

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

доктора медичних наук, професора кафедри медико-біологічних основ фізичного виховання і фізичної реабілітації Вінницького державного педагогічного університету імені Михайла Коцюбинського МОН України

Власенка Олега Володимировича

на дисертаційну роботу

Короїда Костянтина Володимировича

«Властивості ноцицептивного аферентного входу в першу і десятю пластини спинного мозку щурів»,

подану до спеціалізованої вченої ради ID 10695 Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України для розгляду та проведення разового захисту на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія та біохімія в галузі знань 09 Біологія

1. Ступінь актуальності обраної теми

Вивчення механізмів больової сигналізації є надзвичайно актуальним питанням. Згідно до міжнародного діагностичного інтерв'ю CIDI 2,0, 60.4% опитаних людей в Україні відчували хронічний біль. На сьогодні проблема ефективного лікування болю різної етіології залишається одним із актуальних викликів для сучасної медицини. Хронічний біль часто супроводжується центральною сенсibiliзацією, тож навіть найсучасніші фармакологічні підходи виявляються недостатньо дієвими, оскільки не враховують усього спектра змін, що відбуваються в нервовій системі. Розробка нових знеболювальних стратегій ускладнюється тим, що наше розуміння організації та регуляції сенсорної системи за нормальних умов, а також змін, які відбуваються під час патологічних процесів, досі є неповним. Саме це стоїть на перешкоді в пошуку і впровадженні новітніх методів купування больового відчуття.

Згідно сучасних уявлень больові сигнали проходять крізь багатоетапну систему, яка охоплює як периферичну ланку (периферичні нерви, рецептори

в шкірі, м'язах, суглобах), так і складні мережі спинного та головного мозку. Особливої уваги заслуговують спинномозкові нейрони, адже вони є проміжною ланкою між первинними аферентами і вищими центрами больової обробки, передаючи сигнали про потенційно шкідливі подразники. Ці нейрони розташовані переважно в пластинці I дорсального рогу, мають специфічні електрофізіологічні властивості і відіграють важливу роль у формуванні адекватної больової реакції.

Гетерогенність морфофункціональних властивостей нейронів у дорзальному розі та різноманіття рецепторних систем (іонотропні, метаботропні глутаматні, ГАМКергічні, гліцинергічні) зумовлюють складні механізми передачі больового сигналу. Зокрема, іонотропні глутаматні рецептори, такі як AMPA, NMDA та каїнатні, забезпечують швидку передачу збудження, а NMDA-рецептори пов'язані з явищем синаптичної пластичності, що може призвести до посилення больових відчуттів у випадку їхньої гіперактивації. Таким чином, пошук нових методів лікування хронічного болю включає вивчення блокаторів TRPA1 і TRPV1, здатних інгібувати розвиток нейрогенного запалення, а також селективних інгібіторів NMDA-рецепторів, які можна застосовувати залежно від етіології та механізмів формування болю.

Важливим напрямом досліджень стає і пластинка X, що, серед іншого, інтегрує соматичну та вісцеральну ноцицептивну інформацію. Наявність у цій пластинці рецепторних систем, залучених до больової модуляції, зокрема TRPV1-рецепторів, вказує на те, що ця зона може брати активну участь у процесах центральної сенсibiliзації. Вивчення пластинки X разом з пластинкою I відкриває нові перспективи в пошуку мішеней для терапевтичного втручання, адже розуміння механізмів, що визначають перехід гострого болю в хронічний, дає змогу розробляти більш таргетні та ефективні методи лікування больових синдромів.

Таким чином, дослідження нейробиологічних механізмів болю, особливо за участю пластинки X спинного мозку, та пошук нових терапевтичних

мішеней залишається актуальним завданням сучасної нейронауки, що має важливе практичне значення для розробки ефективних методів лікування хронічного болю.

