

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця
Національної академії наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Порхало Денис Федорович

УДК 573, 575, 577, 612

ДИСЕРТАЦІЯ

«Залежні від гіпоксії зміни експресії ізоформ фактору, що індукується гіпоксією,
у гіпокампі та медіальній префронтальній корі при моделюванні
посттравматичного стресового розладу»

09 Біологія

091 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело. Інструменти штучного інтелекту застосовувалися виключно як допоміжні засоби для редагування тексту, що детально описано у відповідному розділі роботи

Порхало Д.Ф. _____

Науковий керівник: Пашевін Денис Олександрович, кандидат медичних наук,
науковий співробітник відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту
фізіології ім. О.О. Богомольця

Київ - 2026

SUMMARY

D. Porkhalo. “Hypoxia-dependent changes in the expression of hypoxia-inducible factor isoforms in the hippocampus and medial prefrontal cortex in a model of post-traumatic stress disorder”. - Qualifying scientific work on the rights of a manuscript.

Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 09 - Biology in speciality 091 Biology. Bogomoletz Institute of Physiology of the NAS of Ukraine, Kyiv, 2026.

Post-traumatic stress disorder (PTSD) is one of the most common mental health disorders, the burden of which is particularly high amongst populations experiencing armed conflict, violence and large-scale disasters. Despite significant progress in the study of the psychological and neuroendocrine mechanisms of PTSD, its molecular nature remains poorly characterised, which complicates the development of pathogenetically grounded therapeutic strategies. This thesis tests the hypothesis regarding the involvement of hypoxia-inducible factors (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) and their associated molecules - the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) - in the molecular pathogenesis of PTSD, and the possibility of correcting the corresponding abnormalities using various types of hypoxic interventions was investigated.

The study was conducted in two consecutive stages on a single cohort of male rats using the single prolonged stress (SPS) model. In the first stage, the baseline molecular and behavioural phenotype of PTSD was established by comparing intact animals with those exhibiting an SPS-induced disorder. It was demonstrated that SPS reproduces a characteristic anxiety-like phenotype in the elevated plus maze (EPM) and dark-light box (DLB) tests, and, at the molecular level, is accompanied by a selective increase in the expression of HIF-1 α and HIF-2 α in the hippocampus (approximately 2.1-fold and 2.2-fold, respectively; $p < 0.05$) in the absence of significant changes in the medial prefrontal cortex (mPFC). This indicates region-specific activation of hypoxia-dependent signalling pathways as an early molecular component of post-traumatic adaptation.

In the second stage, three models of hypoxia were compared for the first time using a single model: intermittent hypoxic training (IHT), hyperbaric hypoxia (Bar) and chemical hypoxia induced by cobalt chloride (CoCl₂), were compared for the first time on a single model, based on their effects on behaviour and the expression of the genes under investigation in the hippocampus and mPFC. It was established that it is the specific type of hypoxia, rather than the mere presence of a hypoxic stimulus, that determines the nature of the behavioural and molecular consequences. Only mild IHT produced a pronounced PTSD-specific anxiolytic effect (in particular, a 4.0-fold reduction in freezing time in the EPM and a 4.0-fold reduction in the OFT) whilst simultaneously normalising the expression of HIF-1 α , HIF-3 α and PAI-1 in traumatised animals, whilst more intense exposures to Bar and CoCl₂ produced limited or adverse behavioural outcomes. A unique region-specific dissociation of the PACAP and HIF-2 α responses under conditions of hypobaric hypoxia was identified, as well as a series of molecular-behavioural correlations linking the suppression of HIF-1 α and PACAP to a reduction in anxiety-like behaviour.

For the first time, a region-specific increase in the expression of HIF-1 α and HIF-2 α in the hippocampus (but not in the mPFC) has been demonstrated in the SPS model of PTSD; for the first time, within a single experiment, the behavioural and molecular effects of three models of hypoxia have been compared, and the principle of the dose-dependent nature of their effects has been substantiated; the PTSD-selective nature of IHT's action has been established for the first time, and a dissociation between the neuropeptide (PACAP) and HIF-2 α responses under hypobaric conditions has been identified.

The data obtained support the feasibility of further developing intermittent hypoxic training (IHT) as a candidate non-pharmacological method for modulating trauma-associated conditions, and also propose hippocampal HIF-1 α / HIF-2 α as potential molecular markers of post-traumatic adaptation.

Keywords: *Hypoxia, hypoxia-induced factors, intermittent hypoxic training, fear-induced behaviour, oxidative stress, adaptation, oxygen, PTSD, hippocampus, stress, animals, anxiety, behaviour, stress regulation mechanisms.*

АНОТАЦІЯ

Порхало Д.Ф. «Залежні від гіпоксії зміни експресії ізоформ фактору, що індукується гіпоксією, у гіпокампі та медіальній префронтальній корі при моделюванні посттравматичного стресового розладу». - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 - Біологія за спеціальністю 091 - Біологія. Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, 2026.

Посттравматичний стресовий розлад (ПТСР) є одним із найпоширеніших психічних розладів, тягар якого особливо зростає у популяціях, що переживають збройні конфлікти, насильство та масштабні катастрофи. Попри значний прогрес у вивченні психологічних і нейроендокринних механізмів ПТСР, його молекулярна природа залишається недостатньо охарактеризованою, що ускладнює розробку патогенетично обґрунтованих терапевтичних стратегій. У дисертації перевірено гіпотезу про участь факторів, що індукуються гіпоксією (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) та асоційованих із ними молекул - поліпептиду, що активує аденілатциклазу гіпофіза (PACAP) та інгібітора активатора плазміногену 1-го типу (PAI-1) - у молекулярному патогенезі ПТСР, а також досліджено можливість корекції відповідних порушень за допомогою різних видів гіпоксичних впливів.

Роботу виконано у два послідовні етапи на єдиній когорті щурів-самців з використанням моделі single prolonged stress (SPS). На першому етапі встановлено базовий молекулярно-поведінковий фенотип ПТСР шляхом порівняння інтактних тварин і тварин із SPS-індукованим розладом. Показано, що SPS відтворює характерний тривожно-подібний фенотип у тестах «піднесений хрестоподібний лабіринт» (EPM) та «темно-світла камера» (DLB), а на молекулярному рівні супроводжується вибіркоvim підвищенням експресії HIF-1 α та HIF-2 α у гіпокампі (приблизно у 2,1 та 2,2 раза відповідно; $p < 0,05$) за відсутності значущих змін у медіальній префронтальній корі (мПФК). Це вказує на регіон-специфічну

активацію гіпоксія-залежних сигнальних шляхів як ранній молекулярний компонент посттравматичної адаптації.

