

В І Д Г У К

**офіційного опонента
на дисертаційну роботу
КОПАЧ ОЛЬГИ ВОЛОДИМИРІВНИ
«КЛІТИННІ ТА МОЛЕКУЛЯРНІ СПІНАЛЬНІ МЕХАНІЗМИ
НОЦИЦЕПЦІЇ ЯК МІШЕНІ ДЛЯ КОРЕГУВАННЯ ХРОНІЧНИХ
БОЛЬОВИХ СИНДРОМІВ», що подана на здобуття
наукового ступеня доктора біологічних наук
(спеціальність: 03.00.13 – Фізіологія людини і тварин).**

АКТУАЛЬНІСТЬ ОБРАНОЇ ТЕМИ

Я думаю, навряд чи варто аргументувати, на рівні цього Відгуку, чому, як у науково-теоретичному (фундаментальному), так і в практичному відношенні, є суттєвим комплексне дослідження іонних, молекулярних та мембранних механізмів хронічного болю як у центральній нервовій системі, так і периферичній. Адже хронічний біль призводить до невідворотніх втрат внаслідок зниження працездатності людей, їхніх страждань, а також до суттєвих витрат на профілактику охорони здоров'я. Біль не мінує нікого, вона, в принципі, не залежить від соціального статусу та освіти людини, її віку, статі, світогляду... Втім, на теперішній час маємо відсутність авторитетної універсальної dokonаної наукової концепції щодо фундаментальних механізмів виникнення та підтримання хронічного болю. Очевидно, що без створення такої концепції навряд чи є можливими науково-обґрунтований пошук перспективних мішеней у терапії больових синдромів та розбудова фармакологічних засобів ефективного полегшення больових відчуттів.

Ось чому я вважаю трансдисциплінарну дисертаційну роботу О.В.Копач, яку було виконано «на перехресті» Фізіології, Патолофізіології, Біофізики, Молекулярної біології та Біомедицини під керівництвом професора Н.В.Войтенко, і присвячено з'ясуванню спінальних механізмів ноцицепції для подальшого пошуку та обґрунтування новітніх біотехнологічних підходів з метою корекції хронічних больових синдромів, актуальною як в теоретичному, так і в практичному аспекті.

По-суті, дисертацією О.В.Копач є сукупність наукових статей за вищезазначеною тематикою із детальним аналізом сучасного стану фахової проблеми та запропонованим рішенням щодо її експериментального вирішення.

Компоненти (проте, треба сказати, достатньо канонічні) аналізу докторської дисертації О.В.Копач, які дозволили мені скласти враження щодо її роботи, є наступні:

1) звичайно, опонент читав автореферат роботи, розмірковував над науковими результатами, що були одержані дисертанткою;

2) я знайомився з науковими працями дисертантки;

3) у свій час я був присутній на одній з наукових доповідей Ольги Володимирівни;

4) опонент безпосередньо обговорював з дисертанткою результати її досліджень.

І зараз, готуючи цей «Відгук» (травень м-ць 2020 р.) для подання у Спеціалізовану вчену раду Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, я щиро сподіваюся, що під час захисту дисертації Ольга Володимирівна Копач зробить на засіданні ради цікаву наукову доповідь, надасть опонентам, членам Спецради та усім присутнім конкретні та змістовні відповіді на їхні запитання.

Отже, на підставі проведеного мною аналізу цієї дисертаційної роботи, формулюю свої уявлення щодо найбільш важливих науково-теоретичних та практичних результатів докторської дисертації О.В.Копач.

СТУПІНЬ ОБҐРУНТОВАНOSTІ НАУКОВИХ ПОЛОЖЕНЬ, ВИСНОВКІВ ТА РЕКОМЕНДАЦІЙ, СФОРМУЛЬОВАНИХ У ДИСЕРТАЦІЇ

Ступінь «надійності» одержаного фактичного матеріалу, обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у роботі, є, як мені здається, достатньо високим. Що ж є запорукою такої моєї оцінки «надійності» зазначеної дисертаційної роботи?

1/. Слушне залучення дисертанткою сучасних експериментальних методів, які цілком відповідають меті та задачам дослідження.

При виконанні роботи було використано широкий спектр експериментальних методів та підходів сучасної фізіології та фізико-хімічної біології клітини, а саме:

- фізіологічних: технологія введення тест-речовин в інтратекальний простір спинного мозку, моделювання хронічного болю різного генезу;
- біофізичних: реєстрація іонних струмів у режимі локальної фіксації мембранного потенціалу (patchclamp) в конфігурації "ціла клітина" (whole-cell), флуоресцентне вимірювання внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію ($[Ca^{2+}]_i$);
- молекулярної біології: real-time PCR та Western-blot;

- генної інженерії;
- нанотехнології;
- фармакології;
- поведінкові тести на лабораторних тваринах;
- математичних: оцінка провідностей поодиноких каналів;
- статистичних.