2. Оцінка наукового рівня дисертації і наукових публікацій здобувача

Текст дисертації викладений на високому рівні наукового письма та в логічному порядку. У дослідженні були поставлені складні, рівня світових пріоритетів актуальні мета та завдання. Так, метою дослідження було визначення механізмів передачі і обробки ноцицептивної інформації в І і Х пластинці поперекового відділу спинного мозку щурів в нормі та при хронічному болю. Згідно з метою були поставлені завдання з визначення генерації патернів потенціалів дії спиннопарабрахіальних нейронів І пластинки. Було поставлено завдання вивчити функціональну гетерогенність нейронів Х пластинки спинного мозку щура за патерном генерації потенціалів дії, а також довести залученість TRPV1 рецепторів у модуляцію спонтанної синаптичної активності нейронів Х пластинки. Визначити внесок глутаматних рецепторів у капсаїцин-індуковану активність нейронів Х пластинки.

Наукові положення базуються на аналізі великого масиву джерел літератури, включаючи публікації з провідних досліджень з обраної проблематики в рецензованих фахових виданнях. Для кожної із задач було реалізовано адекватні дизайни досліджень. Так, автором було використано такі методи дослідження: поведінкові тести для оцінки механічної і температурної больової чутливості щурів; методики селективного маркування спинномозково-парабрахіальних нейронів дорсального рогу спинного мозку щурів з використанням флуоресцентного ретроградного індикатора, що дозволяє отримати пряму візуалізацію; електрофізіологічна методика «patch clamp» для реєстрації електричної активності нейронів та іонних струмів у пластинках І і Х; реєстрація відповіді нейронів на

стимуляцію дорсального корінця електрофізіологічною методикою «patch clamp», методи математичної статистики. Висновки та рекомендації засновані на опрацьованих автором даних власного дослідження з проведенням відповідного статистичного аналізу, що підтверджує їх достовірність. Отримані результати оформлені у зрозумілий спосіб з вказанням усіх статистичних методів обробки і їх достовірностей. Кожен з розділів власних досліджень підкріплений публікаціями з колективом співавторів. Головні експериментальні результати знайшли віддзеркалення на сторінках авторитетного фахового міжнародного журналу третього квартіля. Науковий рівень цієї дисертаційної роботи та публікацій її результатів відповідає високим критеріям ступеня доктора філософії.

3. Новизна представлених теоретичних та/або експериментальних результатів проведених здобувачем досліджень, повнота викладу в опублікованих працях

У дисертації вперше показано зміни пропорцій електрофізіологічних типів нейронів в моделі нейропатичного болю. Також були встановлені нові типи нейронів за їх електрофізіологічними відповідями які характерні для патології. Продемонстровано, що деякі ноцицептивні нейрони пластинки І стають чутливими до низькопорогових невольових стимулів. Було показано, що в шурів в моделі часткового ушкодження сідничного нерву в пластинці І з'являються нейрони, які здатні спонтанно переходити в стан тривалої генерації потенціалів дії.

Було експериментально підтверджено, що ноцицептивні первинні аференти іннервують нейрони пластинки Х. За електрофізіологічними характеристиками вперше було показано що TRPV1 рецептори експресуються як на пресинаптичній так і на постсинаптичній мембранах.

Вперше показано що активація ванілоїдних рецепторів призводить до збільшення загальної фонові активності в мережі пластинки Х на прикладі мініатюрної постсинаптичної активності. Також показано, що існує два типи нейронів в пластинці Х за їх реакціями на активацію TRPV1 рецепторів. Показано складний двофазний характер змін в мініатюрній постсинаптичній активності у відповідь на активацію TRPV1.

Вперше було експериментально продемонстровано домінуючу роль АМРА рецепторів у формуванні змін спонтанної постсинаптичної активності при прикладанні агоніста ванілоїдного рецептора.

