

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

про науково-практичну цінність дисертаційної роботи

Кротова Володимира Вадимовича

“Зміни функціювання нейронної мережі поверхневих пластин

спинного мозку при хронічному болю різного генезу”

представлену на здобуття наукового ступеню кандидата біологічних

наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Актуальність напрямку досліджень

Дисертаційна робота Кротова В.В. присвячена з'ясуванню біофізичних, молекулярних і клітинних механізмів функціювання нейронної мережі поверхневих пластин спинного мозку при хронічному болю різного генезу. Цей напрямок досліджень є надзвичайно актуальним, адже хронічний біль є не тільки клінічною, але і значною економічною і соціальною проблемою. При цьому слід зазначити, що існуючі терапевтичні підходи до лікування хронічного болю дуже часто є малоефективними. Насамперед це пов'язано з недостатнім розумінням фундаментальних патофізіологічних механізмів, які опосередковують виникнення та стійкий характер хронічного болю. Таким чином, вивчення даних механізмів є однією з пріоритетних задач сучасної біології.

Хронічний біль викликає зміни функціювання як периферичної, так і центральної нервової системи. На даний момент патологічні процеси, які відбуваються в нейронах дорсально-корінцевих гангліїв, є краще дослідженими у порівнянні із змінами, які відбуваються у вторинних сенсорних нейронах дорсальних рогів спинного мозку. Проте є підстави вважати, що саме дослідження центральних механізмів хронічного болю може бути ключем до розробки ефективних стратегій його лікування.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретичне та практичне значення

В дисертаційній роботі В.В. Кротова аналізуються зміни збуджувальної та гальмівної синаптичної передачі у нейронній мережі поверхневих пластин дорсального рогу спинного мозку за умов периферичного запалення та травми спинного мозку. Таким чином, автор підходить до вирішення питання щодо розкриття спільних та відмінних механізмів виникнення хронічного болю різного генезу. Окрім суттєвого внеску в розуміння загальних механізмів розвитку та підтримання больових синдромів при наявності цих патологічних станів теоретичне значення досліджень також полягає у порівнянні цих механізмів при хронічному болю ноцицептивного та нейропатичного генезу. До практичної цінності дисертаційної роботи можна віднести встановлення антиноцицептивної дії дікатіонних сполук IEM 1460 та IEM 1925 - інгібіторів Ca^{2+} -проникних AMPA-рецепторів, а також блокатору протеїнкінази C черетрину за умов периферичного запалення.

В своїй роботі Кротов В.В. на основі аналізу відповідей нейронів на їх стимуляцію прямокутними імпульсами струму виділяє два основні підтипи нейронів поверхневих пластин дорсального рогу спинного мозку. За допомогою такого методичного підходу автор вперше зміг продемонструвати клітинну специфічність змін балансу збудження та гальмування в ноцицептивній мережі дорсального рогу спинного мозку.

Проведене автором дослідження спонтанних збуджуючих та гальмівних постсинаптичних струмів показало, що як при периферичному запаленні, так і при травмі спинного мозку відбувається посилення збудження, яке спостерігалось переважно у популяції переважно збуджуючих адаптивних нейронів, та його послаблення, що спостерігалось переважно серед гальмівних тонічних інтернейронів. У той же час синаптичне гальмування навпаки посилювалось у переважно гальмівних

тонічних нейронах та зменшувалося у переважно збуджуючих адаптивних нейронах. З цих даних логічно витікає один з основних висновків роботи, а саме - зміщення нейронного мережевого балансу збудження та гальмування у бік збудження є основною причиною розвитку гіперзбудливості нейронної мережі поверхневих пластин дорсального рогу спинного мозку в експериментальних моделях як периферичного запалення, так і травми спинного мозку. Відповідно до запропонованої автором загальної концепції це і є причиною виникнення хронічного болю.

З точки зору класичної біофізики викликає значний інтерес дослідження іонних механізмів, з якими пов'язані зміни нейронного мережевого балансу збудження та гальмування. Проведений автором аналіз кінетичних характеристик збуджуючих та гальмівних постсинаптичних струмів дозволяє зробити обґрунтовані висновки про зміни у субпопуляціях AMPA та гліцинових рецепторів в синапсах адаптивних нейронів. Продемонстровані ним відмінності у кінетичних властивостях окремих синаптичних подій доводять клітинну специфічність не лише нейронного мережевого балансу синаптичного збудження та гальмування, але і іонних механізмів, що лежать в його основі.