Я повинен відзначити, що всі експериментальні методи та прийоми описані в авторефераті дисертації вельми конкретно та ретельно. І вже на етапі вивчення методичної частини роботи я прийшов до висновку, що О.В.Копач є добрим експериментатором. Достатньо згадати, наприклад, методику вживлення катетеру у спинномозковий канал, що була розроблена дисертанткою; використання такого підходу дозволило багаторазово вводити досліджувані речовини у нижні рівні спинного мозку під оболонки спинного мозку, що істотно підвищило ефективність тест-сполук та локальність їх дії.

2/. Сукупність якісного наукового фактичного матеріалу, який подано у роботі.

Щодо конкретних наукових даних, одержаних при виконанні дисертації, то я їх проаналізую нижче. Натомість тут лише відзначу, що викладання автором власних результатів органічно пов'язане з метою та завданнями дисертації, а також із ґрунтовним аналізом відповідних літературних даних. Висновки, що були зроблені в дисертаційній роботі, в цілому адекватно віддзеркалюють фактичні експериментальні результати, які одержала О.В.Копач.

3/. Надійна попередня апробація накопичених дисертанткою матеріалу на різноманітних наукових конференціях, симпозіумах та семінарах, а також на сторінках фахових наукових журналів.

Практично всі матеріали дисертаційної роботи були апробовані на рівні доповідей та їх обговорення на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях, симпозіумах та семінарах (Україна, Велика Британія, Італія, Швейцарія, Нідерланди, Іспанія, Франція, Німеччина, Польща, США, Бразилія, Японія). Сукупно фактичні дані та наукові погляди автора знайшли віддзеркалення у 14 статтях (опублікованих у виданнях, віднесених до першого і другого квартилів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports) та 42 тезах міжнародних конференцій та з'їздів.

4/. Високий особистий науковий потенціал, притаманний дисертантці.

По-перше, на сторінках автореферату вона вдумливо та всебічно проаналізувала стан відповідної медико-біологічної наукової проблеми, яка стосується дослідження клітинних та молекулярних механізмів, що залучені у підтримання хронічного болю різного генезу у нейронних мережах. У комплексному ж аспекті у мене склалося

враження, що науковий рівень літературного висвітлення О.В.Копач фахового (за темою дисертації) питання цілком відповідає формату найновіших уявлень сучасних нейронаук з відповідної проблеми.

По-друге, ще раз відзначаю наступне: виконання такої комплексної трансдисциплінарної наукової роботи вимагало від дисертантки не тільки ґрунтовної підготовки у галузі нейрофізіології, але й у галузі патофізіології, електрофізіології, біофізики та молекулярної біології. Це для мене стало остаточно очевидним при особистому спілкуванні з дисертанткою.

ДОСТОВІРНІСТЬ І НОВИЗНА НАУКОВИХ ПОЛОЖЕНЬ, ВИСНОВКІВ ТА РЕКОМЕНДАЦІЙ, СФОРМУЛЬОВАНИХ У ДИСЕРТАЦІЇ

Результати проведеного мною аналізу фактичних даних, які були одержані дисертанткою, свідчить на користь того, що відповідні експериментальні результати є достовірними. Новизна наукових положень, сформульованих у дисертації, полягає у наступному.

Дисертанткою було здійснено ґрунтовне дослідження спінальних механізмів ноцицепції для подальшого пошуку та обґрунтування новітніх біотехнологічних, зокрема, наноінженерних підходів, з метою корекції хронічних больових синдромів. Експериментальні дані, які були одержані, свідчать про низку нових, невідомих раніше, феноменів у функціонуванні складного комплексу клітинних та молекулярних спінальних механізмів, що залучені у підтримання хронічного болю у нейронних мережах дорзального рогу спинного мозку. Згідно з одержаними даними вважаю за потрібне лаконічно відзначити вибрані конкретні фундаментальні результати, що були одержані О.В.Копач при вирішенні відповідних наукових завдань, і які, по суті, є пріоритетними. Я б, суто суб'єктивно, окреслив, зокрема, такі 6 «блоків» фактичних авторських результатів, практично всі з яких є пріоритетними:

