

## ВІДГУК

### офіційного опонента на дисертаційну роботу

**Агашкова Кирила Сергійовича**

**«Клітинні й мережеві механізми обробки ноцицептивних сигналів у спинному мозку та їх генно-інженерне модулювання як засіб терапії хронічного больового синдрому»**,  
представленої на здобуття вченого ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04  
– патологічна фізіологія.

#### *Актуальність проблеми*

Патологічний (хронічний) біль є однією з найпоширеніших причин звернень за медичною допомогою, він знаходиться в першій десятці станів, які значно порушують якість життя пацієнтів. . Щонайменше 40% людей в розвинених країнах стикаються з проблемою хронічного болю .Це є дуже значною клінічною та соціальною проблемою. Хоча принципи обробки та формування больової інформації досить інтенсивно вивчаються, але на сьогоднішній день є недостатньо вивченні, що є важливою задачею для сучасної біології та медицини

Хронічний біль викликає зміни функціонування як периферичної, так і центральної нервової системи. Первинна обробка больової інформації від рецепторного апарату тіла відбувається в дорзальному розі (ДР) спинного мозку (СМ). Серед великого різноманіття нервових клітин, які залучені в цей процес, можна окремо виділити так звані проєкційні нейрони (ПН), більшість з яких знаходиться у I пластини сірої речовини. Проєкційні нейрони пластини I СМ відіграють важливу роль в передачі ноцицептивних периферичних впливів від первинних аферентних волокон до супраспінальних центрів, відповідальних за формування відчуття болю. Терміналі ПН пластини I локалізовані в латеральній парабрахіальній зоні довгастого мозку (Todd, 2010), тобто ці клітини можна кваліфікувати як спіно-парабрахіальні

нейрони (СПН). Крім того, досі було невідомим як СПН (головні генератори вихідного сигналу нейронної мережі СМ) кодують больові сигнали. Така інформація важлива для подальшого розуміння базисних фізіологічних механізмів ноцицепції та патогенезу больових синдромів.

Вивчення механізмів обробки та передачі больової інформації у нейронній мережі дорзального рогу спинного мозку важлива для подальшого розуміння базисних фізіологічних механізмів ноцицепції та патогенезу больових синдромів.

Недостатня ефективність фармакотерапії хронічного болю підкреслює важливість пошуку та розробки нових підходів до терапії даного стану. В цьому аспекті може виявитись перспективною терапія з використанням генної інженерії, оскільки при цьому можна орієнтуватися на конкретні тканинспецифічні механізми хронічного болю. Отже, розкриття основних клітинних механізмів обробки ноцицептивних сигналів нейронами ДР СМ є високо актуальним в аспекті розробки терапевтичних підходів терапії хронічного болю.

### **Розгляд описаних у дисертаційній роботі результатів, їхня наукова новизна та обґрунтованість**

В роботі К.С. Агашкова вперше показано, що популяція СПН пластини I ДР СМ є гетерогенною, і різних клітинних типів що виконують принципово різну фізіологічну роль в передачі ноцицептивних сигналів. Вперше виявлено, що різні типи СПН розрізняються за кількістю синаптичних входів від первинних аферентів. Встановлено, що більшість СПН є селективними детекторами больового сигналу, які генерують лише один ПД у відповідь на стимуляцію високопорогових первинних аферентів. В той же час лише 19% клітин усієї популяції СПН є інтеграторами активності локальних ноцицептивних мереж, робота яких залежить від процесів, пов'язаних зі збудженням NMDA-рецепторів. Ці нейрони підсилюють та інтегрують ноцицептивні сигнали, поступово кодуючи їх інтенсивність шляхом збільшення кількості ПД, що генеруються.

Було показано, що зміни збудливості СПН за рахунок посиленої активності ноцицептивних мереж ДР корелюють з больовою поведінкою тварин в моделі хронічного запального болю. Вперше доведено, що субпіальне введення вірусних конструктів AAV9-UBI-GAD65/VGAT ефективно збільшує гальмівний тону в нейронній мережі ДР СМ. Субпіальне введення AAV9-UBI-GAD65 і AAV9-UBI-VGAT забезпечує довготривалий антиноцицептивний ефект в моделі хронічного нейропатичного болю у мишей. Таким чином, в роботі вперше показано, що різні механізми обробки сигналів дозволяють нейронам СПН пластини І відігравати різні ролі в організації ноцицепції. Також в даній роботі вперше використано феномен перемикання збуджуючого фенотипу нейронів ДР СМ на переважно гальмівний за допомогою новітнього підходу, який базується на субпіальному введенні певних вірусних векторів. Це дає потенційну можливість розглядати використання перспективи даного підходу для терапії хронічного болю.

