

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу ТКАЧЕНКА Юрія Миколайовича «ОСОБЛИВОСТІ КОДУВАННЯ ТЕМПЕРАТУРНОЇ ТА pH-ЧУТЛИВОСТІ У ПЕРВИННИХ НОЦИЦЕПТОРАХ МИШЕЙ», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – Біофізика

Актуальність дисертаційної роботи.

Перш за все хочу відзначити, що встановлення біофізичних та біохімічних механізмів контролю больової чутливості, що виникає під дією хімічних, механічних та термічних стимулів, а також розробка ефективних засобів її зменшення, є одним із ключових завдань сучасної біомедицини.

Адже для мене є цілком очевидним, що така постановка питання має важливе значення для охорони здоров'я та добробуту населення. Втім, незважаючи на значні досягнення, що мають місце в нейронауках та біомедицині на теперішній час (зокрема, я маю на увазі ідентифікацію ключових ноцицептивних рецепторів за допомогою генетичних і електрофізіологічних методів), наше розуміння іонних, молекулярних, мембранних та клітинних механізмів, які забезпечують сенсорну трансдукцію змін зовнішнього середовища в нервовий імпульс на чутливих закінченнях сенсорних нейронів, залишається недостатнім. Безперечно цікавим є питання щодо біохімічних та фізико-хімічних закономірностей активації ноцицептивних аферентів сенсорних нейронів шкіри. Відомо, що пошкодження тканин і розвиток запального процесу супроводжуються вивільненням нуклеозидтрифосфату - аденозинтрифосфату (АТФ), локальним ацидозом і підвищенням температури, що, в свою чергу, спричиняє розвиток болю та гіпералгезії. Натомість зниження температури в зоні ураження зазвичай призводить до зменшення інтенсивності больових відчуттів. Вважається, що в організмі ссавців головну роль у сприйнятті кислотності відіграють H^+ -чутливі іонні канали. Водночас інші молекулярні структури, зокрема Na^+H^+ -антипортери і рецептори капсаїцину та теплових стимулів у ноцицепторах (ванілоїдний рецептор перехідного потенціалу першого типу), також беруть участь у реакції на ацидоз.

Таким чином у цій роботі мова йде, зокрема, за вивчення впливу двох фізико-хімічних факторів – температури T та концентрації протонів H^+ на активацію ноцицептивних аферентів сенсорних нейронів шкіри під дією больових стимулів.

І тут треба відзначити, що дуже важливим є методологічний та методичний аспекти цього дослідження. Адже була необхідність розробити метод довготривалої та стабільної реєстрації електричної активності від поодиноких аферентів, які іннервують шкіру; дійсно, такий підхід надав би змогу здійснювати контрольовану стимуляцію чутливих нервових закінчень, досліджувати їхні фармакологічні властивості, що вкрай суттєво.

Дисертаційна робота Ткаченка Юрія Миколайовича як раз і спрямована на з'ясування впливу температури на активацію ноцицептивних аферентів сенсорних нейронів шкіри під дією больових стимулів. Зокрема, увага була акцентована на ідентифікації рецепторів, що беруть участь у сприйнятті змін температури T в межах фізіологічно нешкідливого теплового діапазону, а також проведенні аналізу механізмів збудження цих закінчень за умов помірного зниження позаклітинного pH . Тому вважаю цю роботу актуальною як у науково-теоретичному (фундаментальному), так і в практичному відношенні.

Перед тим, як написати цей Відгук, опонент:

- 1.Прочитав текст дисертації;
- 2.Ознайомився з вибраними публікаціями дисертанта;

3. Мав з ним особисту співбесіду, під час якої він надав мені додаткові роз'яснення щодо результатів своєї роботи.