Матеріали дисертації у повному обсязі оприлюднені в публікаціях і на конференціях. За матеріалами дисертації опубліковано 7 друкованих робіт: одна стаття у міжнародному науковому журналі (який входить до третього квартиля відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank), одна стаття - у вітчизняному науковому журналі (індексованому у базах даних Web of Science Core Collection та Scopus) та 5 тез на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях.

4. Наукова обґрунтованість отриманих результатів, наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

У дисертаційному дослідженні Костянтин Короїд використав як загальновизнані методи досліджень, так і сучасні підходи, що дозволило виконати роботу на високому методичному рівні. Для виконання дисертаційної роботи здобувачем використано ряд методик, зокрема — маркування спинно-парабрахіальних нейронів, метод локальної фіксації потенціалу клітинної мембрани, метод отримання цілісних ex vivo препаратів спинного мозку для отримання доступу до нейронів I та X пластин спинного мозку та поведінкові тести. Всі маніпуляції з лабораторними тваринами проведено згідно норм біоетики та біологічної безпеки. Результати дисертаційного дослідження Короїда К.В. представлено на високому науковому рівні, а також наведено обговорення отриманих результатів у порівнянні із сучасними роботами інших авторів.

Положення та висновки, отримані автором у процесі дослідження, належним чином аргументовані та науково обґрунтовані. Достовірність сформульованих у дисертації наукових положень та висновків підтверджується кількісно, статистично та науковим описанням, їх науковим обґрунтуванням, яке базується на критичному осмисленні здобутків вітчизняних та зарубіжних вчених, застосуванням системного підходу,

відповідністю використаних наукових методів дослідження та математичної статистики (непараметричні тести Манна-Уїтні або Колмогорова-Смірнова, тест Шапіро-Вілка, t-тест Стюдента, для аналізу категорійних даних використовували точний тест Фішера, метод кластеризації К-середніх та метод силуету для оцінки кластеризації), структурованістю та логічною послідовністю етапів дослідження, значним обсягом опрацьованих джерел.

5. Рівень виконання поставленого наукового завдання, оволодіння здобувачем методологією наукової діяльності

Здобувач Костянтин Короїд, виконавши дисертаційне дослідження, продемонстрував спроможність самостійно планувати та вирішувати наукові задачі, глибоке розуміння проблематики, високий рівень наукового підходу до поставлених задач. Здобувачем було опановано нейрохірургічні підходи в експерименті, освоєні електрофізіологічні методи, методики збору та обробки отриманих даних, їх статистичний аналіз. Для всього дисертаційного матеріалу властивий високий наочний рівень подання фактичних даних. Дисертація проілюстрована рисунками, що дає підстави стверджувати, що дисертант володіє навичками кількісного аналізу власних експериментальних даних та методиками їхньої інтерпретації. У тексті роботи також має місце змістовне та критичне обговорення експериментальних результатів.

На основі вищевикладеного вважаю, що здобувач Короїд оволодів методикою наукової роботи в об'ємі, що відповідає рівню ступеня доктора філософії та набув компетентностей для самостійного наукового пошуку.

6. Теоретичне і практичне значення результатів дослідження

Вивчені дисертантом інтегративні властивості нейронів I та X пластин спинного мозку мають вагоме як теоретичне, так і практичне значення. Встановлені закономірності реакцій нейронів у відповідь на стимули різної модальності розширюють нейрофізіологічні уявлення про формування

ноціцептивних механізмів на рівні спинного мозку. Показана відмінність у реакціях нейронів І та Х пластин спинного мозку. Визначено внесок глутаматних рецепторів різних типів у капсаїцин-індуковану активність нейронів Х пластинки, доведено залученість TRPV1 рецепторів у модуляцію спонтанної синаптичної активності нейронів Х пластинки. Отримані дані свідчать про інтегральну роль TRPV1-рецепторів у модуляції спонтанної синаптичної активності нейронів пластинки Х та їх можливу участь у формування больових синдромів.