Практична цінність даної роботи полягає у встановленні того факту, що субпіальне введення вірусних конструктів, які викликають гіперекспресію ГАМК-синтезуючого ферменту GAD65 та везикулярного транспортеру ГАМК VGAT, призводить до зменшення загальної збудливості мережі поверхневих пластин ДР завдяки збільшенню загального гальмівного тону. Результати поведінкових дослідів, які демонструють явне зниження больової чутливості, дозволяють обґрунтувати проведення преклінічних експериментальних досліджень можливості використання генно-інженерного підходу для терапії хронічного больового синдрому.

### **Зауваження по суті роботи**

Експериментальні дані, отримані в роботі, відзначаються кількістю та якістю. Усі проведені дослідження та статистична обробка їх результатів виконані методологічно правильно, що не дозволяє сумніватися у високій достовірності представлених даних. Висновки дисертанта є досить добре обґрунтованими.

В процесі рецензування роботи виникли деякі зауваження та ряд запитань, які можуть бути предметом дискусії. А саме:

1. Ви працювали з багатоклітинними препаратами. Чому, на Ваш погляд, більшість розподілів числових даних не відповідали критерію нормальності? Чи пов'язано це з тим, що вплив на описуваний об'єкт є мультиплікативний, тобто. зовнішні впливи не просто адитивні, але і перемножуються, що обумовлено величезним числом зв'язків у досліджуваній системі? Чи відповідали вони логнормальному розподілу, тобто. логарифми цих величин мали нормальний розподіл?
2. Як оцінювався факт експресії генів кодуєчих глутаматдекарбоксилазу, GAD 65 та везикулярний транспортер ГАМК, VGAT в збуджуючих нейронах спинного мозку до і після введення вірусних конструктів.
3. Яким чином, здійснювалася ідентифікація нейронів саме пластини 1 Рекседа? Тільки за характером електричної активності?
4. Як саме змінювались параметри збудження та гальмування (і що більше змінювалося) в умовах інфікування вірусними конструктами? За рахунок чого в основному підвищувався гальмівний фон?
5. Відповідно до теорії ворітної контролю больова імпульсація може гальмується або ампліфікувати на рівні задніх рогів спинного мозку. Очевидно, що знеболюючий ефект може бути досягнутий як у випадку збільшення загального гальмівного фону в нейронній мережі, так і за рахунок впливу на вхідний збудливий ноціцептивний сигнал. Наприклад, усунувши розвиток феномена центральної сенсibiliзації за рахунок змін в нейронах другого порядку - тобто запобігти фосфорілюванню NMDA і AMPA рецепторів. Чому Ви вибрали саме перший варіант?

6. Чи є якась, типова для фармакологічної інтервенції, дозо-залежність при використанні даних конструктів?
7. Для моделювання периферичного запалення Ви використовували введення ад'юванта Фройнда. Зазвичай його використовують для моделювання ревматоїдного артриту, захворювання більш складного, ніж просто запалення. Чому не використали каррагеніновий або каоліновий набряк?

Однак висловлені зауваження ніяким чином не впливають на загальне позитивне враження від представленої роботи та не применшують її високого наукового рівня.

**Відповідність вимогам, які висуваються до дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата наук**

Результати дисертаційної роботи К.С. Агашкова у повному обсязі опубліковані у закордонних високореєтингових виданнях та пройшли всебічну апробацію на вітчизняних та міжнародних форумах. В цілому по темі дисертації опубліковано 10 наукових робіт, 2 з яких представлені у вигляді статей. Автореферат дисертації повністю відображає зміст дисертаційної роботи.

**Висновок.** Дисертаційна робота К.С. Агашкова «**Клітинні й мережеві механізми обробки ноцицептивних сигналів у спинному мозку та їх генно-інженерне модулювання як засіб терапії хронічного больового синдрому**» подана на здобуття вченого ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія, являє собою закінчене дослідження, та є завершеною високоякісною науковою працею, отримані автором дані суттєво збагачують уявлення щодо фізіології та патофізіології болю і мають значний практичний потенціал.

За актуальністю теми, науковою новизною, практичною значимістю, сучасним рівнем досліджень дисертаційна робота відповідає зазначеній спеціальності 14.03.04 – патологічна фізіологія, вимогам п. 11 "Порядку присудження наукових ступенів та присвоєння наукових звань України" (затверджено постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24.07.2013 р. і наказом №40 від 12.01.2017 р. МОН України), профілю Спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01, а її автор, К.С. Агашков, заслуговує на присудження наукового ступеню кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія

Завідувач відділу фармакології клітинних  
сигнальних систем та експериментальної терапії,  
Інститут фармакології та токсикології НАМН України,  
доктор медичних наук, професор

**А.І. Соловйов**