- Можна стверджувати, що дисертанткою обґрунтовано новий підхід для полегшення хронічних больових відчуттів шляхом селективного впливу на ланки молекулярного каскаду, що забезпечує регулювання динамічного обігу AMPA-рецепторів у сенсорних нейронах спинного мозку. Було продемонстровано причинно-наслідкові зв'язки між порушеннями регуляції функціонування AMPA-рецепторів на клітинному рівні та розвитком і підтриманням хронічного болю у експериментальних тварин;
- Вдалося встановити молекулярний механізм порушеного обігу AMPA-рецепторів при тривалому периферичному запаленні, охарактеризувати каскад внутрішньоклітинних

протеїнів, залучених у регуляцію синаптичного пулу рецепторів;

- Було доведено, що в сенсорних нейронах дорзального рогу спинного мозку функціонує чисельна популяція позасинаптичних AMPA-рецепторів, які характеризуються змінною проникністю до іонів Ca . Виявлено порушення обігу цих рецепторів при тривалому периферичному запаленні;
- Дисертанткою проілюстровано специфіку порушення обігу AMPA-рецепторів та зміщення балансу циклу збудження - гальмування у сенсорних нейронах різних підтипів;
- При виконанні роботи було продемонстровано терапевтичний вплив блокування Ca^{2+} -проникних AMPA-рецепторів високоселективними сполуками-інгібіторами нового покоління на полегшення больових синдромів з мінімальними побічними ефектами;
- Одним з найважливіших наслідків виконання дисертаційної роботи стало застосування новітніх підходів у галузі генної терапії та наноінженерії для практичного впровадження з метою корекції хронічного больового синдрому, а також для створення цільових біоматеріалів для потенційного впровадження у терапію.

Одночасно вважаю за потрібне підкреслити наступне:

- Для роботи О.В.Копач є властивим добрий методичний потенціал, бо дисертанткою, як я вже відзначав вище, були задіяні адекватні методи та методології сучасної фізіології, фізико-хімічної біології клітини та молекулярної біології. Зокрема, мова йде за реєстрацію іонних струмів у режимі локальної фіксації мембранного потенціалу (patchclamp) в конфігурації "ціла клітина" (whole-cell), внутрішньоклітинну Ca^{2+} -чутливу спектрофлюориметрію, real-time PCR та Western-blot, а також методи генної інженерії та нанотехнології;
- По-суті, хоча ця робота являє собою дослідження з нейронаук і захищається у галузі фізіології людини і тварин, вона, однак, має всі ознаки трансдисциплінарного дослідження (і це дуже добре !); дійсно, як на мене, її сприйняття та, особливо, подальший розвиток, можливі лише у тісному зв'язку з такими науками та науковими напрямками, як біофізика, біофізична хімія, молекулярна біологія нервової клітини, фармакологія, а також медична біологія;
- Для дисертаційного матеріалу є властивим високий наочний рівень подання фактичних даних (я це особливо ціную !). Маю на увазі велику кількість змістовних та

інформативних у науковому відношенні рисунків, наведених в тексті автореферату дисертації – 23. Втім, якщо ж приймати до уваги субрисунки «а», «б» та т.і., то їхня кількість буде значно більша – 67 !;

- У тексті роботи має місце змістовне, і, що особливо є важливим, критичне обговорення дисертанткою як літературних, так і власних експериментальних результатів;

- В цілому ж текст автореферату добре написаний, рукопис оформлений вельми акуратно.

Опонент не має сумнівів, що відповідні теоретичні результати, які були одержані О.В.Копач при виконанні докторської дисертації, в науковому відношенні є цілком достовірними та авторитетними.

ЗАПИТАННЯ ТА ЗАУВАЖЕННЯ

Натомість, на мою думку, є необхідність задати дисертантці декілька дискусійних запитань та висловити міркування щодо одержаних нею наукових результатів, зробити деякі зауваження.

1/. Питання стосується застосування активаційнозалежних блокаторів, які вводилися інтратекально у поперековий відділ спинного мозку (рис.17). Як бачимо, таке введення не призводило до змін сенсорної чутливості різних модальностей у контрольних тварин, проте мало наслідком наочний антиноцицептивний ефект у тварин із периферичним запаленням. Це було продемонстровано для двох досліджуваних сполук (IEM-1460 та IEM-1925) у послабленні гіперчутливості до теплових стимулів вже протягом годин після інтратекального введення. Як виявилось, ефект блокаторів був дозозалежним і тривав принаймні сім днів поспіль. Таким чином, тривалість больового синдрому помітно зменшувалася. Зокрема, механічна гіперчутливість (поріг болю) відновлювалась до контрольного рівня протягом 2-3 днів. Хотілося б почути від дисертантки більш ретельну та комплексну інтерпретацію молекулярних та клітинних механізмів вищеописаних явищ за участі активаційнозалежних блокаторів.