В дисертаційній роботі Кротова В.В. дані, що отримані з електрофізіологічних дослідів, доповнені результатами больових поведінкових тестів, в яких вивчався вплив дікатіонних сполук-інгібіторів Ca^{2+} -проникних AMPA-рецепторів та інгібітору їх регуляторного ензима, протеїнкінази C, на зменшення больового синдрому спричиненого периферичним запаленням. Було показано, що сполуки ІЕМ 1460, ІЕМ 1925 та челеретрин проявляли знеболювальну дію, яка свідчить про значний вклад Ca^{2+} -проникних AMPA-рецепторів у виникнення та підтримання хронічного болю при периферичному запаленні. Ці дані можна узгодити з результатами аналізу кінетики мініатюрних AMPA-

рецептор-опосередкованих струмів, який свідчив про, навпаки, ймовірно підвищену експресію Ca^{2+} -непроникних каналів в синапсах адаптивних нейронів. З іншого боку, дані літератури вказують на збільшення кількості Ca^{2+} -проникних АМРА-рецепторів в синапсах між первинними аферентами та нейронами поверхневих пластин спинного мозку. Для пояснення цього протиріччя автор пропонує гіпотезу щодо існування не лише клітинної, але і синаптичної специфічності змін іонних механізмів за умов хронічного болю.

Таким чином, отримані результати мають фундаментальне та прикладне значення, вони істотно доповнюють сучасні уявлення про клітинні, синаптичні і іонні механізми виникнення та підтримання хронічного болю.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи

Наведені в дисертації наукові положення базуються на використанні сучасних методів електрофізіологічних досліджень, достатній кількості проведених експериментів в кожній їх серії, ретельному і адекватному статистичному аналізу результатів, їх обговоренні в контексті літературних даних у даній галузі досліджень. Кротов В.В. показав себе компетентним експериментатором, який добре обізнаний з науковою літературою і здатний до критичного аналізу власних результатів.

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

Дисертаційну роботу виконано згідно з планами науково-дослідних робіт відділу сенсорної сигналізації Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України в рамках 4 науково-дослідних робіт, які виконувалися протягом 2010-2018 рр.

Структура і обсяг дисертації

Дисертаційна робота Кротова В.В. представлена за загально-прийнятою формою у повній відповідності до вимог МОН України. Роботу викладено на 126 сторінках, що включає в себе вступ, огляд літературних даних, описів матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень, обговорення і узагальнення результатів досліджень, висновки та список цитованої літератури (157 джерел). Отримані результати проілюстровані 54 рисунками, які дають повне уявлення про значну кількість і високу якість проведених експериментів та адекватний аналіз отриманих результатів.

У вступній частині роботи чітко окреслено коло досліджуваних проблем стосовно механізмів виникнення і підтримання хронічного болю, обґрунтовано актуальність і важливість дослідження, сформульовано мету та завдання дослідження, підкреслено новизну роботи, її теоретичне і практичне значення, а також представлені відомості щодо особистого внеску здобувача, апробації результатів і публікацій за результатами дослідження.

В розділі 1 (Огляд літературних даних) автор висвітлює сучасний стан досліджуваної проблематики. Цей розділ складається з 7 підрозділів, в яких автор послідовно розглядає питання природи та фізіологічного значення болю, специфіку болю при запаленні та травмі спинного мозку, аналізує нейронні мережі поверхневих пластин спинного мозку та зміни збудливості нейронів при хронічному болю, а також зміни синаптичного збудження і гальмування при хронічному болю.

В розділі 2 (Матеріали і методи дослідження) пояснені методи оцінювання термічної і механічної больової чутливості, відповідні експериментальні моделі хронічного болю різного генезу, метод отримання “гострих” зрізів спинного мозку, використані в роботі конфігурації методу петч-клемп та нестационарний флуктуаційний аналіз

постсинаптичних струмів. Ці експериментальні методи, а також підходи до статистичного аналізу цілком відповідають загальній меті та поставленим завданням дослідження.

В розділі 3 (Результати досліджень) представлені основні результати досліджень, зокрема ті, що характеризують клітинні, синаптичні і біофізичні механізми виникнення хронічного болю на рівні поверхневих пластин спинного мозку, проведені детальні порівняння на моделях болю запального характеру і при травмі спинного мозку. З використанням фармакологічних модуляторів Ca^{2+} -залежних AMPA рецепторів і протеїнкінази C продемонстровано практичне значення отриманих результатів для розробки нових підходів до лікування хронічного болю.

В останньому розділі (Обговорення результатів) особлива увага приділена питанням центральної сенситизації, гіперзбудливості нейронної мережі поверхневих пластин спинного мозку, клітинної специфічності виявлених змін збуджуючої та гальмівної передачі за умов хронічного болю.

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

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті

Матеріали дисертації у повній мірі опубліковані у 6 статтях у наукових фахових журналах та 9 тезах доповідей у матеріалах вітчизняних і міжнародних наукових конференцій. В авторефераті дисертаційної роботи по кожному розділу викладені і проілюстровані основні результати, зроблені висновки, а в анотації роботи стисло викладена суть роботи.