На другому етапі вперше на одній моделі порівняно три моделі гіпоксії - інтервальне гіпоксичне тренування (ІНТ), гіпобаричну гіпоксію (Bar) та хімічну гіпоксію, спричинену хлоридом кобальту (CoCl_2), - за їхнім впливом на поведінку та експресію досліджуваних генів у гіпокампі та мПФК. Встановлено, що саме вид гіпоксії, а не наявність гіпоксичного стимулу як такого, визначає характер поведінкових і молекулярних наслідків. Лише м'яка ІНТ забезпечувало виражений PTSD-специфічний анксиолітичний ефект (зокрема, зменшення часу завмирання в 4,0 рази в EPM та в 4,0 рази в OFT) і одночасно найглибше нормалізувала експресію HIF-1 α , HIF-3 α та PAI-1 у травмованих тварин, тоді як інтенсивніші впливи Bar і CoCl_2 давали обмежений або несприятливий поведінковий результат. Виявлено унікальну регіон-специфічну дисоціацію відповіді PACAP і HIF-2 α за умов гіпобаричної гіпоксії, а також низку молекулярно-поведінкових кореляцій, що пов'язують супресію HIF-1 α і PACAP зі зниженням тривожно-подібної поведінки.

Уперше показано регіон-специфічне підвищення експресії HIF-1 α та HIF-2 α у гіпокампі (але не в мПФК) на SPS-моделі ПТСР; уперше в межах єдиного експерименту порівняно поведінкові та молекулярні ефекти трьох моделей гіпоксії та обґрунтовано принцип вплив-залежності їхньої дії; уперше встановлено PTSD-селективний характер дії ІНТ та виявлено дисоціацію нейропептидної (PACAP) і HIF-2 α -відповіді за гіпобаричних умов.

Одержані дані обґрунтовують доцільність подальшої розробки інтервального гіпоксичного тренування (інтервального гіпоксичного тренування, ІНТ) як кандидатного нефармакологічного методу модуляції травма-асоційованих станів, а також пропонують гіпокампальні HIF-1 α /HIF-2 α як потенційні молекулярні маркери посттравматичної адаптації.

Ключові слова: *Гіпоксія, фактори що індукуються гіпоксією, інтервальне гіпоксичне тренування, страх-зумовлена поведінка, оксидативний стрес, адаптація, кисень, ПТСР, гіпокамп, стрес, тварини, тривожність, поведінка, механізми регуляції стресу*

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ

В яких опубліковано основні результати дисертаційного дослідження:

- 1) Porkhalo D., Pashevin D., Naumenko Y., Dosenko V. HIF-1 α and HIF-2 α Are Upregulated in the Hippocampus but Not in the Medial Prefrontal Cortex in Experimental PTSD. Brain and Behavior 16(8) [Q2](#)
DOI [10.1002/brb3.71654](#) (Особистий внесок здобувача - дизайн дослідів, розробка програмного забезпечення для аналізу результатів ПЛР, проведення моделювання ПТСР-подібного стану у дослідних тварин, проведення молекулярного аналізу, статистична обробка результатів, написання тексту публікації)
- 2) Porkhalo D., Pashevin D., Naumenko Y., Koval R., Kozlovska M., Kamkina M., Tytarenko Y., Portnychenko A., Dosenko V. Mode-Dependent Effects of Chemical, Intermittent, and Hypobaric Hypoxia on HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , PACAP, and PAI mRNA Expression in the Single Prolonged Stress Model of PTSD. Frontiers in Neuroscience. 20(1904848) [Q2](#)
DOI [10.3389/fnins.2026.1904848](#) (Особистий внесок здобувача - дизайн дослідів, розробка програмного забезпечення для аналізу результатів ПЛР, проведення моделювання ПТСР-подібного стану у дослідних тварин, проведення моделювання гіпоксичних станів, проведення молекулярного аналізу, статистична обробка результатів, написання тексту публікації)

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертаційного дослідження:

- 1) Porkhalo D., Kozlovska M., Dosenko V. Differential effects of cobalt chloride, intermittent hypoxia, and hypobaric hypoxia on PTSD-like behaviour in rats: Abstract S1P10.
17th International Congress of the Polish Neuroscience Society, Вроцлав, Польща.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	7
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1 СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ПОСТТРАВМАТИЧНОГО СТРЕСОВОГО РОЗЛАДУ ТА ЙОГО ЗВ'ЯЗОК З ГІПОКСІЄЮ	14
1.1. Епідеміологія та причини посттравматичного стресового розладу	14
<i>1.1.1. ПТСР у військовослужбовців і ветеранів</i>	<i>15</i>
<i>1.1.2. ПТСР у цивільного населення та внаслідок катастроф</i>	<i>15</i>
<i>1.1.3. ПТСР у наслідок насильства; гендерні та вікові аспекти</i>	<i>15</i>
<i>1.1.4. Глобальний тягар, перебіг і коморбідність розладу</i>	<i>16</i>
1.2. Медичні та фізіологічні особливості мозку при ПТСР	17
<i>1.2.1. Психіатрична симптоматика</i>	<i>17</i>
<i>1.2.2. Структурно-функціональні зміни мозку</i>	<i>18</i>
<i>1.2.3. Нейронні мережі страху та його згасання.....</i>	<i>18</i>
<i>1.2.4. Сучасні підходи до лікування ПТСР та їх обмеження.....</i>	<i>19</i>
1.3. ПТСР і біологічна адаптація до стресу	20
1.4. Молекулярні детермінанти розвитку ПТСР.....	22
<i>1.4.1. PAI-1 у стресі, психічних розладах і ПТСР</i>	<i>22</i>
<i>1.4.2. PACAP і ПТСР</i>	<i>24</i>
<i>1.4.3. Фактори, що індукуються гіпоксією, у стрес-відповіді та ПТСР</i>	<i>26</i>
<i>1.4.4. Генетичні та епігенетичні чинники ПТСР</i>	<i>26</i>
<i>1.4.5. Периферичні біомаркери ПТСР</i>	<i>27</i>
<i>1.4.6. Перехресні зв'язки осі HIF-PACAP-PAI-1-BDNF</i>	<i>27</i>

1.5. Фактори, що індукуються гіпоксією: молекулярна організація, регуляція та ізоформи	28
1.5.1. Відкриття родини HIF та її доменна організація	29
1.5.2. Кисень-залежна регуляція стабільності та активності HIF	30
1.5.3. HIF-1 α : гостра метаболічна адаптація.....	31
1.5.4. HIF-2 α (EPAS1): довготривала адаптація та тканинна специфічність ..	31
1.5.5. HIF-3 α : сплайс-варіанти та регуляторна петля	32
1.5.6. Транскрипційна програма HIF та елементи відповіді на гіпоксію	33
1.5.7. Кисень-незалежні механізми активації HIF	33
1.5.8. Особливості системи HIF у нервовій тканині та значення для ПТСР ...	34
1.6. Гіпоксія як модулятор стрес-залежної патології	35
1.6.1. Види та класифікація гіпоксії	36
1.6.2. <i>Методи гіпоксичних впливів</i>	37
1.6.3. <i>Гіпоксичне кондиціювання як нефармакологічний підхід</i>	37
1.6.4. <i>Доза, інтенсивність і часова структура гіпоксичного стимулу</i>	38
1.6.5. <i>Механізм дії хімічної гіпоксії, спричиненої CoCl₂</i>	39
1.6.6. <i>Подвійність інтервальної гіпоксії: терапевтична та патологічна форми</i>	40
1.6.7. Гіпоксія та тривожні розлади.....	41
1.7. Експериментальні моделі ПТСР і поведінкові парадигми	42
1.7.1. <i>Модель single prolonged stress (SPS)</i>	42
1.7.2. <i>Поведінкові тести оцінки тривожно-подібної поведінки</i>	43
1.7.3. <i>Обґрунтування вибору генів-мішеней і ділянок мозку</i>	44
1.8. Інтегративна модель та обґрунтування напряду дослідження.....	44
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	48

