

В І Д Г У К

офіційного опонента доктора медичних наук, старшого дослідника Білошицького Вадима Васильовича на дисертаційну роботу **КРАСНЯКОВОЇ МАРГАРИТИ ЄВГЕНІВНИ** “Роль больової сигналізації поперекового відділу спинного мозку щурів”, представлену до захисту в разову раду ВНМУ ім. М.І. Пирогова ДФ 05.600.075, що утворена згідно з наказом виконувача обов’язків ректора ЗВО Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова (ВНМУ) № 65 від 28 квітня 2023 на підставі рішення Вченої ради ВНМУ ім. М.І. Пирогова № 7 від 27 квітня 2023 року з правом прийняття до розгляду та проведення разового захисту дисертації на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров’я» за спеціальністю 222 «Медицина».

1. Ступінь актуальності обраної теми

Вивчення механізмів больової сигналізації є надзвичайно актуальним питанням. Гострий біль пов’язаний із захистом організму від дії загрозливих факторів, обумовлює формування захисної поведінки і є спрямованим на підтримання гомеостазу організму. Хронічний біль не має подібного фізіологічного значення і є виснажливим станом, що значно погіршує якість життя пацієнтів. Такий стан є частим захворюванням і вражає приблизно 20% людей у всьому світі. На сьогоднішній день, кожен третій пацієнт із хронічним болем не реагує на доступні на сьогоднішній день методи лікування.

Обов’язком кожної системи охорони здоров’я є реалізація права людини на отримання ефективного лікування болю. Проблема хронічного болю має бути глобальним пріоритетом у системі охорони здоров’я.

Розробці методів лікування має приділятися більше уваги. Вивчення механізмів больової сигналізації, як і розробка новітніх підходів до лікування, є одними з пріоритетних напрямків дисертаційної роботи і відповідає актуальним напрямкам сучасної медицини.

Тому, дисертаційна робота Краснякової Маргарити Євгенівни на тему: «Регуляція больової сигналізації поперекового відділу спинного мозку щурів» є своєчасною та актуальною, оскільки спрямована на вирішення актуальної задачі – проблеми боротьби з хронічним болем.

2. Оцінка наукового рівня дисертації і наукових публікацій здобувача

Текст дисертації викладений на високому рівні наукового письма і в логічному порядку. У дослідженні були проставлені зрозумілі цілі і задачі.

Так, метою дослідження було визначення механізмів регуляції больової сигналізації поперекового відділу спинного мозку у щурів для пошуку потенційних мішеней для впливу на хронічний больовий синдром.

Згідно з метою були поставлені завдання з визначення різних субпопуляції спинномозково-парабрахіальних нейронів пластинки I дорсального рогу спинного мозку, що проводилося в залежності від кількості згенерованих потенціалів дії на супрамаксимальну стимуляцію первинних аферентів з встановленням їх можливої функціональної ролі у кодуванні сили та інтенсивності ноцицептивного аферентного входу. Було поставлено завдання встановити кількісні та якісні характеристики активності аферентних входів, насамперед С-волокон, до спинномозково-парабрахіальних нейронів I та II-го типів. Дослідити їх зміни в моделі хронічного болю. А також підтвердити залученість пластинки X у регуляції больової сигналізації і визначити шляхи регуляції первинних аферентних входів від нейронів пластинки X.

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 I і X; 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 авторитетних фахових міжнародних журналів, усі з яких відносяться до квартилю Q1 згідно з рейтингом наукових видань Scimago.

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

Результати дисертаційного дослідження несуть наукову новизну. Автором вперше було показано функціональну схожість пластинки X з основною ноцицептивно-проекційною пластинкою I дорсального рогу спинного мозку.

Дисертаційна робота і опубліковані праці виконані на сучасному науково-практичному рівні і базуються на достатній для розв'язання поставлених задач кількості досліджень. Методи досліджень, що використані в роботі, є сучасними, інформативними і адекватні поставленим завданням. Результати і

їх обговорення у повному обсязі були викладені на 137 сторінках дисертаційної роботи і опубліковані у трьох фахових виданнях.

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

Дисертаційна робота Маргарити Євгенівни Краснякової написана автором із використанням зрозумілих формулювань та логічних заключень. В дисертації обґрунтовано актуальність теми, висвітлені мета, завдання роботи, її наукова новизна та практичне значення.

Для досягнення поставленої мети і розв'язання поставлених задач авторка розробила адекватні дизайни досліджень. У дослідженнях виконувалися складні стереотаксичні і хірургічні операції та було використано найсучасніші електрофізіологічні методи дослідження.

Викладання власних експериментальних результатів органічно пов'язано з метою та завданнями дисертації, а також із ґрунтовним аналізом літературних даних.