2/. Мова йде за схему та, відповідно, за механізм інтерналізації GluR2-вмісних AMPA-рецепторів із синапсів між первинними аферентами та ноцицептивними нейронами дорзального рогу спинного мозку при периферичному запаленні (рис. 4). Яка роль тут іонів Mg, які наочно позначені на лівій панелі (контроль) цього рисунку?

3/. В своїй роботі дисертантка основну увагу приділила встановленню ролі та регуляції функціонування AMPA-рецепторів у нейронах дорзального рогу спинного мозку за умов наявності хронічних больових синдромів різного генезу. Втім, якщо в широкому

масштабі торкатися питання іонних, молекулярних, мембранних та клітинних спінальних механізмів ноцицепції як мішені для коригування хронічних больових синдромів, то, в контексті створення універсальної dokonanoї наукової теорії щодо фундаментальних механізмів виникнення та підтримання хронічного болю, чи не є важливим, з точки зору дисертантки, також, й вивчення ролі, у реалізації зазначених механізмів, і інших мембранних структур (зокрема, що стосуються транспорту іонів Ca) – ендоплазматичного ретикулуму, мітохондрій?

4/. Мені здається, у тексті автореферату дисертантці варто було б навести «акордний абзац - резюме», який би у сконденсованому вигляді підвів підсумки експериментальної частини роботи. Більш того, так мені здається, у цьому «акордному абзаці - резюме» не завадило б, мабуть, й окреслити перспективи подальших досліджень у галузі вивчення спінальних механізмів ноцицепції для майбутнього пошуку та обґрунтування новітніх біотехнологічних підходів з метою корекції хронічних больових синдромів. Така цікава та актуальна робота, безсумнівно, повинна мати подальший розвиток – але, у якому напрямі, з точки зору дисертантки?

5/. Автореферат дисертації написано доброю українською мовою. Однак я не впевнений, що фрагментарне використання автором «кальок» таких іншомовних термінів, як «таргетування», «трафікінг», було вкрай необхідним. Безперечно, можна було застосувати українськомовні аналоги цих термінів.

6/. У тексті автореферату спостерігаються невдалі у стилістичному відношенні вирази, є описки.

Проте варто відзначити, що вищенаведені запитання та зауваження мають переважно лише дискусійне та суто профілактичне значення, бо вони спрямовані виключно на подальший розвиток цікавих трансдисциплінарних досліджень О.В.Копач у галузі нейронаук.

ПОВНОТА ВИКЛАДУ НАУКОВИХ ПОЛОЖЕНЬ, ВИСНОВКІВ ТА РЕКОМЕНДАЦІЙ, СФОРМУЛЬОВАНИХ В ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЯХ ТА У ДИСЕРТАЦІЇ

Опонент стверджує, що наукові положення, висновки та рекомендації, які сформульовані в авторефераті докторської дисертації, достатньо повно викладені в опублікованих авторських друків О.В.Копач.

(ЩОДО ВІДПОВІДНОСТІ ДИСЕРТАЦІЇ ВСТАНОВЛЕНИМ ВИМОГАМ

Оцінюючи докторську дисертацію О.В.Копач сукупно, треба відзначити «доконаність» її роботи в цілому. Науковий зміст автореферату є адекватним фактичним даним та основним положенням дисертаційної роботи. Оформлення автореферату відповідає вимогам, що встановлені ДАК МОН України. Докторська дисертація О.В.Копач, де розділами дисертації є публікації здобувача (у кількості не менше 10 у виданнях, віднесених до першого і другого квартилів (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, затверджених наказом Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. № 40 (zareestrovano у Міністерстві юстиції України 03.02. 2017 р. за № 155/30023)).

ВАЖЛИВІСТЬ ДЛЯ НАУКИ І ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ
ОДЕРЖАНИХ АВТОРОМ ДИСЕРТАЦІЇ РЕЗУЛЬТАТІВ.
РЕКОМЕНДАЦІЇ ЩОДО ЇХНЬОГО ВИКОРИСТАННЯ

У науково-теоретичному (фундаментальному) відношенні результати, що були одержані при виконанні дисертації, віддзеркалюють **особистий пріоритетний внесок О.В.Копач у подальший розвиток сучасних уявлень щодо молекулярних та клітинних механізмів хронічного болю**. Дисертантці вдалося ідентифікувати порушення динамічного обігу AMPA-рецепторів - центрального механізму, що опосередковує підтримання хронічного болю різного генезу, з'ясувати молекулярний механізм зазначених порушень і, що суттєво, запропонувати нові підходи для полегшення хронічних больових синдромів. **По-суті, автором сформована гіпотеза щодо ключового внеску центральних механізмів у підтримання хронічного болю, науково обґрунтовані нові підходи для терапії хронічного болю різного походження.**

