

ВІДЗИВ

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

Біль, як фізіологічний, так і патологічний, є важливою клінічною проблемою. Принципи обробки больових сигналів за фізіологічних умов поки що є недостатньо вивченими, а, отже, їх дослідження є важливою задачею для сучасної медицини. Патологічний (хронічний) біль є однією з найпоширеніших причин звернень за медичною допомогою. Щонайменше 40% людей в розвинених країнах стикаються з проблемою хронічного болю. Таким чином, хронічний біль є дуже значною клінічною та соціальною проблемою. При цьому слід визначити, що розробка ефективних терапевтичних підходів до його лікування відбувається досить повільно.

Хронічний біль викликає зміни функціонування як периферичної, так і центральної нервової системи. Вивчення процесів обробки та передачі больової інформації у структурах ЦНС відбувається дуже інтенсивно, хоча детальні механізми ще не вивчені до кінця. Інформація про функціонування нейронної мережі заднього 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 тканиноспецифічні механізми хронічного болю. Отже, розкриття основних клітинних механізмів обробки ноцицептивних сигналів нейронами заднього рогу спинного мозку є високо актуальним в аспекті розробки терапевтичних підходів терапії хронічного болю.

Дисертаційна робота К.С. Агашкова присвячена аналізу специфічних клітинних та мережевих механізмів обробки ноцицептивних сигналів в задньому розі спинного мозку для

обґрунтування новітнього генно-інженерного підходу для терапії хронічного больового синдрому.

Теоретичне значення цих досліджень полягає в тому, що вони істотно доповнюють сучасні уявлення про функціональні характеристики елементів нервової тканини і, зокрема, проєкційних нейронів І пластини спинного мозку та їх ролі в розвитку хронічного болю. Одержана інформація також може допомогти в розумінні механізмів виникнення і пошуку засобів запобігання розвитку досліджуваних патологій. Практичне значення отриманих результатів полягає в пропозиції новітнього генно-інженерного засобу терапії хронічного больового синдрому. Ці дані можуть стати основою для розробки високоселективних сполук для лікування болю різного генезу, що має значний інтерес для медицини.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації.

В дисертаційній роботі К.С. Агашкова розглядаються популяції спіно-парабрахіальних нейронів заднього рогу спинного мозку та їх роль в ноцицептивній передачі. Вперше показано що ця популяція є гетерогенною, складається з різних клітинних типів, що виконують принципово різну фізіологічну роль. Розглянуто різну фізіологічну роль цих нейронів як за фізіологічних, так і за умов індукованного хронічного патологічного больового синдрому. Ці дані помітно покращують як наше розуміння механізмів кодування та інтеграції ноцицептивних сигналів на рівні СМ, так і загальне розуміння клітинних процесів, які лежать в основі формування болю.

Ступінь надійності одержаного фактичного матеріалу, обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у роботі, є дуже високим. Ось складові, що гарантують цей високий ступінь:

1. Коректне використання дисертантом сучасних експериментальних методів, які відповідають меті та задачам дослідження. При виконанні роботи були задіяні, зокрема, такі методичні підходи:

- *моделювання різних типів больових синдромів (запальний та нейропатичний біль);*
- *електрофізіологічні вимірювання на унікальному препараті цілого спинного мозку (реєстрація струмів у клітинах проводили методом петч-клеп в конфігурації ціла клітина);*

- *новітня методика доставки вірусних конструктів, що забезпечує високоспецифічну інфекцію нейронів заднього рогу, та відсутність можливих побічних реакцій, викликаних цією процедурою.*;

- *методи дослідження поведінки піддослідних тварин (тести вимірювання сенсорної чутливості);*

- *статистичні методи обробки отриманих результатів.*

У методичному розділі також ретельно описані підходи щодо приготування препаратів цілого спинного мозку та дослідів з ним, охарактеризовані розчини, що були використані в експериментах, а також описано технологію субпіяльного введення вірусних конструктів.

2. Сукупність змістовного фактичного матеріалу, який подано у експериментальній частині роботи. Викладання власних експериментальних результатів Агашковим К.С. органічно пов'язано з метою та завданнями дисертації, а також із ґрунтовним аналізом літературних даних. Висновки, що були зроблені у роботі, цілком віддзеркалюють фактичні результати, які одержав дисертант.