2.1. Тварини та етичні аспекти дослідження	48
2.2. Дизайн дослідження та експериментальні групи	50
2.3. Модель single prolonged stress (SPS).....	51
2.4. Гіпоксичні втручання.....	54
2.4.1. Інтервальна гіпоксія	54
2.4.2. Гіпобарична гіпоксія (Bar).....	55
2.4.3. Хімічна гіпоксія (CoCl ₂)	56
2.5. Поведінкові тести	57
2.5.1. Тест «відкрите поле» (OFT)	58
2.5.2. Піднесений хрестоподібний лабіринт (EPM)	58
2.5.3. Тест «темно-світла камера» (DLB)	59
2.6. Забір тканин	60
2.7. Виділення РНК та синтез кДНК	61
2.8. Дизайн праймерів та полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі.....	63
2.9. Статистичний аналіз	66
РОЗДІЛ 3 МОЛЕКУЛЯРНО-ПОВЕДІНКОВИЙ ФЕНОТИП ПТСР	70
3.1. Результати поведінкового тестування	70
3.1.1. Тест «відкрите поле» (OFT)	70
3.1.2. Піднесений хрестоподібний лабіринт (EPM)	72
3.1.3. Тест «темно-світла камера» (DLB)	75
3.2. Результати молекулярного аналізу	77
3.2.1. Гіпокамп	77
3.2.2. Медіальна префронтальна кора	80
РОЗДІЛ 4 ВПЛИВ РІЗНИХ ВИДІВ ГІПОКСІЇ НА ПОВЕДІНКОВІ ТА МОЛЕКУЛЯРНІ МАРКЕРИ ПТСР	83

4.1. Результати поведінкового тестування	83
4.1.1. Тест «відкрите поле» (OFT)	83
4.1.2. Піднесений хрестоподібний лабіринт (EPM)	86
4.1.3. Тест «темно-світла камера» (DLB)	90
4.2. Молекулярний аналіз: медіальна префронтальна кора	92
4.2.1. Експресія ізоформ HIF у корі	93
4.2.2. Експресія PACAP і PAI-1 у корі	96
4.3. Молекулярний аналіз: гіпокамп	98
4.3.1. Експресія ізоформ HIF у гіпокампі	98
4.3.2. Експресія PACAP і PAI-1 у гіпокампі	99
4.4. Кореляційний аналіз: експресія генів і поведінкові показники	103
Висновки до розділу 4	106
РОЗДІЛ 5 УЗАГАЛЬНЕНЕ ОБГОВОРЕННЯ.....	108
5.1. Валідність SPS-моделі та поведінковий фенотип ПТСР	108
5.2. Регіон-специфічна активація HIF при ПТСР.....	110
5.3. Ефекти різних видів гіпоксії	113
5.4. Роль окремих молекул: HIF-3 α , PACAP і PAI-1	117
5.5. Молекулярно-поведінкові зв'язки.....	120
5.6. Інтегративна молекулярна модель взаємодії гіпоксії та посттравматичного стресового розладу	121
5.7. Обмеження дослідження	123
5.8. Перспективи подальших досліджень та клінічне значення.....	125
ВИСНОВКИ	129
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	132
ДОДАТКИ.....	155

<i>A.1. Обчислення відносної експресії (метод $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$)</i>	155
<i>A.2. Статистичний аналіз (нормальність, ANOVA / Kruskal-Wallis, FDR) .</i>	155
<i>A.3. Кореляційний аналіз (рангова кореляція Спірмена)</i>	156
<i>A.4. Побудова рисунків (боксплоти за групами)</i>	156
Додаток Б. Зведені кількісні дані.....	158
Додаток Д. Повні результати попарних порівнянь, контролю якості та кореляцій	158

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ПТСР - посттравматичний стресовий розлад

SPS - single prolonged stress (модель тривалого однократного стресу)

HIF - hypoxia-inducible factor (фактор, що індукується гіпоксією)

PACAP - pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

PAI-1 - plasminogen activator inhibitor-1 (інгібітор активатора плазміногену 1)

tPA - tissue plasminogen activator (тканинний активатор плазміногену)

BDNF - brain-derived neurotrophic factor (нейротрофічний фактор мозку)

ІНТ - інтервальне гіпоксичне тренування (intermittent hypoxic training)

Bar - гіпобарична гіпоксія

CoCl₂ - хлорид кобальту

ЕРМ - elevated plus maze (піднесений хрестоподібний лабіринт)

OFT - open field test (тест «відкрите поле»)

DLB - dark-light box (тест «темно-світла камера»)

мПФК / mPFC - медіальна префронтальна кора

ГГН-вісь - гіпоталамо-гіпофізарно-надниркова вісь (HPA axis)

qPCR / RT-qPCR - кількісна полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі

Actb - ген β-актину (референсний ген)

FDR - false discovery rate (частота хибних відкриттів)

ВСТУП

Актуальність теми

Посттравматичний стресовий розлад (ПТСР) належить до найпоширеніших психічних розладів і формує значний медико-соціальний тягар, особливо в країнах, що переживають збройні конфлікти. В умовах війни в Україні проблема діагностики, профілактики та лікування ПТСР набуває критичної ваги як для військовослужбовців, так і для цивільного населення. Попри наявність валідованих психотерапевтичних і фармакологічних протоколів, значна частина пацієнтів залишається резистентною до лікування, що зумовлює потребу в патогенетично обґрунтованих підходах, які спираються на розуміння молекулярних механізмів розладу.

Сучасні дослідження свідчать, що в основі ПТСР лежать порушення нейропластичності, регуляції осі стресу та метаболічної адаптації мозку. Дедалі більше уваги привертає роль гіпоксія-залежних сигнальних шляхів: хронічний психоемоційний стрес супроводжується ознаками тканинної гіпоксії, мітохондріальної дисфункції та окисного стресу, здатних активувати транскрипційні фактори родини HIF. Водночас зміни кисневого гомеостазу за певних умов чинять і протилежний, адаптивний вплив: контрольовані гіпоксичні впливи розглядаються як перспективний нефармакологічний засіб підвищення стійкості організму до екстремальних чинників. Така подвійність ефектів гіпоксії робить критично важливим систематичне порівняння її різних видів саме в контексті ПТСР, чого досі не було зроблено в межах єдиного дослідження. Крім того, лишається нез'ясованою роль окремих ізоформ HIF (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) та функціонально пов'язаних із ними молекул PACAP і PAI-1, що беруть участь у регуляції дозрівання BDNF і стрес-відповіді. Це й визначило вибір теми дисертаційного дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами

Дисертаційну роботу виконано у відділі загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України в межах планової науково-дослідної тематики відділу (реєстраційний номер 0124U001685 та 0118U007348).

