

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Ткаченка Юрія Миколайовича «Особливості кодування температурної та рН-чутливості у первинних ноцицепторах мишей», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю біофізика – 03.00.02.

Актуальність проблематики дисертаційного дослідження

Хронічний біль є значною глобальною проблемою громадського здоров'я та однією з провідних причин інвалідності. За різними оцінками у світі 20–30% людей дорослого віку страждають від хронічного болю. При цьому хронічний біль високої інтенсивності суттєво впливає на якість життя. Він відзначається у 7,4% дорослих і є однією з найбільш поширених причин інвалідизації населення, оскільки суттєво обмежує можливості людини виконувати роботу, вести нормальне соціальне життя або навіть доглядати за собою. Крім того, існує пряма кореляція між хронічним болем і показниками зловживання опіоїдами.

У той же час проблема ефективного лікування болю різної етіології все ще залишається далекою від свого вирішення та є одним із актуальних викликів сучасної медицини. Згідно з сучасними концепціями, різні чинники фізичної та хімічної природи взаємопосилюють відчуття больового стимулу через синергічні взаємодії на молекулярному рівні. Так, добре відомо, що активація рецептора болю і тепла TRPV1 під дією теплових стимулів значно посилюється за зниженого рН, який виникає під час запалення. При цьому ефекти ацидозу і підвищення температури на TRPV1 не є адитивними, а відбувається їх значна взаємне посилення. Молекулярні та біофізичні механізми цих процесів потребують подальших досліджень.

Дисертаційна робота Ткаченка Ю.М. присвячена вивченню механізмів температурної та рН-чутливості периферичних закінчень первинних ноцицепторів шкіри. Незважаючи на встановлення ключових рецепторних механізмів сприйняття больових стимулів, особливості їх функціональної взаємодії на рівні периферичних нервових закінчень залишаються недостатньо

вивченими. Це і визначає актуальність дослідження як для фундаментальної нейробиології, так і для пошуку нових підходів до корекції больових станів та впровадження більш ефективних і селективних підходів до лікування хронічного болю.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретична та практична значимість

Наукова новизна роботи полягає в комплексному дослідженні механізмів активації ноцицептивних нервових закінчень шкіри у відповідь на ацидоз та агоністи рецепторів (АТФ, капсаїцин) в межах фізіологічно нешкідливого температурного діапазону (20–40 °C) та встановленні ролі окремих рецепторних і мембранних механізмів у їхній активації за умов помірного ацидозу. Вперше показано специфічну температурну залежність відповідей ноцицептивних аферентів на АТФ і протони, яка суттєво перевищує температурну залежність базальної та K^+ -індукованої активності. Встановлено, що антагоніст TRPV1 AMG-517 пригнічує капсаїцин-індуковане збудження, але не усуває відповіді на теплову стимуляцію та помірний ацидоз. У дисертації вперше показано, що блокада протон-активованих ASIC-каналів диміназеном не пригнічує протон-індуковане збудження периферичних ноцицепторів, тоді як інгібування Na^+/H^+ -обмінника 1-го типу (NHE1), який регулює внутрішньоклітинний pH та сигнальні процеси, посилює їхню відповідь на ацидоз. Сукупність отриманих результатів дозволила обґрунтувати багатокомпонентний і гетерогенний характер периферичного кодування температурної та кислотної чутливості, а також визначити NHE1 як важливий регулятор збудливості ноцицептивних закінчень за умов помірного ацидозу.

Практична цінність одержаних результатів полягає в розширенні експериментальних можливостей дослідження функціональних властивостей периферичних ноцицептивних закінчень та їхньої реакції на хімічні й температурні стимули шляхом розробки удосконаленого методу позаклітинної реєстрації електричної активності одиничних аферентних волокон у препараті «шкіра–нерв» із використанням скляного мікроелектрода. Виявлені

закономірності у кодуванні температурної та рН-чутливості ноцицептивними аферентами шкіри, а також встановлена участь NHE1 у регуляції відповіді на ацидоз можуть бути використані як підґрунтя для подальшого вивчення механізмів периферичної сенситизації та пошуку фармакологічних способів впливу на ноцицептивну чутливість.