На підставі проведеного мною аналізу формую своє враження від дисертаційної роботи Ю.М. Ткаченка.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертаційна робота має канонічне оформлення і містить стандартні розділи: «Анотація», «Список публікацій за темою дисертації», «Зміст», «Перелік умовних скорочень», «Вступ», «Огляд літературних даних», «Матеріали та методи досліджень», «Результати досліджень», «Обговорення результатів», «Висновки», «Список використаних джерел». Роботу викладено на 173 сторінках тексту, проілюстровано 41 рисунками та графіками (і я вітаю активне залучення автором великої кількості одиниць ілюстративного матеріалу при описі експериментальної частини дисертації). Вважаю, що структура та обсяг дисертації оформлені відповідно до вимог, що існують.

Ступінь обґрунтованості, достовірності наукових положень, висновків, рекомендацій.

Обґрунтованість та достовірність одержаних у роботі експериментальних результатів забезпечена, як я вважаю, перш за все, використанням адекватних методичних підходів, а також надійною статистичною обробкою кількісних результатів, що були одержані.

Щодо методів. Вони в дисертації описані дуже ретельно. Мова йде за методику реєстрації електричної активності поодиноких аферентів у препараті «шкіра–нерв» миші. Описане фенотипування сенсорних аферентів за швидкістю проведення та за чутливістю до механічних стимулів, охарактеризовані в методичному аспекті процедури хімічної та термальної стимуляції чутливих закінчень сенсорних аферентів, а також проведено аналіз їхньої електричної активності, надано інформацію про розрахунок відповідних енергетичних параметрів. Охарактеризована удосконалена методика реєстрації електричної активності шкірних аферентів у ізольованому препараті «шкіра - нерв» миші. Ретельно описані процедури, що пов'язані з реєстрацією трансмембранних струмів методом patch-clamp.

Повнота викладення результатів роботи в опублікованих працях.

Відзначаю, що за результатами своєї роботи Ю.М.Ткаченком опубліковано 5 статей у фахових наукових журналах та 5 тез доповідей у збірниках матеріалів наукових конференцій і з'їздів. Основні положення дисертаційної роботи були представлені на VI Конгресі Українського товариства нейронаук (Київ, 2014), Українській конференції з нейронауки, присвяченій 90-річчю академіка Володимира Скока (Київ, 2022), IX Зустрічі Товариства біофізиків України (Київ, 2023), Міжнародній конференції з нейронаук та на Наукових читаннях, присвячених вісцеральній фізіології та патофізіології (Київ, 2024).

Наукова новизна отриманих результатів.

Опонент стверджує, що при виконанні роботи Ю.М.Ткаченком були одержані нові фундаментальні знання стосовно розуміння біофізичних та фармакологічних властивостей чутливих закінчень первинних ноцицепторів миші, зокрема охарактеризовані особливості їхньої чутливості до зміни таких фізико-хімічних факторів, як температура T та pH . В цілому ж результати цієї роботи розширюють наші уявлення про периферичні механізми ноцицепції та окреслюють перспективи пошуку нових фармакологічних мішеней знеболювальної дії.

Втім, я б, перш за все, відзначив наступні блоки авторських пріоритетних експериментальних та концептуальних результатів, що були одержані при виконанні дисертації:

1. Було оптимізовано та експериментально апробовано оригінальну методику реєстрації за допомогою скляного мікроелектроду електричної активності аферентних нервових волокон у випадку препаративного комплексу «шкіра-нерв» миші.

2. Одержано результати щодо важливої ролі температурозалежних механізмів у посиленні відповіді на пуринергічні та протонні стимули (зокрема, мова йде за можливу участь цьому процесі температурочутливих рецепторів). У той же час продемонстровано, що деполяризація через зниження градієнта K^+ у меншому ступені залежить від температури середовища.

3. На підставі аналізу авторських експериментальних результатів автор стверджує, що інші механізми протонної чутливості, які незалежні від протончутливого іонного каналу, також задіяні у забезпеченні реакції нервових закінчень на слабе закислення середовища. Отже, в цілому можна вважати, що периферичні механізми ноцицепції у випадку температурної та кислотної чутливості шкірними ноцицепторами є комплексними і забезпечуються узгодженою участю іонних каналів (протончутливий іонний канал, ванілоїдний рецептор перехідного потенціалу першого типу), а також пуринергічними $P2X_3$ -рецепторами та Na^+/H^+ -антипортером.