Мета і завдання дослідження

Мета роботи: встановити роль факторів, що індукуються гіпоксією (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α), та PACAP, PAI-1 у патогенезі ПТСР і оцінити ефекти інтервальної нормобаричної, гіпобаричної та хімічної гіпоксії на поведінкові й молекулярні маркери розладу на моделі single prolonged stress у щурів.

Для досягнення мети поставлено такі завдання:

1. Відтворити модель ПТСР шляхом застосування протоколу single prolonged stress (SPS) у щурів-самців і охарактеризувати поведінковий фенотип тварин у тестах «відкрите поле» (OFT), «піднесений хрестоподібний лабіринт» (EPM) та «темно-світла камера» (DLB).

2. Визначити базовий рівень експресії HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , PACAP і PAI-1 у гіпокампі та медіальній префронтальній корі за умов ПТСР порівняно з інтактними тваринами.

3. Дослідити вплив трьох видів гіпоксії - інтервального гіпоксичного тренування (ІНТ), гіпобаричної (Bar) та хімічної (CoCl₂) - на поведінкові показники тварин з ПТСР та без нього.

4. Оцінити вплив зазначених моделей гіпоксії на експресію досліджуваних генів у двох ділянках мозку та виявити PTSD-селективні й регіон-специфічні особливості молекулярної відповіді.

5. Проаналізувати молекулярно-поведінкові зв'язки (кореляційний аналіз) і визначити найбільш ефективний гіпоксичний вплив для нормалізації травма-асоційованого фенотипу.

Об'єкт і предмет дослідження

Об'єкт дослідження - молекулярні механізми експериментального посттравматичного стресового розладу та їх модуляція гіпоксичними впливами.

Предмет дослідження - експресія HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , PACAP і PAI-1 у гіпокампі та медіальній префронтальній корі та поведінкові прояви ПТСР за умов різних гіпоксичних впливів.

Методи дослідження

У роботі застосовано комплекс взаємодоповнювальних методів: експериментальне моделювання (індукція ПТСР за протоколом SPS); поведінкові методи з автоматизованим відеотрекінгом (OFT, EPM, DLB; програмне забезпечення AnyMaze) - для оцінки тривожно-подібної поведінки та локомоторної активності; молекулярно-біологічні методи (виділення тотальної РНК, синтез кДНК, кількісна ПЛР у реальному часі з обчисленням відносної експресії методом $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, референсний ген β -актину) - для кількісного визначення експресії генів; статистичні методи (перевірка нормальності за критерієм Шاپіро-Вілка, однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA або критерій Краскела-Волліса, попарні порівняння за t-критерієм або U-критерієм Манна-Вітні, поправка на множинні порівняння за процедурою Бенджаміні-Хохберга, рангова кореляція Спірмена). Обґрунтований вибір методів забезпечує достовірність одержаних результатів і висновків.

Для редагування та граматичної перевірки тексту дисертації використано велику мовну модель Claude (Anthropic, версія Claude Sonnet 4.5, 2025). Модель застосовувалась як допоміжний інструмент для виявлення граматичних, синтаксичних та стилістичних помилок в україномовному тексті, перевірки узгодженості термінології та покращення загальної читабельності наукового тексту. Усі запропоновані моделлю зміни переглядались та затверджувались автором вручну. Змістовна частина дисертації, включаючи наукові положення,

інтерпретацію результатів та висновки, є виключно результатом самостійної роботи автора.

Наукова новизна одержаних результатів

Уперше встановлено, що SPS-індукований ПТСР супроводжується регіон-специфічним підвищенням експресії HIF-1 α та HIF-2 α у гіпокампі за відсутності значущих змін у медіальній префронтальній корі, що може вказувати на гіпокамп як основну ділянку гіпоксія-залежної посттравматичної адаптації на транскрипційному рівні.

Уперше в межах єдиного експерименту на одній когорті тварин проведено порівняння трьох моделей гіпоксії (ІНТ, Ваг, CoCl₂) і обґрунтовано принцип їхньої дії: характер поведінкових і молекулярних наслідків визначається модальністю, інтенсивністю та часовою структурою гіпоксичного стимулу, а не самою лише наявністю гіпоксії.

Уперше показано PTSD-селективний анксиолітичний ефект ІНТ, що одночасно найглибше нормалізує експресію HIF-1 α , HIF-3 α і PAI-1 у травмованих тварин, а також виявлено унікальну регіон-специфічну дисоціацію відповіді PACAP і HIF-2 α за умов гіпобаричної гіпоксії.

Практичне значення одержаних результатів

Результати роботи обґрунтовують доцільність подальшої розробки інтервального гіпоксичного тренування як кандидатного нефармакологічного методу корекції травма-асоційованих станів і пропонують гіпокампальні HIF-1 α /HIF-2 α як потенційні молекулярні механізми посттравматичної адаптації. Одержані дані можуть бути використані у навчальному процесі та в подальших доклінічних дослідженнях механізмів стрес-залежної патології.

Особистий внесок здобувача

Порхало Денис Федорович - Здобувач самостійно здійснив аналіз літератури, брав участь у плануванні експериментів, особисто виконав моделювання ПТСР, поведінкове тестування, молекулярно-біологічні дослідження та статистичну обробку даних, підготував матеріали публікацій.

Апробація матеріалів дисертації

Основні результати дисертації оприлюднено та обговорено на таких наукових конференціях:

- 1) Porkhalo D., Kozlovska M., Dosenko V. Differential effects of cobalt chloride, intermittent hypoxia, and hypobaric hypoxia on PTSD-like behaviour in rats: Abstract S1P10. 17th International Congress of the Polish Neuroscience Society, Вроцлав, Польща

Публікації

Основні результати дисертації викладено у наступних публікаціях:

- 1) Porkhalo D., Pashevin D., Naumenko Y., Dosenko V. HIF-1 α and HIF-2 α Are Upregulated in the Hippocampus but Not in the Medial Prefrontal Cortex in Experimental PTSD. Brain and Behavior 16(8) [Q2](#)
DOI [10.1002/brb3.71654](https://doi.org/10.1002/brb3.71654)
- 2) Porkhalo D., Pashevin D., Naumenko Y., Koval R., Kozlovska M., Kamkina M., Tytarenko Y., Portnychenko A., Dosenko V. Mode-Dependent Effects of Chemical, Intermittent, and Hypobaric Hypoxia on HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , PACAP, and PAI mRNA Expression in the Single Prolonged Stress Model of PTSD. Frontiers in Neuroscience. 20(1904848) [Q2](#)
DOI [10.3389/fnins.2026.1904848](https://doi.org/10.3389/fnins.2026.1904848)