Під час рецензування дисертаційної роботи виникли наступні запитання та зауваження:

1. Методи: зазначається, що “середньоквадратичне значення шуму не перевищувало 3 пА при фіксації потенціалу на -70 мВ та 4-4,5 пА при фіксації на рівні 0 мВ” – обов’язково треба одночасно зазначати частотну смугу реєстрації струмів.
2. Результати, що проілюстровані на Рис. 3.1 можуть свідчити про різницю у пасивних електричних властивостях тонічних і адаптивних нейронів, а саме - постійна часу (RC) видається більшою в адаптивних нейронах, що теоретично сприяє більш ефективній інтеграції синаптичних подій у часі і у просторі. Чи враховувався цей фактор у даній роботі? Якщо ні, то можна побажати доповнити аналіз синаптичних подій аналізом відмін у пасивних електричних властивостях (зокрема можливих змін входного опору клітини при запаленні і травмі спинного мозку) у подальших дослідженнях.
3. Одним з дуже цікавих, але і значною мірою дискусійних питань, яке ставить це дослідження, є питання співвідношення між Ca^{2+} -проникними і Ca^{2+} -непроникними підтипами AMPA рецепторів, а також ролі протеїнкінази C. Відомо, що активація протеїнкінази C викликає сенситизацію рецептора тепла і капсаїцина TRPV1, відомого як “класичний” рецептор болю, який експресований в сенсорних нервових закінченнях. Хоча в роботі і згадується посилення активності первинних аферентів, варто було б приділити більше уваги обговоренню співвідношення між периферичними і центральними механізмами сенситизації до больових стимулів.
4. Варто було б краще пояснити зв’язок між гіперзбудливістю ноцицептивної нейронної мережі спинного мозку при хронічних больових синдромах і досліджуваними синаптичними подіями, адже останні як такі напевно не впливають на поріг генерації збудження

(тобто виникнення потенціалу дії), а отже на збудливість нейронів в її класичному розумінні. З іншого боку, в роботі не досліджувались потенціалкеровані провідності, які в основному і визначають збудливість нейронів.

5. Провідність поодиноких каналів сформованих постсинаптичними AMPA-рецепторами оцінювали з використанням аналізу флуктуацій струму. Строго кажучи, такий аналіз передбачає існування гомогенної популяції іонних каналів з однаковою провідністю, і тому виникає питання - наскільки це справедливо для AMPA рецепторів, більшість яких як відомо є гетеротетрамерами, що можуть складатися з 4 різних субодиниць? Відомо, що в залежності від субодиничного складу ці рецептори можуть мати різну провідність і кінетику (Smith et al. J Neurosci 2000, 20(6), 2073-2085).
6. Аналіз флуктуацій постсинаптичних струмів дозволяє оцінити не тільки провідність іонного каналу, а і кількість каналів та ймовірність їх відкритого стану (P_o) – чи проводився такий аналіз? Зокрема дані, що проілюстровані на Рис. 3.27, можуть свідчити про збільшення не тільки провідності, а і P_o при ТСМ порівняно з контролем.
7. Челеритрин ефективно послаблював больовий синдром, зменшуючи термічну гіперчутливість. Також відомо, як вже згадувалося вище, що при хронічному запаленні відбувається сенситизація TRPV1, і це пов'язано з активацією протеїнкінази C. Чи враховувалася така можливість як альтернативний шлях участі протеїнкінази C у досліджуваній моделі хронічного болю?
8. В роботі трапляються деякі неточні або невдалі терміни: “ап-регуляція каналів”; “фасилітація синаптичного збудження”; “вказував на подовження кінетики”; разом з терміном “периферичні нерви” трапляється і “периферійні нерви” – у даному випадку слід завжди використовувати термін “периферичні нерви” у значенні “який

стосується зовнішньої частини організму, віддаленої від його центральної частини". Так само це стосується і терміну "периферійне запалення".

Слід підкреслити, що висловлені зауваження і побажання до подальших досліджень суттєво не впливають на загально високу оцінку даної дисертаційної роботи.

Висновок:

Згідно з пунктами 9, 11, 12, 13 "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24 липня 2013 р. (зі змінами), вважаю, що за своєю актуальністю, науковою новизною, високим методичним рівнем, теоретичною та практичною значністю, об'ємом проведених досліджень, обґрунтованістю та достовірністю зроблених узагальнень і висновків, а також перспективами наукового і практичного застосування дисертаційна робота Кротова Володимира Вадимовича *"Зміни функціонування нейронної мережі поверхневих пластин спинного мозку при хронічному болю різного генезу"*, відповідає всім вимогам до дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата наук, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 - біофізика.

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.

Підпис О.В. Жолоса засвідчує
Заступник директора
Вирішник (Вирішник О.В.)