Таким чином, отримані результати є новими та мають як теоретичне, так і практичне значення на шляху до кращого розуміння проблематики хронічного болю на молекулярному й клітинному рівні, що відкриває нові перспективи для його лікування.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи

Наукові положення, висновки і рекомендації, сформульовані в дисертаційній роботі, є добре обґрунтованими. Для вирішення наукових завдань здобувачем використано комплекс сучасних методів дослідження та достатній обсяг експериментальних даних, що забезпечили адекватність статистичного аналізу й репрезентативність результатів. Аналіз проведено з використанням адекватних програм статистичної обробки, що підтвердило обґрунтованість висновків. Окремо варто відмітити дизайн експериментів, який у повній мірі є адекватним поставленій меті і завданням дослідження, структурованість та логічну послідовність етапів дослідження.

Результати дисертаційного дослідження Ткаченка Ю.М. представлено на високому науковому рівні, а також наведено обговорення отриманих результатів у порівнянні із сучасними дослідженнями інших авторів.

Наведені в дисертаційній роботі теоретичні обґрунтування та експериментальні дослідження виконані на високому науково-методичному рівні. Висновки дисертації ґрунтуються на результатах власних досліджень і беззаперечно містять нові наукові положення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана в рамках відомчих тем НДР відділу фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця

НАН України, а саме: «Механізми внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації; вивчення шляхів їх модуляції та пошук нових фармакологічних впливів» (№ державної реєстрації 0107U010843); «Ендогенна та фармакологічна регуляція внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації в клітинах нервової системи в нормі та патології» (№ державної реєстрації 0110U004750); «Іонні канали клітинних мембран: функціональна роль у нормі та патології» (№ державної реєстрації 0113U003964); «Клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (№ державної реєстрації 0113U007273); «Біофізичні та молекулярно-генетичні механізми регуляції фізіологічних та патологічних процесів» (номер державної реєстрації 0116U004470); «Молекулярно-генетичні та фармакологічні засоби впливу на клітинні механізми неврологічних розладів» (номер державної реєстрації 0118U007343) та «Молекулярні механізми неврологічних розладів та можливі шляхи їх корекції» (номер державної реєстрації 0124U001713).

Структура, обсяг та повнота викладення матеріалів дисертаційної роботи

Результати цілком достатньо висвітлені у 10 публікаціях: 5 – у фахових наукових журналах, 2 з яких за класифікацією SCImago Journal Rank належать до категорії Q2 на рік публікації цих статей, та 5 тезах доповідей у збірках матеріалів наукових конференцій та з'їздів. Обсяг друкованих робіт та їх кількість відповідають вимогам МОН України щодо публікації основного змісту дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук. Зміст автореферату достатньо повно відображає основні положення та результати дисертаційного дослідження.

Дисертація стандартно містить такі розділи: Вступ, Огляд літератури, Матеріали та методи дослідження, Результати дослідження, Обговорення результатів, Висновки та список використаних джерел із 192 найменувань. Робота викладена на 173 сторінках та проілюстрована 41 рисунком.

У вступі автор обґрунтовує актуальність теми дисертаційного дослідження, на основі чого далі формулює мету і задачі дослідження, викладає наукову новизну та практичну значимість отриманих результатів, наводить дані

про особистий внесок, публікації у фахових виданнях та апробацію матеріалів дослідження.

Розділ 1 «Огляд літературних даних» складається з 6 підрозділів, у яких розглянуто механізми підтримання рН-гомеостазу та розвитку тканинного ацидозу, роль рН-чутливих рецепторів у ноцицепції, механізми температурної чутливості та чутливості до охолодження периферичних ноцицепторів, а також вплив температури на больову чутливість. Значну увагу приділено сучасним експериментальним моделям і електрофізіологічним підходам до дослідження ноцицепції. Необхідність вирішення окреслених наукових проблем стала передумовою вибору напрямку досліджень, описаних в дисертаційній роботі.