Структура та обсяг дисертації

Дисертація складається зі вступу, п'яти розділів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Загальний обсяг дисертації становить 183 сторінок, основний текст - 124 сторінки. Роботу ілюстровано 16 рисунками та 9 таблицями. Список використаних джерел містить 173 найменування.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ПОСТТРАВМАТИЧНОГО СТРЕСОВОГО РОЗЛАДУ ТА ЙОГО ЗВ'ЯЗОК З ГІПОКСІЄЮ

Посттравматичний стресовий розлад (ПТСР) визначають як стан, що виникає внаслідок переживання травматичної, загрозливої для життя або психологічно нищівної події [16]. Він асоціюється з масштабними катастрофами [108], збройними конфліктами [7, 15, 165], досвідом насильства [51] та сексуальної травми [47]. За своєю суттю ПТСР є тягарем не лише для окремих груп населення, а й для цілих країн, оскільки висока поширеність розладу здатна знижувати загальний рівень добробуту, якість життя та продуктивність суспільства [3, 76, 96]. Історичні огляди свідчать, що згадки про розлад, схожий на ПТСР, сягають античності [68], однак саме молекулярно-біологічний погляд на проблему відкриває перспективу нових терапевтичних підходів.

У цьому розділі розглянуто епідеміологію та причини ПТСР, медико-фізіологічні особливості мозку при цьому розладі, а також молекулярні механізми стрес-адаптації - з акцентом на осі RA1-1 - PACAP - HIF та її зв'язку з нейротрофічним фактором BDNF. Окремо проаналізовано роль гіпоксії та різних гіпоксичних впливів як потенційного модулятора стрес-залежної патології, що формує теоретичне підґрунтя для експериментальної частини дисертації.

1.1. Епідеміологія та причини посттравматичного стресового розладу

ПТСР є поширеним розладом серед людей різного віку та статі й виникає внаслідок різноманітних подій - як масштабних, так і відносно локальних. Попри значну кількість досліджень, природа розладу залишається недостатньо вивченою, що перешкоджає створенню уніфікованих діагностичних і терапевтичних протоколів. Нижче розглянуто основні контексти виникнення ПТСР.

1.1.1. ПТСР у військовослужбовців і ветеранів

Проблематику ПТСР традиційно вивчають на прикладі ветеранів і військового персоналу [50]. Численні ветерани США та Великої Британії демонстрували високі показники ПТСР після війни в Іраку [123]. В умовах сучасних збройних конфліктів проблема набуває особливої гостроти: дедалі частіше ПТСР розглядають у контексті війни в Україні [7, 36, 151]. Дані канадських досліджень підтверджують стійкий зв'язок між бойовою травмою та ризиком розвитку ПТСР [23]. Високі показники поширеності серед військових пояснюються поєднанням інтенсивності, повторюваності та непередбачуваності травматичних стимулів, а також тривалим перебуванням у стані підвищеної готовності, що сприяє закріпленню патологічних патернів страх-зумовленого навчіння.

1.1.2. ПТСР у цивільного населення та внаслідок катастроф

ПТСР розвивається й у цивільних осіб [2, 66], причому ризик пов'язаний не стільки з безпосередньою участю в бойових діях, скільки з близькістю до подій, що дає змогу усвідомлювати й переживати конфлікт [2]. Порівняння міського населення з внутрішньо переміщеними особами в Україні виявило відмінності у структурі та тяжкості симптомів, що підкреслює роль соціального контексту травматизації [66].

Окрім війни, причиною ПТСР можуть бути природні катастрофи та індивідуальні травматичні події, однак їхній внесок суттєво варіює залежно від регіону та рівня добробуту. За даними World Mental Health Surveys, у країнах із високим рівнем доходу ризик ПТСР, асоційованого з катастрофами, має свої особливості розподілу [22]. Це свідчить про те, що тяжкість наслідків травми визначається не лише характером події, а й наявними ресурсами підтримки, доступом до медичної допомоги та соціально-економічними чинниками.

1.1.3. ПТСР у наслідок насильства; гендерні та вікові аспекти

Особисті травматичні події, зокрема сексуальне та фізичне насильство, здатні спричиняти симптоми ПТСР [155]. Різні форми насильства призводять до

симптоматики різної тривалості [124], а для сексуального насильства характерні специфічні патерни розвитку розладу [32, 116].

Жінки, за наявними даними, частіше за чоловіків розвивають ПТСР [113], однак чимало дослідників вважають, що наявних даних недостатньо для остаточного підтвердження цієї закономірності. Більше того, пропонується відмовитися від бінарної гендерної моделі для повнішого врахування багатфакторної природи розладу [57]. ПТСР може розвиватися й у дітей, особливо віком до шести років, унаслідок війни, природних катастроф, насильства або зловживання батьками психоактивними речовинами [35, 104, 150]. Соціальні та сімейні чинники під час формування особистості відіграють у цьому процесі ключову роль [128]. Отже, ПТСР є поширеним серед усіх вікових і гендерних груп, що додатково ускладнює уніфікацію підходів до його вивчення та лікування.

1.1.4. Глобальний тягар, перебіг і коморбідність розладу

Систематичні оцінки Всесвітньої організації охорони здоров'я свідчать, що в популяціях, які переживають збройні конфлікти, поширеність психічних розладів суттєво перевищує загальносвітові показники, а ПТСР належить до найбільш репрезентованих станів [29]. Така концентрація тягара в умовах війни пояснює, чому проблема ПТСР набуває особливої актуальності для України та інших країн, що зазнали тривалого збройного протистояння, і чому пошук патогенетично обґрунтованих, зокрема нефармакологічних, підходів є нагальним.

Перебіг ПТСР характеризується вираженою гетерогенністю. У частини осіб симптоми спонтанно регресують упродовж перших місяців після травми, тоді як в інших розлад набуває хронічного, рецидивного перебігу з періодами загострень, спровокованих нагадувальними стимулами. Саме здатність окремих індивідів зберігати стійкість (резильєнтність) за однакової експозиції до травми вказує на існування індивідуальних біологічних детермінант сприйнятливості, які можна моделювати й досліджувати на тваринах.

ПТСР рідко трапляється ізольовано: для нього характерна висока коморбідність з депресією, тривожними розладами, хронічним болем,

соматичними та серцево-судинними захворюваннями, а також із розладами вживання психоактивних речовин. Така мультиморбідність відображає системний характер дисрегуляції стрес-відповіді й ускладнює як діагностику, так і лікування, додатково мотивуючи дослідження спільних молекулярних вузлів, що поєднують ці стани.

1.2. Медичні та фізіологічні особливості мозку при ПТСР

1.2.1. Психіатрична симптоматика

Згідно з критеріями DSM-IV, ПТСР характеризується домінуванням емоцій страху, безпорадності та жаху [59], а також повторним переживанням негативних відчуттів і підвищеною реактивністю після травми. Травматичні реакції трансформуються у стійкі патерни, що впливають на емоційну та когнітивну сфери [117]. ПТСР супроводжується вегетативними та серцево-судинними проявами [13, 112], що відображає системний характер розладу.