В подальшому описані автором теоретичні закономірності та механізми можуть бути використані для розробки фармакологічних і терапевтичних впливів на хронічний біль, а експериментальна установка і методичні підходи, використані автором, будуть слугувати засобом отримання результатів на доклінічному етапі.

7. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому

Дисертаційна робота написана відповідно до вимог, які регулюють написання дисертацій, має належну структуру. Рукопис поданий за класичною послідовністю, викладений на 122 сторінках друкованого тексту. Основна частина містить 28 рисунків, список використаних джерел включає 78 найменувань.

Дисертація представлена такими розділами:

Анотація, що складається зі українського та англійського тексту, містить стислий переказ основних пунктів дисертаційного дослідження та перелік ключових слів.

Зміст і перелік умовних скорочень, має достатньо детальну структуру однак підрозділ «Додатки» не вказаний.

У **вступі** (9 сторінок) описано актуальність досліджуваної проблеми, вказано зв'язок з іншими дослідницькими темами, сформульовано мету і завдання дослідження, наведено публікації, в яких викладено результати наукової роботи.

Огляд літератури помістився на 20 сторінках, має підрозділи і детальний опис що відомо у світовій літературі з даного питання. Автор зосередив свою увагу на сегментарних механізмах ноцицепції та хронічного болю.

Розділ **«Матеріали і методи»** на 20 сторінках, присвячений опису великого переліку протоколів і апаратів для дослідження, наведено багато ілюстрацій.

«Результати власних досліджень» на 37 сторінках, матеріал не розділений на кілька розділів, що відрізняється від традиційної схеми описання власних результатів. Наведені оригінальні малюнки, дано детальний опис отриманих даних. Наукова новизна і фундаментальна значущість цього матеріалу незаперечна. Як зауваження, можна відмітити відсутність в кінці розділу переліку власних публікацій.

Обговорення результатів досліджень на 12 стор., дана характеристика власних результатів у порівнянні із даними літератури.

«Висновки» цілком відповідають поставленим завданням, сформульовані коректно і логічно.

Список використаної літератури на 9 стор., містить 78 джерел, в ньому не подано власні публікації автора.

Додатки – на 2 стор.,

8. Рекомендації щодо подальшого використання результатів дисертації в практиці

Результати дисертаційного дослідження можуть бути використані для розробки терапевтичних засобів боротьби з хронічним болем. Рекомендую втілити напрацювання дисертанта в педагогічному процесі профільних кафедр вищих навчальних медичних закладів України для розкриття механізмів та ілюстрування таких патологічних станів, як алодинія, гіпералгезія та спонтанний біль.

9. Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації, запитання до здобувача

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 добре обґрунтованими.

Проте існує кілька зауважень, які стосуються оформлення роботи:

1. Згідно вимог щодо оформлення дисертації, затвердженими наказом МОН України від 12 січня 2017 р. № 40 (зі змінами, внесеними наказом МОН України від 31 травня 2019 р. №759), «8. У вступі подається загальна характеристика дисертації, а саме: - особистий внесок здобувача (якщо у дисертації використано ідеї або розробки, що належать співавторам, разом з якими здобувачем опубліковано наукові праці, обов'язково зазначається конкретний особистий внесок здобувача в такі праці або розробки; здобувач має також додати посилання на дисертації співавторів, у яких було використано результати спільних робіт)».

В дисертації **Костянтина Короїда** у відповідному розділі не зазначено, що він є співавтором однієї публікації (Volodymyr Krotov, Kirill Agashkov, Sergii Romanenko, **Kostiantyn Koroid**, **Marharyta Krasniakova**, Pavel Belan, Nana Voitenko. (2023) Neuropathic pain changes the output of rat lamina I spino-parabrachial neurons. BBA Advances. 3. 100081. <https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2023.100081> (Q3)) із **Красняковою Маргаритою Євгенівною**. Вона захистила у 2024 році дисертацію на тему: «Регуляція больової сигналізації поперекового відділу спинного мозку щурів».