Ретельне вивчення матеріалів дисертації, поданої на захист та її публікацій дає підстави стверджувати, що отримані результати, висновки, сформульовані положення базуються на достатньому експериментально підтверженому матеріалі. Дослідження ґрунтується на перевірених методиках та підходах, підтверджених публікаціями інших наукових груп, має сильну методологічну основу та не викликає сумнівів.

У цій роботі аналіз і обробка даних проводилися по загальній вибірці конкретного параметру усіх збуджувальних синаптичних подій в усіх клітинах (достовірність різниці між функціями ймовірності демонстрували тестом Колмогорова-Смірнова); статистична достовірність при аналізі медіанних значень параметрів по клітинах, оцінювалась за допомогою тесту Манна-Вітні. Для аналізу категорійних даних використовували точний тест. Різницю порівнюваних величин вважали достовірною, якщо ймовірність гіпотези була меншою, ніж 5 %

($p < 0,05$).

Висновки, що були зроблені в роботі, цілком віддзеркалюють задачі, підтвержені фактичними результатами, які одержала дисертантка і мають наукове, теоретичне та практичне значення.

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

Дисертантка показала високий рівень наукового підходу до поставлених задач, глибоке розуміння проблематики, спроможність самостійно планувати та вирішувати наукові задачі. Дисертанткою було опановано хірургію експериментальних тварин, електрофізіологічні методи, методика обробки отриманих даних, і статистичний аналіз.

Для всього дисертаційного матеріалу властивий високий наочний рівень подання фактичних даних. Дисертація проілюстрована рисунками, що дає підстави стверджувати, що дисертантка 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 Краснякова Маргарита Євгенівна оволоділа методикою наукової діяльності в об'ємі достатньому для ступеня доктора філософії і є самостійною дослідницею.

6. Теоретичне і практичне значення результатів дослідження

Збуджувальна та гальмівна синаптична активність у мережі нейронів I та X пластин дорсального рогу, прояви хронічного больового синдрому в експериментах на щурах, а також клітинні й мережеві механізми обробки ноцицептивних сигналів у спинному мозку та їх зміни при хронічному больовому синдромі, мають вагоме як теоретичне, так і практичне значення. Усі ці дані помітно покращують наше розуміння механізмів кодування та інтеграції ноцицептивних сигналів на поперековому рівні спинного мозку і

можуть бути корисними у подальшій розробці більш ефективних засобів лікування хронічного болю.

7. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому

Дисертаційна робота написана відповідно до вимог, які регулюють написання дисертацій, має відповідну структуру. Рукопис представлений за класичною структурою, викладений на 137 сторінках друкованого тексту. Рукопис представлено такими розділами:

Анотація, що складається зі стислого переказу основних пунктів дисертаційного дослідження.

У **вступі** описано актуальність досліджуваної проблеми, вказано зв'язок з іншими дослідницькими темами, сформульовану мету і задачі дослідження, наведено публікації, в яких викладено результати дослідження з вказанням вкладу дисертантки.

Огляд літератури написаний кваліфіковано. Він складається з основних фактів, які є підґрунтям досліджуваної проблем. Зміст цього розділу визначає ролі і класифікацію болю, в тому числі хронічного болю нейропатичного та запального генезу. Дисертантка приділяє достатньо уваги опису організації сірої речовини спинного мозку і функціональні особливості I та X пластинок. Особлива увага приділена опису спинномозково-парабрахіальних нейронів дорсального рогу, їх локальним нейронним мережам і ролі у передачі ноцицептивних стимулів. Поточний стан досліджень на основі аналізу статей інших дослідницьких груп дає інформацію про властивості та характеристики первинних аферентів та про розподіл їх терміналей в структурі дорсального рогу спинного мозку.

У розділі «**Матеріали і методи дослідження**» авторка вичерпно викладає і обґрунтовує дизайн і методіку дослідження, методи обробки даних, статистичні тести. Наведено детальний опис використаної моделі часткового пошкодження сідничого нерва, що є загальноприйнятою моделлю нейропатичного болю. Його модуляцію було підтверджено методиками

поведінкових тестів, а саме поведінковим тестом для оцінки механічної больової чутливості з використанням філаментів фон Фрея і поведінковим тестом Харгівса для оцінки термічної больової чутливості.

У роботі було використано методики селективного маркування спинномозково-парабрахіальних нейронів дорсального мозку щурів за допомогою стереотаксичних операцій, що дозволило стверджувати, що було записано електрофізіологічну активність саме від цих нейронів.