Вторинним наслідком ПТСР може бути підвищена схильність до вживання (зловживання) алкоголю та психоактивних речовин [56]. Своєю чергою, такі речовини, як алкоголь і канабіс, асоціюються з тяжчим перебігом симптоматики ПТСР [60]. Це формує хибне коло, у якому спроби самостійно полегшити симптоми поглиблюють розлад.

Сучасні діагностичні системи (DSM-5, МКХ-11) групують прояви ПТСР у кілька доменів: повторне переживання травми (нав'язливі спогади, флешбеки, кошмари), уникнення пов'язаних із травмою стимулів, негативні зміни когніцій і настрою, а також стійка гіперзбудливість (надмірна пильність, порушення сну, дратівливість, посилена реакція переляку). Хронізація цих проявів відображає закріплення дезадаптивних патернів страх-зумовленого наuczіння та порушення їх згасання, що має чітке нейробіологічне підґрунтя.

Симптоматика ПТСР тісно переплітається з порушеннями сну та вегетативної регуляції. Фрагментація сну й нічні кошмари не лише є симптомами, а й самі перешкоджають консолідації корисної (зокрема згасальної) пам'яті,

замикаючи порочне коло. Вегетативний дисбаланс із переважанням симпатичної активності лежить в основі серцево-судинних проявів розладу [13, 112] і свідчить про системний, а не суто «психологічний» характер ПТСР.

1.2.2. Структурно-функціональні зміни мозку

Серед ознак, що виявляються під час психіатричного обстеження, вирізняються порушення страх-зумовленого навчання, зокрема уникнення тригерів [69]. Пацієнти з ПТСР демонструють спотворене навчання пов'язане зі страхом зі схильністю до надмірної генералізації страхових асоціацій [99]. Нейровізуалізаційні дослідження виявляють зменшення об'єму сірої та білої речовини, що призводить до втрати нейрональної маси та порушення нейрональних зв'язків [21]. Водночас ПТСР є складним розладом, який охоплює аномалії в нейрональних шляхах, пов'язаних із обробкою загрози [84, 106].

Ключову роль у патофізіології ПТСР відіграє система «префронтальна кора - мигдалина - гіпокамп». Порушення низхідного контролю з боку медіальної префронтальної кори над мигдалиною сприяє надмірній реактивності на загрозу [4], тоді як дисфункція гальмівного контролю позначається на здатності пригнічувати неадаптивні реакції [150]. Емоційна дисрегуляція та почуття сорому виступають додатковими шляхами формування посттравматичної симптоматики [97], а порушення обробки контексту розглядають як один із центральних нейробіологічних механізмів розладу [86].

1.2.3. Нейронні мережі страху та його згасання

Патофізіологію ПТСР дедалі частіше описують у термінах дисфункції розподілених нейронних мереж, а не ізольованих структур. Ключову роль відіграє система обробки загрози, до якої належать базолатеральне (BLA) та центральне (CeA) ядра мигдалини, вентромедіальна префронтальна кора (vmPFC), дорсальна передня поясна кора, гіпокамп та острівцева кора. Мигдалина забезпечує швидке детектування загрози й формування страхових асоціацій, гіпокамп - контекстуалізацію цих асоціацій, а vmPFC - низхідний гальмівний контроль над амігдаллярною реактивністю.

Центральним процесом, порушеним при ПТСР, є страх-зумовлене научіння та його згасання (extinction). У нормі повторне пред'явлення умовного стимулу без підкріплення веде до формування нової гальмівної пам'яті за участі vmPFC і гіпокампа. При ПТСР цей процес порушений: спостерігають ослаблене згасання, дефіцит його утримання та надмірну генералізацію страхових асоціацій на безпечні стимули [99], що клінічно проявляється стійким уникненням і гіперреактивністю.

Поряд із мережею страху до патогенезу залучені мережа значущості (salience network) та мережа стану спокою (default mode network), дисбаланс між якими пов'язують із нав'язливими спогадами та порушенням саморефлексії. Важливим компонентом є також інтероцепція - сприйняття внутрішніх тілесних сигналів, порушення якого робить внесок у страх-зумовлене научіння при ПТСР [69]. Розуміння цієї мережевої організації пояснює, чому молекулярні зміни в гіпокампі та префронтальній корі - ділянках, досліджуваних у цій роботі, - мають безпосереднє поведінкове значення.

1.2.4. Сучасні підходи до лікування ПТСР та їх обмеження

Сучасний арсенал лікування ПТСР охоплює психотерапевтичні та фармакологічні методи. Серед психотерапій із найкращою доказовою базою - травмофокусована когнітивно-поведінкова терапія, пролонгована експозиція, когнітивна процесуальна терапія та десенсибілізація і репроцесинг за допомогою рухів очей (EMDR). Ці підходи спрямовані на переробку травматичної пам'яті та згасання патологічних страхових асоціацій, однак потребують часу, кваліфікованих фахівців і високої прихильності пацієнта, а частина хворих не переносить інтенсивної конфронтації з травматичним матеріалом.

Фармакологічно першою лінією залишаються антидепресанти, передусім селективні інгібітори зворотного захоплення серотоніну; застосовують також інші класи препаратів для корекції окремих симптомів (порушень сну, гіперзбудливості). Проте ефект розвивається повільно, є частково симптоматичним і не в усіх пацієнтів достатнім. Значна частка хворих демонструє резистентність до доступних втручань або неповну відповідь, а рецидиви є поширеними.

Саме обмежена ефективність наявних методів і їхній переважно симптоматичний характер мотивують пошук патогенетично обґрунтованих підходів, що діють на молекулярні механізми розладу. У цьому контексті інтерес становлять нефармакологічні стратегії, здатні зміщувати молекулярні шляхи в адаптивний бік, - від кисень-орієнтованих методів, як-от гіпербарична оксигенація [43, 44], до гіпоксичного кондиціювання, дослідженню якого присвячено цю роботу.

1.3. ПТСР і біологічна адаптація до стресу

Розуміння молекулярних механізмів адаптації до стресу - зокрема ролі RA1-1, PACAP і NIF - може відкрити нові терапевтичні мішені для запобігання чи пом'якшення симптомів ПТСР і визначити напрями майбутніх досліджень. Центральне місце в стрес-відповіді посідає гіпоталамо-гіпофізарно-надниркова (ГГН) вісь.

Особливістю ПТСР є парадоксальний профіль активності ГГН-осі: пацієнти мають чутливіші глюкокортикоїдні рецептори та нижчі рівні кортизолу зі зниженою добовою секрецією [83]. Це відрізняється від загального патерну підвищеної активності ГГН-осі, який не є специфічним для ПТСР [100]. Як зазначалося, ПТСР супроводжується витонченням сірої речовини мозку, зокрема гіпокампа, що є критично важливим для синаптичної пластичності - компонента стрес-відповіді [9]. Структурна та синаптична пластичність зазнають перебудови за стрес-залежних розладів [34], а хронічний (як і гострий) стрес знижує експресію мРНК BDNF у гіпокампі щурів [103]. Саме поєднання нейроендокринної дисрегуляції з порушенням нейротрофічної підтримки створює молекулярне підґрунтя для стійких змін поведінки.

