. В целом, знакомство с методикой работы позволяет сказать, что полученные данные являются достоверными. Соответственно, научные положения, которые выдвигает автор для защиты, являются обоснованными.

**Научная новизна положений диссертации.** Автором получено несколько фактов, обладающих новизной. Во-первых, автором обнаружено явное различие между количеством сегментов, вовлеченных в ходьбу вперед и назад. Так, ходьба назад обеспечивается в основном сегментом L6, причем преимущественно его каудальной частью, с небольшим участием сегментов L5 и L7, тогда как ходьба вперед занимает

сегменты от L3 до S1. Это отражает то, что кошка, как хищник, нацелена в основном на ходьбу вперед, то есть преследование добычи, но также способна и к оборонительным движениям и отступлению. Столь узкое представительство ходьбы назад в нейронных сетях спинного мозга может быть связано с нечастым рекрутированием этого вида ходьбы и тем, что он, в качестве экстренного движения, может находиться под прямым контролем супраспинальных структур, что не требует больших нейронных сетей в самом спинном мозгу.

Во-вторых, показано, что кинематически ходьба назад при электростимуляции одних и тех же сегментов спинного мозга также различается - шаги назад оказались короче по сравнению с шагами вперед. Также, при ходьбе назад наблюдался намного меньший объем движений в тазобедренном суставе при удлинении времени шага, и нарушение симметричного чередования конечностей. Данные результаты, по мнению автора, могут быть объяснены, с одной стороны, спецификой мышечного аппарата, для которого не характерны формируемые паттерны, с другой - слабым развитием локомоторных сетей, контролирующих ходьбу назад, и неразвитостью синхронизирующих влияний. Таким образом, внешние поведенческие особенности двигательной активности кошки оказались морфологически представленными в нейронной организации спинного мозга.

В-третьих, интернейроны, которые активируются при выполнении ходьбы, распределены в сером веществе более или менее равномерно среди пластин Рекседа, однако обнаружено несколько более "конденсированных" областей активности в пластинах II-III, VI-VII и VIII. Если рассматривать зоны интереса (вентрально-дорзальное и медиально-латеральное направление), то наибольшее количество нейронов, ассоциированных с ходьбой назад, оказалось наибольшим в латеральных зонах (ДЛ, ЦЛ, ВЛ) и центрально-вентральной зоне (сегменты L5-S1). Следовательно, нейроны, ответственные за ходьбу назад, узко локализованы как в продольном, так и поперечном направлении спинного мозга. Таким образом, автору удалось визуализировать часто используемый в рассуждениях, но все-таки в целом умозрительный центральный генератор паттернов. Также показано, что, несмотря на частичное совпадение зон расположения интернейронов, вовлеченных в генерацию ходьбы вперед и назад, эти нейроны все-таки принадлежат разным сетям, что указывает на независимость генераторов этих двух паттернов ходьбы. Полученные результаты, таким образом, обладают явными признаками научной новизны и соответствуют научным положениям диссертации.

**Теоретическая значимость** данной работы заключается в том, что столь специфическое представительство двух разных видов ходьбы явно требует разных способов или генераторов их активации - спинального и супраспинального. Ходьба вперед, как более привычный вид ходьбы требует преимущественно спинальных нейронных сетей, что выражается в их более широком представительстве в спинном мозгу во всех направлениях (ламинарном, региональном и продольном), а ходьба назад, как более редкий вид ходьбы, представлена более узко и свидетельствует в пользу наличия супраспинального генератора. Результаты данной диссертации также согласуются с выдвинутой ранее гипотезой о наличии двух компонентов в шагательной программе - 1) вертикального (ритм-образующего) для подъема лапы вверх и 2) горизонтального (паттерн-образующего) для переноса лапы вперед или назад. Таким образом, автором фактически предложена оригинальная трактовка организации генератора шагания на уровне спинного мозга. Полученные результаты представлены автором в собственной обобщенной схеме организации ходьбы вперед и назад.

Относительно практической значимости диссертации можно отметить, что автором найден действенный нейрофизиологически-иммуногистохимический способ визуализации двигательной активности, что может быть использовано другими исследователями, а сам результат может иметь практическое применение для создания прецизионных стимуляторов, которые могут вызывать специфические движения, например, у больных с полным перерывом спинного мозга. Таким образом, практическое применение лежит в области медицины и нейрореабилитации.

Данная диссертация практически лишена технических недостатков. У меня нет замечаний ни к методике, ни к результатам, ни к интерпретации результатов. Вместе с тем, хотелось бы знать мнение автора по нескольким вопросам:

1) Ходьба вперед и назад не исчерпывает многообразия движений кошки. Существуют перемещения в сторону, по наклонной поверхности, перешагивание препятствия. Возможно ли, по мнению автора, использовать электростимуляцию спинного мозга для вызывания у кошки этих особых паттернов ходьбы?

2) Известно, что у человека шагательные движения также вызываются при помощи электростимуляции спинного мозга. Можно ли у человека вызвать шагательные движения назад при стимуляции примерно тех же сегментов спинного мозга, что и у кошки?

### **Заключение**

На основании вышеизложенного, а также на основании знакомства с опубликованными научными работами по теме диссертации считаю, что диссертационная

работа Вещицкого Александра Александровича на тему "Исследование морфофункциональной архитектуры сенсомоторных нейронных сетей спинного мозга кошки, обеспечивающих ходьбу в разных направлениях", представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.03.01 – физиология и 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, является самостоятельной, логически завершенной научно-квалификационной работой, в которой представлено новое решение актуальной научной проблемы в области нейрофизиологии движения.

Диссертация обладает внутренним единством, написана автором самостоятельно, содержит новые результаты в виде положений, выдвигаемых для публичной защиты, и свидетельствует о личном вкладе автора диссертации в науку. Выдвинутые научные положения основаны на научных результатах. Полученные научные результаты имеют несомненную научно-практическую значимость для физиологии и медицины. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Представленная работа по своей актуальности, объему выполненных исследований, достоверности полученных результатов, научной новизне и практической значимости полученных данных соответствует требованиям п. 9 и остальным пунктам раздела II «Положения о порядке присуждения учёных степеней» Постановления Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ №335 от 21.04.2016, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сам соискатель Вещицкий Александр Александрович достоин присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.03.01 – физиология и 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Официальный оппонент:

доктор мед. наук, профессор

06.05.2019

А. Ю. Мейгал

Заведующий кафедрой физиологии человека и животных, патофизиологии, гистологии медицинского института, главный научный сотрудник ГБТ654-17, зав. лабораторией новых методов физиологических исследований Института высоких биомедицинских технологий ПетрГУ

Адрес работы: ФГБОУ ВО "Петрозаводский государственный университет", пр. Ленина, 33, г. Петрозаводск, 185910, Республика Карелия, Россия

Мобильный телефон: 8911-4029908, рабочий телефон: 8142-781541

Адрес электронной почты: meigal@petrsu.ru



Мейгала А.Ю.  
ЗАВЕРЯЮ  
Мышина Е.Ю.  
06.05.2019