

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

про науково-практичну цінність дисертаційної роботи

Копач Ольги Володимирівни

“Клітинні та молекулярні спінальні механізми ноцицепції як мішені для корегування хронічних больових синдромів”

на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Актуальність проблематики дисертаційного дослідження

Хронічний біль є дуже значною медичною та соціально-економічною проблемою, що стрімко наростає у сучасному світі. Європейська Асоціація з дослідження болю (European Pain Federation - EFIC) пропонувала визначати хронічний біль як окреме захворювання ще починаючи з 2001 року. У травні 2019 р. зважаючи на його розповсюдженість (страждає 20% населення у всьому світі) та складнощі лікування ВООЗ визначив хронічний первинний біль як хворобу внесену до міжнародного класифікатора захворювань (International Classification of Diseases ICD-11). Таким чином, зараз хронічний первинний біль класифікується в якості окремої хвороби як такої, тоді як хронічний вторинний біль виникає внаслідок певного порушення чи захворювання (рак, післяопераційний біль, нейропатії, запалення, механічні ушкодження тощо). В обох випадках арсенал лікувальних засобів залишається досить обмеженим, і основною причиною є недостатнє розуміння причин виникнення хронічного болю як багатofакторного феномену.

Дисертаційна робота Копач О.В. присвячена дослідженню фундаментальних фізіологічних та патофізіологічних механізмів, які опосередковують хронічні больові синдроми різного генезу. Виявлення спільних або відмінних ланок на рівні аналізу клітинних та молекулярних механізмів ноцицепції у спинному мозку є однією з пріоритетних задач

сучасних медико-біологічних досліджень. Таким чином, актуальність досліджень, що були проведені у цьому напрямку Копач О.В., є безсумнівною.

Одна з найбільш важливих задач цього дослідження полягала у розкритті природи центральної сенситизації, що веде до порушення балансу між процесами збудження та гальмування в ЦНС та спричиняє гіперзбудливість нейронних мереж. Іншим не менш актуальним аспектом роботи, якому присвячена значна її частина, є визначення ролі окремих молекулярних компонентів в якості специфічних мішеней для фармакологічної чи генетичної корекції хронічного болю, а також тестування змін больової симптоматики шляхом фармако-генетичних втручань.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретичне та практичне значення

В процесі виконання дисертаційного дослідження автор отримала цілий ряд нових даних, або таких, що суттєво доповнюють та розвивають існуючі уявлення щодо молекулярних та клітинних механізмів, які опосередковують феномен центральної сенситизації.

Зокрема Копач О.В. було продемонстровано:

- роль АМПА-рецепторів у нейронах дорсального рогу (ДР) спинного мозку за умов хронічних больових синдромів різного генезу - периферичного запалення та травми спинного мозку;
- вперше продемонстровано молекулярний механізм порушеного трафікінга АМПА-рецепторів, а саме інтерналізація GluR2-вмісних рецепторів із синапсів між первинними аферентами та ноцицептивними нейронами ДР спинного мозку за умов довготривалого периферичного запалення;

- визначено роль РКС-альфа та декількох білків-партнерів АМПА-рецепторів в регуляції експресії та локалізації цих збуджувальних рецепторів;
- вперше експериментально доведено факт перерозподілу GluR2-вмісних АМПА-рецепторів, які є Ca^{2+} -непроникними, між синаптичним та позасинаптичним просторами плазматичної мембрани під час периферичного запалення, що є основною причиною порушення балансу між збудженням та гальмуванням і, в кінцевому рахунку, важливим фактором центральної сенситизації;
- вперше визначена специфіка цих змін для сенсорних нейронів різних типів.

Ці наукові положення фундаментального характеру самі по собі мають вагомим практичне значення, адже вони визначають шляхи цілеспрямованої корекції хронічних больових симптомів. Але Копач О.В. зробила важливі експериментальні кроки в цьому напрямку дослідивши терапевтичні ефекти інгібіторів Ca^{2+} -проникних АМПА рецепторів, таких як ІЕМ-1460 та ІЕМ-1925. Було показано, що ці новітні сполуки полегшують больові симптоми без спричинення значних побічних ефектів.

До практичної цінності дисертаційної роботи можна також віднести демонстрацію принципової можливості використання генетичних підходів спрямованих на пригнічення експресії РКС-альфа у нейронах ДР спинного мозку, зокрема в моделі довготривалого периферичного запалення. Останні дослідження в цьому напрямку стосуються *state-of-the-art* наноінженерних технологій з метою розробки системи для таргетованого введення фармакологічних сполук для корекції хронічного больового синдрому, що очевидно важливо для уникнення тих побічних ефектів, які могли б виникати при їх традиційному системному введенні в організм.