Каскад стрес-відповіді ГГН-осі розгортається послідовно: паравентрикулярне ядро гіпоталамуса секретує кортикотропін-рилізінг гормон, який стимулює викид адренокортикотропного гормону гіпофізом, а той - синтез глюкокортикоїдів корою наднирників. У нормі глюкокортикоїди за принципом

негативного зворотного зв'язку пригнічують власну продукцію через рецептори в гіпокампі та гіпоталамусі. При ПТСР цей контур розрегульований: підвищена чутливість глюкокортикоїдних рецепторів і посилений негативний зворотний зв'язок співіснують зі зниженими базальними рівнями кортизолу, що відрізняє ПТСР від класичної гіперкортизолемії [83, 100].

Гіпокамп є особливо вразливим до тривалого впливу глюкокортикоїдів: згідно з гіпотезою глюкокортикоїдної вразливості, хронічний стрес знижує його стійкість і сприяє структурно-функціональним змінам [38]. Класичні моделі стрес-рестресу відтворюють саме посилення швидкого негативного зворотного зв'язку ГГН-осі після травматичного епізоду [85], що лягло в основу протоколу single prolonged stress, застосованого в цій роботі.

Тривала активація стрес-систем спричиняє так зване алостатичне навантаження - кумулятивну ціну адаптації, що реалізується через нейрозапалення, окисний стрес і мітохондріальну дисфункцію. Молекулярні маркери стрес-індукованого нейрозапалення описано в мишачих моделях, що відтворюють ознаки ПТСР [101], а окисну дисрегуляцію розглядають як спільний механізм раннього життєвого стресу та ПТСР [75]. Саме ці процеси - окисний стрес і метаболічна дисфункція - здатні активувати гіпоксія-чутливі сигнальні шляхи навіть за відсутності справжнього дефіциту кисню, що формує концептуальний місток до центральної гіпотези дисертації.

Зв'язок стрес-відповіді зі шляхами що ініціюються гіпоксією реалізується значною мірою через нейрозапалення, окисний стрес і мітохондріальну дисфункцію. Хронічний стрес активує мікроглію та підвищує продукцію прозапальних цитокінів і активних форм кисню, що порушує енергетичний метаболізм нейронів. Накопичення активних форм кисню та зниження ефективності окисного фосфорилування здатні стабілізувати HIF навіть за нормального парціального тиску кисню - через пригнічення активності Fe^{2+} -залежних діоксигеназ, чутливих до редокс-стану клітини.

Таким чином формується стан, за якого гіпоксична транскрипційна програма активується без справжнього дефіциту кисню. Окисну дисрегуляцію розглядають

як спільний механізм раннього життєвого стресу та ПТСР [75], а молекулярні маркери стрес-індукованого нейрозапалення відтворюються в тваринних моделях розладу [101]. Ця концептуальна рамка безпосередньо обґрунтовує гіпотезу про залучення HIF до молекулярного патогенезу ПТСР, що перевіряється в експериментальній частині роботи.

1.4. Молекулярні детермінанти розвитку ПТСР

Рівні BDNF у крові та мозку не є самодостатніми показниками ефективного формування пам'яті. Показано, що розвиток ПТСР пов'язаний зі значущою зміною сигналювання BDNF-TrkB [98, 110, 166]. Поліморфізм Val66Met гена BDNF модулює ризик інтрузивних спогадів і ПТСР залежно від статі та часу травматизації [111], а сам ПТСР дедалі частіше розглядають як розлад пам'яті [157]. Нижче послідовно проаналізовано три молекулярні вузли - PAI-1, PACAP та HIF, - що сходяться на регуляції дозрівання BDNF.

1.4.1. PAI-1 у стресі, психічних розладах і ПТСР

BDNF синтезується не одразу в активній формі, а у вигляді попередника - proBDNF [130]. Механізми активації цього фактора часто обговорюють у дослідженнях стрес-залежних розладів пам'яті [95]. Перетворення proBDNF на зрілий BDNF відбувається за участі плазміну, що утворюється з плазміногену під дією тканинного активатора плазміногену (tPA). Інгібітор активатора плазміногену 1-го типу (PAI-1) блокує tPA, унаслідок чого зменшується плазмін-опосередковане розщеплення proBDNF і знижується сигналювання через рецептор TrkB (рис. 1.1).

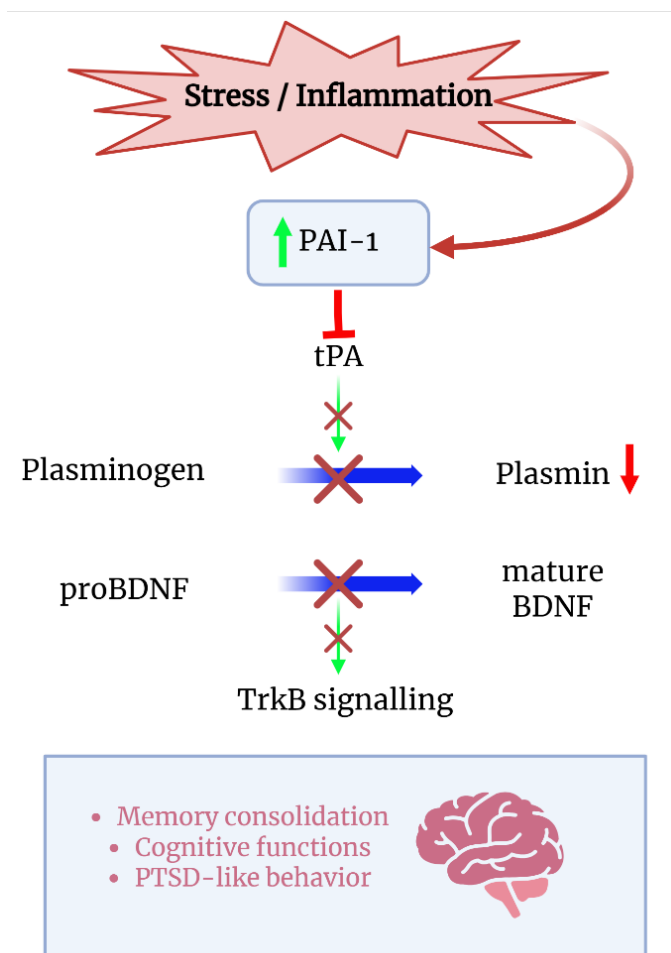


Рис. 1.1. Роль PAI-1 у розвитку ПТСР-подібної поведінки та порушень пам'яті. Стрес і нейрозапалення підвищують рівень PAI-1, який, своєю чергою, блокує сигналювання BDNF-TrkB через інгібування плазмін-опосередкованого дозрівання proBDNF, що відображається на консолідації пам'яті, когнітивних функціях і ПТСР-подібній поведінці.