І тут я хотів би звернути увагу на наступне. Хоча ця робота цілком слушно захищається за спеціальністю 03.00.02 – біофізика, втім, вона по-суті, є трансдисциплінарною. Не важко побачити, що, як в методичному, так і в методологічному аспекті, дисертацію виконано «на перехресті» **«Біологія (біофізика, фізіологія, біоенергетика) + Біомедицина + Фармакологія + Фізична хімія»**. Я вітаю таку «суперпозицію» у цьому науковому пошуку: адже вона цілком віддзеркалює тенденцію розвитку сучасних Наук про Життя у XXI сторіччі.

В цілому ж хочу відзначити, що експериментальні дослідження Ю.М.Ткаченка виконані на доброму науково-методичному рівні, а методичні підходи (зокрема електрофізіологічні та фізико-хімічні), що були ним застосовані, є адекватними науковим завданням. Одержані дані вдумливо проаналізовані. Наукові положення та висновки, сформульовані на підставі аналізу одержаного фактичного матеріалу, базуються на достатній кількості експериментів, вони є обґрунтованими та достовірними, та, безперечно, відображують основний зміст дисертаційної роботи.

Практична цінність дисертації.

Безперечно, дисертантом були одержані змістовні експериментальні результати у галузі нейронаук, для яких є властивою наочна практична спрямованість. Ось що я маю на увазі. По-перше, мова йде за дані, які стосуються розробки нових підходів до

фармакологічної модуляції ноцицепції. По-друге, важливою є оптимізація методики реєстрації електричної активності шкірних аферентів, яка, є добрим підґрунтям для подальшого вивчення впливу біологічно активних сполук на шкірні сенсорні нервові закінчення та для з'ясування механізмів периферичної сенситизації (адже розроблений метод дає змогу надійно відтворювати позаклітинні записи електричної активності поодиноких нервових волокон у препараті «шкіра–нерв», що робить його зручним для застосування іншими дослідниками).

Запитання та зауваження.

Втім, як добре відомо, однією з рушійних сил для подальшого розвитку науки є творчі дискусії. Отже, маю деякі дискусійні запитання до дисертанта та зауваження до його роботи.

1. Як вважає дисертант – чи є різниця між поняттями «**вплив**» та «**регуляція**» у випадку вивчення дії на складні біофізичні та фізіологічні процеси (зокрема, на активацію ноцицептивних аферентів сенсорних нейронів шкіри) таких неспецифічних фізико-хімічних факторів, як температура T та pH , ефекти яких досліджувалися у дисертаційній роботі?

Відповідно, хотів би звернути увагу на наступне.

Як добре відомо, температура T та pH (як і іонна сила μ , діелектрична проникність D та в'язкість середовища η) – то є неспецифічні фізико-хімічні фактори.

Адже температура T , за Ейрінгом (теорія абсолютних швидкостей реакцій), буде впливати на константу швидкості першого порядку k **всіх** хімічних, фізико-хімічних та біохімічних процесів за законом:

$$k = q(k_0T/h)[\exp(-\Delta H^*/RT)]\exp(\Delta S^*/R) \quad (1),$$

де q – так званий трансляційний коефіцієнт, k_0 – постійна Больцмана, h – постійна Планка, R – універсальна газова стала, ΔH^* та ΔS^* – ентальпія та ентропія активації процесу відповідно. У більш спрощеному вигляді мова йде за закон Арреніуса:

$$k = A\exp(-E_a/RT) \quad (2),$$

де A – передекспоненційний множник (має ентропійну природу), E_a – енергія активації за Арреніусом.

Що ж стосується зміни $pH = -\lg[H^+]$, то вона буде впливати на іонізаційний стан **всіх** молекул та молекулярних комплексів, які містять хімічні групи, що здатні до іонізації - «протонування – депротонування» в залежності від значення величини $pK_i = -\lg K_i$, де K_i – константа іонізації хімічних залишків (згадаємо рівняння Гендерсона - Хассельбаха). Очевидно, що у випадку біологічних систем такими є практично усі біологічні молекули (амінокислоти, протеїни, нуклеїнові кислоти), а також рецептори та субклітинні мембранні структури.