Таким чином, отримані результати мають як фундаментальне, так і прикладне значення. Вони суттєво розвивають та доповнюють сучасні уявлення щодо ролі АМПА рецепторів в генезі хронічного болю різної

природи та пропонують нові фармако-генетичні підходи для корекції цих патофізіологічних станів.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи

Наукові положення дисертаційної роботи базуються на значному масиві різнопланових експериментальних даних, які були отримані з використанням комплексу сучасних методів, у тому числі фізіологічних (поведінкові реакції експериментальних тварин, моделювання хронічного болю різного генезу – внаслідок запалення, травми спинного мозку та нейропатії трійчастого нерва), електрофізіологічних (петч-клемп реєстрації трансмембранних іонних струмів в режимі фіксації напруги та реєстрації електричної активності нейронів в режимі фіксації струму), фармакологічних, молекулярно-біологічних (дослідження експресії генів методами ПЛР в реальному часі та Вестерн-блот аналізу), кальційметрії (реєстрація змін в концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} за допомогою флуоресцентного Ca^{2+} -чутливого барвника Fura-2), а також математичного та статистичного аналізу. В роботі також були вдало використані генетичні (knock-down за допомогою анти-сенс олігонуклеотидів) та нано-біотехнології. Різні методичні підходи вдало доповнюють один одного, а у своїй сукупності вони відповідають широкому спектру досліджуваних питань. Дані отримані різними методами дають підстави зробити висновок щодо високого ступеню обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи.

В цьому контексті також слід відмітити значну кількість проведених експериментів в кожній їх серії та адекватний статистичний аналіз даних.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, де виконувалась робота Копач О.В., є одним із відомих наукових центрів –

світових лідерів у дослідженні цієї проблематики. Дана дисертаційна робота була виконана згідно з тематичними планами декількох науково-дослідних робіт відділу загальної фізіології нервової системи (пізніше відділу сенсорної сигналізації), а також у рамках грантів НАН України для молодих вчених, які виконувались протягом 2011-2019 рр.

Зміст дисертаційної роботи

У вступній частині роботи обґрунтовано актуальність дослідження молекулярних та клітинних механізмів виникнення хронічного болю, чітко і коректно сформульовані його мета, завдання, об'єкт і предмет дослідження, підкреслена наукова новизна отриманих результатів та їх практичне значення.

Основна увага у роботі була приділена дослідженню іонотропних глутаматних рецепторів АМПА типу експресованих в нейронах ДР спинного мозку. У логічній послідовності представлені дані, які характеризують:

- інтерналізацію GluR2-вмісних АМПА рецепторів та роль NMDA рецепторів і опосередкованих ними активації протеїн кінрази С як за фізіологічних умов, так і при виникненні хронічного болю;
- фармако-генетичну корекцію трафікінгу АМПА рецепторів між первинними аферентами і ноцицептивними нейронами дорсального рогу спинного мозку, що веде до полегшення больових симптомів;
- зміни в розподілі синаптичних та позасинаптичних АМПА рецепторів у сенсорних нейронах ДР спинного мозку під час тривалого периферичного запалення;
- розвиток больового синдрому за рахунок збільшення кальцій-проникних АМПА рецепторів, які не містять GluR2 субодиниць, саме у поза-синаптичних зонах плазматичної мембрани сенсорних нейронів.

На основі результатів цієї частини роботи автором була запропонована загальна концепція (проілюстрована відповідною схемою) розвитку центральної сенситизації внаслідок запалення чи травми спинного мозку, в якій ключову роль відіграє субодиничний склад та локалізація АМПА рецепторів, фізіологічним проявом чого є зміни в ефективності синаптичної передачі та збудливості нейронів ДР спинного мозку.

Окремою частиною роботи стосується визначення ролі потенціалкерованих натрієвих каналів підтипу Nav1.9 у розвитку хронічного болю при невралгії трійчастого нерва. Ці дані є цікавими і актуальними з огляду на те, що так звані “*gain-of-function*” мутації в різних доменах цього каналу спричиняють цілий спектр спадкових больових синдромів - каналопатій, і такі дослідження є цінними для визначення молекулярної та клітинної природи цих різноманітних розладів.

В останніх розділах дисертаційного дослідження основна увага була приділена пошуку та вдосконаленню фармако-генетичних підходів до корекції хронічного болю на рівні спинного мозку. Автором були розроблені:

- методика імплантації катетеру у субарахноїдальний простір поперекового відділу спинного мозку для таргетованого введення лікарських препаратів;
- досліджена дія ряду новітніх селективних блокаторів кальцій-проникних АМПА рецепторів з використанням імплантованого інтратекального катетеру;
- генна терапія для пригнічення експресії РКС-альфа за допомогою анти-сенс олігонуклеотидів з метою лікування викликаного запаленням хронічного болю;
- полімерні мікрокапсули та наноінженерні полімерні плівки для таргетованого введення фармакологічних препаратів і забезпечення їх пролонгованої дії.