Стосовно ж **практичного аспекту роботи** я можу відзначити наступне. При її виконанні були розроблені **нові біотехнологічні підходи для полегшення хронічного болю, в основі яких є фармакологічна корекція порушень функціонування AMPA-рецепторів у нейронах дорзального рогу із використанням інгібіторів нового покоління та застосуванням генної терапії** (нок-дауна РКСа за допомогою антисенсових олігонуклеотидів). Терапевтичні ефекти були наочно продемонстровані дисертанткою на експериментальних тваринах, результати, що були одержані,

відкривають нові можливості для розробки новітніх методів у боротьбі з хронічним запальним болем (дисертанткою одержано патент на корисну модель). Розроблений О.В.Копач, із застосуванням нанотехнологій, підхід може бути практично залучений в клініці для цільової доставки локальних анестетиків та інших високоактивних сполук зі зменшенням їх потенційних побічних ефектів.

Втім, я не виключаю, що, на підставі одержаних даних, О.В.Копач, після захисту дисертації, цілком могла б підготувати до друку, разом із своїм науковим консультантом професором Н.В.Войтенко, змістовну фахову **монографію**. Для цього є всі підстави, я думаю.

В цілому ж, я вважаю, що результати, одержані дисертанткою під час виконання роботи, є перспективними для подальшого прогресу сучасних знань у галузі фізіології та нейронаук, перш за все – для пошуку новітніх біотехнологічних засобів для лікування хронічного болю та обґрунтування клінічних підходів до сучасної терапії больових синдромів.

ВИСНОВОК

Докторська дисертація О.В.Копач являє собою актуальне та оригінальне високоякісне пріоритетне комплексне фундаментальне дослідження в галузі нейронаук, якому наочно притаманні риси трансдисциплінарності («Фізіологія» + «Патофізіологія» + «Молекулярна біологія» + «Фармакологія» + «Біомедицина», і таку «суперпозицію», безперечно, варто вітати !). При виконанні роботи використовувалися адекватні методи та методології не лише фізіології, але й біофізики, молекулярної біології, генної інженерії, нанотехнології, фармакології.

По-суті, у роботі були вивчені клітинні та молекулярні спінальні механізми підтримання хронічного болю у спинному мозку. Мова йде за дослідження активності сенсорних нейронів та нейронних мереж дорзального рогу спинного мозку, а також поведінкових проявів больових відчуттів при експериментальному моделюванні хронічних больових синдромів різного генезу та їх корекції. Були ідентифіковані порушення динамічного обігу AMPA-рецепторів - центрального механізму, що опосередковує підтримання хронічного болю різного генезу, з'ясовані молекулярні механізми таких порушень, запропоновано нові підходи для полегшення хронічних больових синдромів. Вдалося сформулювати гіпотезу щодо ключового внеску центральних механізмів у підтримання хронічного болю, науково обґрунтувати нові підходи для терапії хронічного болю різного походження. Розроблений підхід із застосуванням нанотехнологій може бути реально залучений для спрямованої доставки

високоактивних сполук, зокрема, локальних анестетиків, зі зменшенням їх потенційних побічних ефектів при використанні у клініці. В цілому ж дані, що були одержані дисертанткою під час виконання роботи, є перспективними для подальшого вивчення нагальних проблем у галузі нейронаук, перш за все – для пошуку новітніх біотехнологічних засобів для лікування хронічного болю та обґрунтування клінічних підходів до сучасної терапії больових синдромів.

У мене немає сумнівів, що О.В.Копач – здібний та перспективний молодий дослідник у галузі фізіології та фізико-хімічної біології нервової клітини, для неї є властивим широкий науковий світогляд, добрий творчий, методологічний та методичний потенціал, здатність до проведення самостійного активного наукового пошуку, що акцентований на вирішення нагальних проблем сучасної фізіології, зокрема, у галузі нейронаук.

Тому, безсумнівно, за результатами своєї дисертаційної роботи Копач Ольга Володимирівна заслуговує на присудження їй вченого ступеня доктора біологічних наук із спеціальностей 03.00.13 – Фізіологія людини і тварин.

Офіційний опонент –
академік НАН України,
доктор біологічних наук, професор,
заступник директора з наукової роботи
та завідувач відділу біохімії м'язів
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України,
Лауреат Державної премії України в галузі науки і техніки
та Премії ім. О.В.Палладіна НАН України,
Заслужений діяч науки і техніки України

С.О.Костерін

20 травня 2020 р.