2. Дисертант провів дослідження, при якому змінював температуру у середовищі в достатньо широкому її діапазоні, наприклад: 15 – 49 °C, 20 – 40 °C, 30 – 50 °C. Втім, як добре відомо, **контроль температурної залежності pH для буферних розчинів** (а дисертант, зокрема, використовував буфер HEPES) є важливим при експериментальному вивченні хімічних, біохімічних та біофізичних процесах, оскільки pH буферного розчину може змінюватися з підвищенням або зниженням температури. В результаті змінюється активність іонів водню, що, в свою чергу, впливає на ефективність буферних систем. Тому при проведенні pH -залежних лабораторних вимірювань або контролі pH у різних сферах наукового пошуку (в хімії, біології, медицині) важливо враховувати відповідні температурні поправки, оскільки

pH середовища інкубації може змінюватися навіть при незначних коливаннях температури. Тому в цих випадках при проведенні прецизійних вимірювань використовують температурні компенсації. Чи робив це дисертант? І яким чином?

3. Автор роботи, використовуючи в експериментах температурні діапазони 15 – 49 °C, 30 – 50 °C, мабуть все ж таки повинен був приймати до уваги, що для більшості ензимів ссавців оптимальною є температура 37-38 °C, бо при виході за межі температурного оптимуму (тобто при температурах більших, ніж оптимальні температури) буде спостерігатися інактивація ензиматичної активності. І важко сказати, як ця інактивація може впливати на біологічну відповідь (на рівні «кодування» температурної та pH-чутливості у первинних ноцицепторах мишей).

4. При розрахунку енергії активації E_a та температурного коефіцієнта Вант-Гоффа Q_{10} дисертант використовував наступні рівняння (буквально цитую зі стор. 65 дисертації):

$$Q_{10} = \frac{10E_a}{e^{RT(T+10)}} \quad (3)$$

$$Q_{10} = \left(\frac{X_2}{X_1}\right)^{10/(T_2 - T_1)} \quad (4)$$

Втім, зразу ж звертає на себе увагу наступне.

а/. З авторського виразу (3) автоматично маємо рівняння для визначення величини енергії активації E_a :

$$E_a = \{Q_{10} \exp[RT(T+10)]\}/10 \quad (5)$$

Не важко побачити, що у випадку рівняння (5) розмірність «зліва» не відповідає розмірності «справа». Втім, насправді коректне канонічне (класичне) рівняння для розрахунку енергії активації E_a через коефіцієнт Вант-Гоффа Q_{10} у випадку процесу, який підпорядковується рівнянню Арреніуса, безпосередньо маємо із вищенаведеного співвідношення (2):

$$E_a = [RT(T+10)/10] \ln Q_{10} \quad (6)$$

Отже, саме співвідношення (6), яке є науково обґрунтованим і яке виводиться в усіх загальних курсах біофізики, треба було використовувати автору роботи для визначення величини енергії активації E_a .

б/. Не зрозумілим є сенс авторського рівняння (4) (в тексті дисертації воно має номер (2.2)). Що таке X_1 та X_2 ? Ситуація взагалі стає більш заплутаною, якщо між собою прирівняти співвідношення (3) та (4).

5. При визначенні енергії активації E_a , розрахованої на основі вивчення температурної залежності спонтанної та викликанної електричної активності ноцицептивних аферентів шкіри, величину енергії активації E_a автор виражав у одиницях «кДж/моль» (розділ дисертації 3.1.5. « Q_{10} та енергія активації, розраховані на основі спонтанної та викликанної електричної активності ноцицептивних аферентів шкіри», стор. 92 - 93). Втім, як відомо, теорія Арреніуса та теорія Ейрінга (теорія абсолютних швидкостей реакцій) були розроблені для