Висновки роботи сформульовані чітко, вони відповідають поставленим завданням і повністю ґрунтуються на отриманих результатах.

Представлені у дисертаційній роботі результати були опубліковані в 14 статтях та 42 тезах конференцій. Результати дисертаційного дослідження були також апробовані на ряді фахових національних та міжнародних форумів, таких як конгреси Українського товариства нейронаук, Українського біофізичного товариства, Society for Neuroscience (США), IBRO World Congress of Neuroscience, International Union of Physiological Sciences, FENS Forum of Neuroscience, The Physiological Society (Великобританія) та інших.

В авторефераті дисертаційної роботи по кожному розділу викладені, проілюстровані і обговорені основні результати, зроблені висновки, а в анотації роботи стисло викладена її суть.

При ознайомленні з роботою виникли деякі **запитання**:

1. Наскільки правомірно говорити про збудливість та гіперзбудливість нейронних мереж? Якщо для окремих нейронів зміни збудливості можна визначити як зміну у різниці між потенціалом спокою і порогом генерації потенціалів дії, то як можна кількісно охарактеризувати зміну збудливості цілої мережі нейронів?
2. Метод аналізу шумів, або аналізу нестационарних флуктуацій струмів, є потужним підходом до оцінки провідності поодиноких іонних каналів, але однією з передумов його застосування є наявність гомогенної популяції іонних каналів, які активуються незалежним чином. Чи виконувались ці дві умови?
3. При обговоренні результатів варто згадати, принаймні з метою порівнянь, рецептор тепла і капсаїцина TRPV1, особливо при запаленні, адже РКС-залежна сенситизація TRPV1 зараз також

привертає значну увагу дослідників як важливий молекулярний механізм виникнення хронічного болю.

4. Також цікаво зазначити, що надмірна експресія та активність РКС є одним з ключових факторів патогенезу цукрового діабету. Зокрема нами раніше було показано, що феномен кальцієвої сенситизації скоротливих міофіламентів гладеньких м'язів судин спричиняється активацією Rho кінази та РКС, що може бути причиною діабетичної гіпертензії (Br J Pharmacol, 159(8), 1724-1731, 2010). Чи є запропоновані автором цього дослідження фармако-генетичні підходи до корекції хронічного болю спричиненого запаленням або травмою спинного мозку настільки універсальними, щоб їх можна було також пропонувати для корекції діабетичних нейропатій та гіпертензивних станів?
5. Важлива роль АМПА рецепторів у довготривалій синаптичній пластичності (LTP та LTD) є добре відомою. Унікальну роль в цих процесах відграють саме проникні до іонів кальцію АМПА рецептори, які не містять GluR2 субодиниць. Тому виникає питання щодо можливих паралелей у контексті ролі цих АМПА субодиниць в генезі хронічного болю, а саме можливості виникнення свого роду «пам'яті» щодо больових стимулів, яка має довготривалий характер (тобто триває довше, ніж первинна больова сигналізація) і таким чином перетворюється у власну клінічну проблему.

Ці питання носять в основному дискусійний характер та не впливають суттєво на загально високу оцінку даної дисертаційної роботи.

Висновок

Вважаю, що оформлення дисертаційної роботи та автореферату відповідає вимогам ДАК МОН України. Докторська дисертація Копач Ольги Володимирівни на тему «Клітинні та молекулярні спінальні механізми

ноцицепції як мішені для корегування хронічних больових синдромів”, в якій окремими розділами є публікації здобувача, опублікованих у кількості не менше 10 у виданнях, віднесених до першого і другого кuartилів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports, цілком відповідає вимогам пунктів 10, 11 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету міністрів України від 24 липня 2013 року №567 зі змінами Вимог до оформлення дисертації (зокрема зазначених у розділі II), затверджених наказом Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. №40 (zareєстровано у Міністерстві юстиції України 03.02.2017 р. за №155/30023).

Дослідження Копач О.В. відповідають і навіть перевищують ці критерії: загалом дисертаційна робота узагальнює результати досліджень, що були опубліковані у 14 наукових статтях, з них Q1 – 10, Q2 – 4 (відповідно до Scimago Journal & Country Rank на рік публікації). Таким чином, автор заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

Офіційний опонент


завідувач кафедри біофізики та медичної інформатики

ННЦ “Інститут біології та медицини”

Київського національного університету

імені Тараса Шевченка,

доктор біологічних наук, професор Жолос О.В.


Жолос О.В. Жолос
Заст. директора



Завідувач (Саргентський А.В.)