Цікавим є підхід до отримання *ex-vivo* препаратів спинного мозку для дослідження I і X пластинок. Досліди проводилися не за допомогою загальноприйнятої методики з використанням слайсів, а на цілому поперековому відділі спинного мозку щурів, що дозволило уникнути перерізання нервових волокон і максимально зберегти структуру локальної мережі. Для візуалізації клітин в зрізі великої товщини було використано методику бічного світлодіодного освітлення, що також детально описано в розділі.

Експериментальні дані були отримані з використанням методики «patch-clamp», у якій проводилася реєстрації іонних струмів від нейронів I та X пластинок. Отримані дані відзначаються кількістю та якістю.

Усі проведені дослідження та статистична обробка їх результатів виконані методологічно правильно, що не дозволяє сумніватися у високій достовірності представлених даних. Результати дослідження викладені в трьох розділах.

Розділ 3 описує, як саме спинномозково-парабрахіальні нейрони пластинки I спинного мозку відповідають на різні типи електричних стимулів. Ці ж зміни, але у моделі хронічного нейропатичного болю детально описані у **розділі 4**. Залученість пластинки X у ноцицептивну передачу і функціональні характеристики нейронів цієї пластинки докладно викладені у **розділі 5**. Дисертаційна робота має достатньо ілюстративного матеріалу для пояснення й візуалізації отриманих результатів.

У розділі 6 було також проведено **аналіз результатів дослідження** і зроблені висновки, що логічно витікають з отриманих результатів, і їх узагальнення.

Висновки сформульовані коротко, містять вичерпну і найбільш суттєву інформацію.

Бібліографія представлена коректно сформованим списком використаних джерел, що складається з 238 джерел. Додатки засвідчують, що результати були опубліковані, пройшли апробацію і були рекомендовані у впровадження в наукову роботу кафедр вищих навчальних медичних закладів України.

8. Рекомендації щодо подальшого використання результатів дисертації в практиці

Результати можуть бути ефективно впроваджені і використані у науковій роботі кафедр вищих навчальних медичних закладів і наукових установ України для розробки терапевтичних засобів боротьби з хронічним болем.

На основі літературного огляду, результатів дослідження, їх узагальнення та висновків рекомендую написати україномовну оглядову статтю, яка б описала сучасний стан досліджень відповідній галузі. Також рекомендується оформити патент на систему візуалізації спинномозково-парабрахіальних нейронів у цілому препараті спинного мозку шурів, яку було розроблено й використано в цьому дисертаційному дослідженні, та рекомендувати для широкого використання.

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. Наявні граматичні і стилістичні помилки у тексті дисертації.
2. В роботі наявний ряд термінологічних неточностей.

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

Запитання до здобувача:

1. Вами було використано загальновідому методику часткового пошкодження сідничого нерва у вашій модифікації. У чому полягала модифікація і з якою метою її було запроваджено?
2. Згідно пластинчастій організації системи розгалуження первинних аферентів, соматотопічний розподіл відбувається на основі діаметра та функції волокон. У вашій роботі на основі яких критеріїв ви робили висновок, що отримували моносинаптичні входи саме від A δ і C волокон?
3. Як проводилася статистична обробка результатів дослідження, які саме тести і для яких вибірок були використані?

10. Відсутність (наявність) порушень академічної доброчесності

Внаслідок перевірки матеріалів дисертації Краснякової Маргарита Євгенівни, можна стверджувати, що в роботі відсутні ознаки порушення правил академічної доброчесності, академічного плагіату, самоплагіату, фабрикації або фальсифікації, не виявлено маніпуляцій із алфавітом, пробілами, прихованим текстом.

Рукопис дисертації було перевірено на наявність можливих порушень правил академічної доброчесності системою сервісу “Unicheck”: оригінальність тексту дисертаційної роботи склала 92 %. Наявні збіги відповідають власним публікаціям, загальноживаними термінам і фразам, всі цитовані фрази містять посилання на відповідні першоджерела.

Подані до захисту наукові досягнення є власним напрацюванням аспірантки, текст дисертації є оригінальним.

11. Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

Дуже суттєвий аспект роботи – її перспективність. У певному розумінні, робота є закінченою, втім одержані Красняковою Маргаритою Євгенівною результати орієнтують дослідників на подальший науковий пошук.

Робота за актуальністю, новизною, обсягом, методичним рівнем, за теоретичною новизною, ступенем обґрунтованості і достовірності наукових положень повністю відповідає вимогам до оформлення дисертацій та положенню Постанови Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. №44 «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», оформлена згідно з наказом Міністерства освіти і науки України №40 від 12.01.2017 року, а Маргарита Краснякова заслуговує на присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина».

**Доктор медичних наук, старший дослідник,
старший науковий співробітник
науково-організаційного відділу
ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. Ромоданова
Національного академії
медичних наук України»**

Вадим БІЛОШИЦЬКИЙ