3. Надійна попередня апробація накопиченого фактичного матеріалу на різноманітних авторитетних наукових конференціях, симпозіумах та семінарах, а також на сторінках фахових наукових журналів. Основні положення дисертації доповідалися на наукових форумах в Україні, Європі та США. Головні експериментальні результати знайшли віддзеркалення на сторінках авторитетних фахових міжнародних журналів, які дуже ретельно рецензуються.

4. Високий науковий потенціал, притаманний дисертантові. По-перше, на сторінках дисертації автор вдумливо та всебічно проаналізував велику кількість літературних даних за темою дисертації – у рукопису наведені посилання на 209 друкованих робіт. Загалом складається таке враження: аналітичний рівень висвітлення Агашковим К.С. питання щодо сучасного стану досліджень у галузі молекулярних механізмів хронічного болю безперечно відповідає рівню найновіших світових уявлень із цієї проблеми. По-друге, виконання такої фундаментальної кандидатської дисертації вимагало від автора не тільки ґрунтовної теоретичної та методичної підготовки у галузі патофізіології, що, відповідно до мети роботи, є цілком зрозумілим, але й, безперечно, знань із біофізики та електрофізіології.

**Достовірність і новизна наукових положень, висновків та рекомендацій,
сформульованих у дисертації.**

Використовуючи сучасні методичні підходи К.С. Агашковим отримано нові знання про те, що популяція спіно-парабрахіальних нейронів пластинки I дорзального рогу спинного мозку є гетерогенною, і різні типи нейронів виконують принципово різну фізіологічну роль в передачі ноцицептивного сигналу. Вперше було виявлено, що різні типи СПН відрізняються за кількістю аферентних входів від первинних аферентів. Він вперше показав, що зміни збудливості спіно-парабрахіальних нейронів за рахунок посиленої активності ноцицептивних мереж заднього рогу відображають больові поведінкові реакції тварин в моделі хронічного запального болю у щурів.

В своїй роботі К.С. Агашков використовує новітню методику доставки вірусних конструктів, що забезпечує високоспецифічну інфекцію нейронів заднього рогу, та відсутність можливих побічних реакцій викликаних цією процедурою. Сильною стороною дисертаційної роботи є вплив на вивчені клітинні механізми за допомогою вірусних конструктів, що містять ГАМК-синтезуючий фермент GAD65 та везикулярний транспортер ГАМК VGAT. Це приводить до зменшення загальної збудливості мережі поверхневих пластин заднього рогу 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.

Одночасно хочу підкреслити наступне:

- для всього дисертаційного матеріалу властивий високий наочний рівень подання фактичних даних. Дисертація проілюстрована 24 кольоровими рисунками;
- є підстави стверджувати, що дисертант володіє навичками активного застосування математичного апарату для кількісного аналізу власних експериментальних даних та їхньої інтерпретації;
- у тексті роботи має місце змістовне та критичне обговорення дисертантом власних експериментальних результатів. Зокрема, дуже важливим варто вважати намагання автора надати інтегральну картину клітинних та мережевих механізмів обробки ноцицептивних сигналів в задньому розі спинного мозку.

Запитання, зауваження та рекомендації по суті роботи

Експериментальні дані, отримані в роботі, відзначаються кількістю та якістю. Дисертація в цілому написана гарною мовою і більшість проведених експериментів докладно обговорюється. Усі проведені дослідження та статистична обробка їх результатів виконані методологічно правильно, що не дозволяє сумніватися у високій достовірності представлених даних. Висновки дисертанта є добре обґрунтованими. Проте існує кілька зауважень, які стосуються оформлення роботи:

1. В роботі наявний ряд термінологічних неточностей, які необхідно усунути. Наприклад, «*супрамаксимальний*», «*апрегуляція*», «*трафікінг*», «*детектування*», «*Z-стек*» є неадаптованими транслітераціями англійських відповідників. Як ще один приклад можна відзначити постійне вживання словосполучення «дорзальний ріг» - єдиною українським анатомічним терміном, що означає цю структуру, є «задній ріг». Сумніви також викликає термін "*гальмівний тон*" - чи не є він жаргонізмом?
2. З огляду на використання вірусних конструктів в якості впливу на експресію генів доцільно було б оцінити не тільки функціональні зміни активності нейронів, що підлягали зазначеному впливу, а й зміни кількості РНК (GAD65 та VGAT) в нейронах, що були мішенями дослідження. Чи оцінювали ви зміни відповідних параметрів?
3. Цікаво було б дізнатися думку автора щодо специфічності вірусного впливу на нейрони спинного мозку: чому на рухову функцію вірусні конструкти не діють? Або, якщо вони все ж змінюють експресію (GAD65 та VGAT) в рухових нейронах, чому це не супроводжується змінами рухових функцій піддослідних щурів?
4. Зважаючи на майбутні клінічні перспективи, чи вважає автор оптимальним саме адено-асоційований вірусний вектор? Чи є доцільною розробка векторів на базі інших вірусів, ширше є більш тропними до нервової тканини і зможуть забезпечити більш адресну доставку терапевтичного гену (наприклад, вектори на основі вірусу простого герпесу)?

Деякі мінорні зауваження:

- Роздільна здатність деяких рисунків в авторефераті не є задовільною;
- Деякі скорочення в авторефераті нерозшифровані, наприклад, назви вірусних конструктів;
- В авторефераті відсутнє узагальнення дискусії, яка є тільки у дисертації.

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

Повнота викладу наукових положень, сформульованих в опублікованих працях та у дисертації.

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, одна з яких входить до першого квартилю (Q1) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank. Публікації цілком відповідають змісту дисертації. Автореферат дисертації повністю відображає зміст дисертаційної роботи.

Важливість для науки і народного господарства одержаних автором дисертації результатів. Рекомендації щодо їхнього використання.

У науково-теоретичному відношенні результати, що були одержані при виконанні дисертації, віддзеркалюють особистий фундаментальний пріоритетний внесок К.С. Агашкова у розвиток сучасних уявлень щодо функціонування нейронів спинного мозку в нормі та у патологічних станах нервової системи.

Дуже суттєвий аспект роботи – її перспективність. Дійсно, хоча вона, у певному розумінні, є закінченою, втім одержані К.С. Агашковим результати орієнтують дослідників на подальший науковий пошук у дуже цікавих напрямках.

Щодо практичного аспекту, то цінність цієї роботи полягає у наступному. По-перше, одержані дані є вкрай важливими для розробки нових підходів для лікування хронічного болю. По-друге, результати дисертаційної роботи можуть бути використані професорами та доцентами при читанні лекційних курсів по фізіології, патофізіології та неврології у вузах медикобіологічного профілю, що дозволить розширити уявлення майбутніх спеціалістів про клітинний та молекулярний рівні функціонування спінальних нейронів.

Отже, немає сумнівів, що практичні рекомендації, надані дисертантом, дійсно, являють собою вагомий внесок у сучасні фізіологію та медицину.

Відповідність дисертації вимогам Порядку присудження наукових ступенів.

Сукупно оцінюючи зміст кандидатської дисертації К.С. Агашкова необхідно відзначити цільність та завершеність роботи в цілому. В науково-ідеологічному аспекті зміст автореферату є

ідентичним основним положенням, викладеним у тексті дисертаційної роботи. Вважаю, що в цілому оформлення дисертації та її автореферату відповідає вимогам, що встановлені ДАК МОН України.

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» на здобуття вченого ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія, являє собою закінчене дослідження, що має істотне значення для медицини та патофізіології, оскільки містить нові науково обґрунтовані результати, які роз'яснюють функціонування ноцицептивно-специфічних проекційних нейронів спинного мозку у нормі та патології та демонструють антиноцицептивний ефект субпіальної ін'єкції вірусних конструктів, які викликають гальмування нейронних мереж спинного мозку.

За актуальністю теми, науковою новизною, практичною значимістю, сучасним рівнем дослідження 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 №1220 від 23.09.2019 р. МОН України), профілю Спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01, а її автор, К.С. Агашков заслуговує на присудження наукового кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія.

Заступник директора з наукової роботи

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова

НАМН України»

доктор медичних наук

старший дослідник



В.В. Білошицький