аналізу енергетики саме елементарних хімічних реакцій, у цьому випадку величина E_a розраховується на 1 моль речовини, що вступає в реакцію, як різниця тепловмісту активованих та інертних молекул. Отже, у випадку кінетики та енергетики елементарних хімічних (в тому числі і біохімічних) реакцій параметр E_a , що розраховується в одиницях «кДж/моль», має чітке фізико-хімічне тлумачення. Втім, маю запитання – для такого фізіологічного процесу, як ноцицепція (зокрема, у випадку спонтанної та викликанної електричної активності ноцицептивних аферентів шкіри), який сенс має параметр E_a ? Адже ноцицепція – то є дуже складний та комплексний фізіологічний процес – сукупно вона забезпечується низкою рецепторних, каналних та сигнальних механізмів. **Відповідно, хочу почути точку зору дисертанта з такого питання: на моль чого автором розраховувалася величина E_a у випадку ноцицептивних аферентів шкіри (стор. 93 дисертації)?**

6. Не можна позначати розмірність концентрації речовин таким чином – «М/л», бо, як добре відомо з хімії, розмірність «М» – то вже є «моль/л». Коли автор позначає розмірність концентрації речовин як «М/л», то це означає, що мова йде за розмірність концентрації у таких одиницях: «М/л» = «(моль/л)/л» = «моль/л²», що не має сенсу. Очевидно, що це зауваження природним чином впливає із чіткого розуміння відмінності між поняттями «концентрація речовини» та «кількість речовини».

7. Так в чому ж полягають **ОСОБЛИВОСТІ (!)** кодування температурної та рН-чутливості у первинних ноцицепторах мишей (див. назву роботи)?

8. В тексті роботи зустрічаються опечатки, некоректні вирази.

Але я повинен наголосити, що вищенаведені зауваження не стосуються основних фактичних експериментальних результатів, що були одержані при виконанні дисертації, вони переважно мають рекомендаційний та профілактичний характер і «не б'ють» в коріння наукової роботи, а стосуються подальших досліджень у галузі нейронаук, зокрема при вивченні біофізичних механізмів температурної та рН-чутливості у випадку первинних ноцицепторів. В цілому ж ці зауваження не впливають на мою загальну позитивну оцінку одержаних наукових результатів роботи та відповідних висновків, що були зроблені дисертантом.

Висновок.

Вважаю, що дисертація Ткаченка Юрія Миколайовича «Особливості кодування температурної та рН-чутливості у первинних ноцицепторах мишей», що представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – Біофізика, робить внесок у наше більш глибоке розуміння біофізичних та фізико-хімічних властивостей чутливих закінчень первинних ноцицепторів, зокрема, особливостей впливу на них змін температури T та pH . Безперечно, ця робота має ознаки міждисциплінарного дослідження, бо її виконано «на стику» **Біологія (біофізика, фізіологія, біоенергетика) + Біомедицина + Фармакологія + Фізична хімія.**

1.Зміст дисертації повною мірою відповідає паспорту спеціальності 03.00.02 — біофізика.

2.Автореферат та опубліковані дисертантом праці повністю відображають зміст дисертаційної роботи.

3.На основі вищевикладеного вважаю, що представлена дисертаційна робота «Особливості кодування температурної та рН-чутливості у первинних ноцицепторах мишей» за своєю актуальністю, науковою новизною, практичною значущістю та достовірністю результатів дослідження повністю відповідає вимогам пунктів 9, 11–14 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р., що висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор, Ткаченко Юрій Миколайович, заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 — біофізика.

Офіційний опонент:

академік НАН України, доктор біологічних наук, професор,

завідувач відділу біохімії м'язів

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,

Лауреат Державної премії України в галузі науки і техніки,

Заслужений діяч науки і техніки України,

Лауреат премії ім. О.В.Палладіна НАН України,

Лауреат премії ім. П.Г.Костюка НАН України,

Лауреат премії ім. Тараса Шевченка

Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Сергій Костерін
Сергій КОСТЕРІН

18 серпня 2026 р.

Підпис *Сергія Костеріна*
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна
національної академії наук України
"18" 08 2026р.