У другому розділі «Матеріали та методи дослідження» цілком правильно визначено та обґрунтовано матеріали й об'єкти дослідження, а також охарактеризовано використані сучасні взаємодоповнювальні методи. Автор застосував комплекс електрофізіологічних методів, поєднавши дослідження препарату «шкіра–нерв» *ex vivo* з реєстрацією трансмембранних струмів методом петч-клемп у первинних культурах сенсорних нейронів. Це дозволило дослідити як функціональну активність периферичних нервових закінчень, так і клітинні механізми сенсорної трансдукції. Важливим результатом роботи є удосконалення методики реєстрації електричної активності поодиноких аферентних волокон у препараті «шкіра–нерв» миші. Запропонована модифікація, що передбачає реєстрацію сигналів з окремих гілок *n. saphenus* без відокремлення основного нервового стовбура та локальну перфузію рецептивного поля, забезпечила можливість тривалої стабільної реєстрації та контрольованого фармакологічного впливу на периферичні нервові закінчення. Реєстрації трансмембранних іонних струмів методом петч-клемп включали надшвидку, у мілісекундному діапазоні, аплікацію досліджуваних речовин до клітини, що технічно є дуже складною задачею.

У третьому розділі «Результати досліджень» представлені результати власних досліджень дисертанта. Експериментальна частина роботи цілком логічно пов'язана з її метою та задачами. Детальне ознайомлення з текстом

дисертації Ю.М. Ткаченка дає підстави стверджувати, що експериментальні дослідження вирізняються фундаментальністю підходів та ґрунтовністю аналізу даних. Варто відзначити добру структурованість роботи, логічність викладу та її якісне оформлення.

Особливої уваги заслуговують результати щодо температурної залежності ноцицептивної активності. Автором показано, що підвищення температури у фізіологічно нешкідливому діапазоні по-різному впливає на відповіді ноцицепторів залежно від характеру стимулу. Найбільш виражена температурна залежність спостерігалася для відповідей на АТФ та протони, тоді як відповідь на деполяризацію, спричинену підвищенням концентрації K^+ , змінювалася значно слабше. Важливим є кількісне підтвердження цих відмінностей за допомогою температурних коефіцієнтів Q_{10} . Отримані результати свідчать про наявність специфічної температурної модуляції хімічно індукованої активності ноцицепторів, а не лише про загальне прискорення процесів, пов'язаних із генерацією та проведенням потенціалів дії.

Показано, що селективний антагоніст TRPV1-рецепторів AMG-517 пригнічує капсаїцин-індуковану активацію ноцицептивних аферентів шкіри, але не впливає на активацію, викликану підвищенням температури до 50 °C, і не впливає на активацію, викликану помірним ацидозом при температурі 40 °C. Це свідчить про те, що TRPV1 не є єдиним універсальним сенсором для болісного тепла і помірного зниження рН.

Цікавими та такими, що мають істотне наукове значення, є результати дослідження ролі ASIC-каналів. Диміназен у концентраціях, здатних пригнічувати протон-активовані струми в первинних DRG-нейронах, не впливав на протон-індуковане збудження периферичних ноцицептивних аферентів. Більше того, у високій концентрації він посилював відповідь на ацидоз. Таким чином, механізм активації периферичних ноцицепторів за умов помірного ацидозу не може бути зведений лише до функціонування ASIC-каналів.

Важливим і новим результатом роботи є встановлення ролі Na^+/H^+ -обмінника NHE1 у регуляції кислотної чутливості ноцицептивних закінчень.

Посилення протон-індукованої активності ноцицептивних аферентів під впливом селективного блокатора NHE1 зоніпориду свідчить про участь NHE1 у підтриманні збудливості периферичних ноцицепторів за умов зниження позаклітинного рН. Сукупність цих даних дозволяє автору обґрунтовано розглядати регуляцію внутрішньоклітинного рН як один із важливих компонентів периферичного кодування кислотних стимулів.

У четвертому розділі “Обговорення результатів” автор продемонстрував своє бачення проблеми порівняно з іншими дослідженнями молекулярних, клітинних і біофізичних механізмів ноцицепції та зробив відповідні узагальнення.

Висновки містять узагальнюючий висновок та п’ять положень. Висновки дисертації повністю відповідають її змісту, конкретно і стисло висвітлюють основні результати роботи, базуються на достатній кількості експериментальних спостережень.