2. Друге зауваження також стосується невідповідності «Вимогам щодо оформлення дисертації». Згідно п.9, «У розділах дисертації має бути вичерпно і повно викладено зміст власних досліджень здобувача наукового ступеня, зроблено посилання на всі наукові праці здобувача, наведені в

анотації. Список цих праць має також міститися у списку використаних джерел». У дисертації Костянтина Короїда нема посилань на власні публікації ні в розділі 3 «Результати досліджень», ні в списку використаної літератури.

Під час наукової дискусії хотілося би почути думку дисертанта з таких питань.

Запитання до здобувача:

1. У Ваших експериментах виконувалося пошкодження сідничного нерва за методикою Decosterd I. and Woolf C. (2000) у оригінальній модифікації. З якою метою її було запроваджено і які наслідки вона мала?

2. Що Ви можете сказати про функціональне призначення виявлених Вами трьох типів нейронів X пластинки спинного мозку: односпайкових, тонічних та відтермінованих?

3. Які перспективи для розробки нових знеболювальних препаратів відкривають Ваші дослідження?

10. Відсутність (наявність) порушень академічної доброчесності

Рукопис дисертації було перевірено на наявність можливих порушень правил академічної доброчесності системою сервісу “StrikePlagiarism”: оригінальність тексту дисертаційної роботи склала 99%. Наявні текстові збіги відповідають тексту дисертації Костянтина Короїда, розміщеному на сайті разової ради ID 10695, власним публікаціям автора, загальновживаним термінам. Усі цитовані фрази містять посилання на відповідні першоджерела. Внаслідок перевірки матеріалів дисертації Короїда Костянтина Володимировича можна стверджувати, що в роботі відсутні ознаки порушення правил академічної доброчесності, відсутній академічний плагіат, самоплагіат, фабрикації або фальсифікації, не виявлено маніпуляцій із алфавітом, пробілами, прихованим текстом.

Отже, текст дисертації є оригінальним, а подані до захисту наукові досягнення є власним напрацюванням здобувача.

11. Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

Робота за актуальністю, обсягом, методичним рівнем, а також за теоретичною новизною, ступенем обґрунтованості та достовірності наукових положень повністю відповідає вимогам “Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії”, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44 (зі змінами та доповненнями), та відповідає напрямку наукових досліджень освітньо-наукової програми Біологія та біохімія (Біофізика; Фізіологія людини і тварин; Патологічна фізіологія), а Костянтин Короїд заслуговує на присудження ступеня доктора філософії зі спеціальності 091 Біологія та біохімія.

Офіційний опонент

професор кафедри медико-біологічних
основ фізичного виховання і фізичної
реабілітації Вінницького державного
педагогічного університету імені Михайла
Коцюбинського доктор медичних наук,
професор
Олег ВЛАСЕНКО

11. Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

Робота за актуальністю, обсягом, методичним рівнем, а також за теоретичною новизною, ступенем обґрунтованості та достовірності наукових положень повністю відповідає вимогам “Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії”, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44 (зі змінами та доповненнями), та відповідає напряму наукових досліджень освітньо-наукової програми Біологія та біохімія (Біофізика; Фізіологія людини і тварин; Патологічна фізіологія), а Костянтин Короїд заслуговує на присудження ступеня доктора філософії зі спеціальності 091 Біологія та біохімія.

Офіційний опонент

професор кафедри медико-біологічних
основ фізичного виховання і фізичної
реабілітації Вінницького державного
педагогічного університету імені Михайла
Коцюбинського доктор медичних наук,
професор
Олег ВЛАСЕНКО

Знач

Зразок підпису	<i>Власенко О.В.</i>
Засвідчую	<i>Власенко О.В.</i>
Начальник відділу кадрів	<i>Власенко О.В.</i>
" 29 " 08 . 2022 р.	2022