Питання, дискусійні положення і зауваження до дисертаційної роботи

При ознайомленні з роботою виникли деякі запитання та зауваження, які переважно мають дискусійний характер, а саме:

1. Відомо, що між високою температурою та низьким рН (кислою середою) існує чіткий синергічний ефект (потенціація) у формуванні больового відчуття. Спільний ефект цих фізико-хімічних факторів значно сильніше деполяризує нервову клітину та генерує потужніший сигнал болю в ЦНС, ніж алгебраїчна сума окремих подразників. Чи передбачають отримані результати якісь новітні механізми, ніж синергізм активації TRPV1 при одночасному підвищенні температури і зниженні рН?
2. Є певні суперечності між розділами «Наукова новизна одержаних результатів» та «Теоретичне та практичне значення одержаних результатів». Так, у першому з них зазначено, що «поєднання 40 °C і рН 6,1 не активує TRPV1-рецептори шкіри» і що «блокатор ASIC-каналів диміназен у концентраціях, достатніх для повної блокади ASIC у сенсорних нейронах миші, не пригнічує генерацію ПД у ноцицептивних аферентах у відповідь на

помірний ацидоз», тоді як у другому роль TRPV1 і ASIC каналів у ноцицепції все ж таки не заперечується – «Окрім класичних сенсорів температури (TRPV1) і рН (ASIC), у ньому беруть участь також пуринаргічні рецептори та NHE». Будь ласка, конкретизуйте Ваше бачення ролі TRPV1 і ASIC-каналів.

3. Для чого було обмежувати смугу пропускання сигналу диференційного підсилювача від 100 до 3000 Гц (Рис. 2.1), адже зазвичай в електрофізіологічних реєстраціях з метою оптимізації відношення сигнал/шум використовують фільтр низьких частот, а не смуговий фільтр?
4. При зміні зовнішньоклітинного рН як це тестувалось у цьому дослідженні, також дуже ймовірно змінювався відповідним чином і внутрішньоклітинний рН. Тому виникає питання - чи можна на основі визначених біофізичних характеристик досліджених рН-залежних ефектів розрізнити між роллю зовнішньоклітинного- чи внутрішньоклітинного ацидозу в їх генерації?
5. Термочутливі катіонні канали супер-родини TRP (thermos-TRPs), на відміну від усіх інших іонних каналів, характеризуються високими значеннями їх температурних коефіцієнтів Q_{10} (наприклад, для TRPV1 Q_{10} від 20 до 30, для TRPM8 Q_{10} від 20 до 40). У роботі показано, що ефекти АТФ або зниження рН до 6,7 характеризуються високими значеннями $Q_{10} \sim 3,0-3,1$. Наскільки ці дані узгоджуються з висновком про найбільш суттєву роль у генерації потенціалів дії пуринаргічних $P2X_3$ -рецепторів та, зокрема, Na^+/H^+ -антипортера NHE1, який використовує енергію вже існуючого електрохімічного градієнта для іонів натрію?

Висловлені зауваження і запитання носять дискусійний характер; вони не впливають на загально позитивну оцінку роботи.

Висновок офіційного опонента

Дисертація Ткаченка Юрія Миколайовича на тему «Особливості кодування температурної та рН-чутливості у первинних ноцицепторах мишей» є самостійно проведеним, оригінальним і завершеним дослідженням, спрямованим на вирішення актуальної наукової проблеми та містить нові,

науково обґрунтовані дані, положення і висновки, що мають теоретичну і практичну цінність. Оформлення дисертації та автореферату загалом відповідає чинним нормативним документам.

Виходячи з актуальності, об'єму та рівня досліджень, наукової новизни результатів, теоретичної та практичної цінності отриманих даних, об'єктивності та обґрунтованості висновків та оформлення дисертаційна робота Ткаченка Юрія Миколайовича на тему «Особливості кодування температурної та рН-чутливості у первинних ноцицепторах мишей» повністю відповідає вимогам, що висуваються до кандидатських дисертацій згідно з встановленим п. 9, 11 і 12 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. №567 (зі змінами), а також п. 2 пп. 7 розділу XV «Прикінцеві та перехідні положення» Закону України «Про вищу освіту», а її автор Ткаченко Ю.М. заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Офіційний опонент

завідувач кафедри біофізики та нейробіології
Навчально-наукового центру «Інститут біології та
медицини» Київського національного
університету імені Тараса Шевченка
доктор біологічних наук, професор

Олександр ЖОЛОС