Показано, що PAI-1 є ключовим молекулярним ефектором переходу від нормальної до ПТСР-подібної пам'яті страху [18]. Зміни системи tPA/PAI-1 асоціюються зі співвідношенням BDNF/proBDNF при великому депресивному розладі та під час антидепресивної терапії [163], а підвищене співвідношення PAI-1/BDNF корелює з тяжкістю хвороби Альцгеймера [6]. Водночас дефіцит PAI-1 також може бути генетичним чинником схильності до депресії та призводити до резистентності до лікування [115], що вказує на необхідність збалансованого, а не однонаправленого рівня цього інгібітора. Комбіновані рівні білків шляху tPA-

BDNF розглядають як потенційні діагностичні маркери низки психічних розладів [30], а зловживання алкоголем порушує дозрівання BDNF саме через PAI-1-залежний шлях, що є оборотним за умов утримання [88].

Молекулярний механізм дозрівання BDNF добре вивчений: tPA перетворює плазміноген на плазмін, а плазмін розщеплює proBDNF до зрілого BDNF; цей протеолітичний крок є необхідним для довготривалої потенціації в гіпокампі [114]. proBDNF і зрілий BDNF мають протилежні функціональні наслідки: перший через рецептор p75 і сортилін сприяє апоптозу та довготривалій депресії синапсів, тоді як другий через рецептор TrkB підтримує виживання нейронів, ріст відростків і синаптичну пластичність. Тому навіть за незмінного загального рівня BDNF зміщення балансу proBDNF/BDNF здатне істотно впливати на пластичність.

Система tPA/PAI-1 перебуває під гормональним контролем: глюкокортикоїди регулюють експресію tPA та PAI-1, що робить цю вісь чутливою до стану ГГН-осі й пояснює її релевантність саме для стрес-залежних психічних розладів [93]. У цьому контексті PAI-1 постає вузловим ефектором, через який нейроендокринна стрес-відповідь транслюється у зміни нейротрофічної підтримки, формуючи передумови переходу від нормальної до ПТСР-подібної пам'яті страху.

1.4.2. PACAP і ПТСР

Поліпептид, що активує аденілатциклазу гіпофіза (PACAP) відіграє важливу роль у регуляції PAI-1 [53]. Цей нейропептид безпосередньо впливає на експресію PAI-1, що, своєю чергою, зміщує баланс tPA/BDNF [49]. PACAP є компонентом симпато-адрено-медулярної (SAM) осі, яка швидко активується у відповідь на стрес [5], тож цей нейропептид можна розглядати як складову загальної стрес-відповіді [64, 73].

Стосовно тривалого стресу, експресія рецепторів PACAP, імовірно, підвищується в мигдалині щурів після класичного умовно-рефлекторного страху [145, 159]. Рівні PACAP в корі змінюються в осіб із ПТСР [42, 55], а класичні роботи встановили асоціацію ПТСР із системою PACAP та рецептором PAC1 [122]. PACAP зв'язується з Gs-спряженим рецептором PAC1, активуючи

аденілатциклазу, що підвищує рівень cAMP і стимулює РКА [10]. РКА фосфорилує CREB, регулюючи гени, пов'язані зі стресом, пластичністю та виживанням нейронів [11, 70] (рис. 1.2).

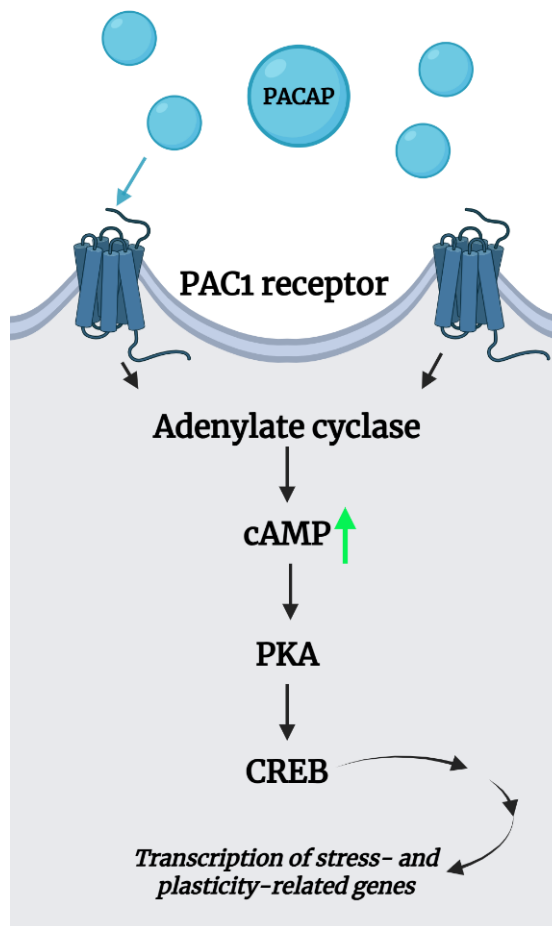


Рис. 1.2. Роль PACAP у транскрипції стрес-асоційованих генів. Підвищення рівня PACAP активує сигнальний шлях cAMP/CREB через рецептор PAC1 та аденілатциклазу.

PACAP причетний не лише до гострої стрес-відповіді, а й до процесів навчіння та пам'яті: він модулює синаптичну пластичність і консолідацію, що робить його привабливою мішенню в контексті пам'ять-орієнтованого погляду на ПТСР [52]. Експериментальні дані свідчать, що надмірна активація PACAP-системи в центральному ядрі мигдалини опосередковує шкідливі наслідки хронічного соціального стресу [133], а дія PACAP реалізується за участі різних ділянок мозку та мікроглії [145].

Особливої уваги заслуговує генетичний аспект: поліморфізм у локусі рецептора PAC1 (ADCYAP1R1) асоційований із ризиком ПТСР переважно у жінок, що вказує на статеву специфічність PACAP-залежних механізмів [122]. Сукупно це робить вісь PACAP-PAC1 перспективною точкою прикладання потенційних терапевтичних впливів, зокрема гіпоксичних, здатних модулювати чутливість цього рецепторного каскаду.

1.4.3. Фактори, що індукуються гіпоксією, у стрес-відповіді та ПТСР

У контексті тривалого стресу та ПТСР доцільно враховувати фактори, індуковані гіпоксією, оскільки вони також залучені до шляхів стрес-відповіді. Фактори, що індукуються гіпоксією (HIF-1 α , HIF-2 α), та їхній антагоніст HIF-3 α активуються не лише у відповідь на зниження доступності кисню, а й за інших екстремальних умов, координуючи адаптивні реакції - метаболічне перепрограмування, ангіогенез і нейропротекцію [8, 10, 33, 54]. HIF-1 α відповідає переважно за швидку адаптивну відповідь на зниження парціального тиску кисню, тоді як HIF-2 α - за довготривалу адаптацію та судинне ремоделювання; HIF-3 α діє здебільшого як негативний регулятор перших двох ізоформ.

Хоча гіпоксію та пов'язані з нею фактори рідко вивчають у контексті психічного стресу, дослідження окисного стресу при тривалому стресі та в моделях ПТСР демонструють значний потенціал цього напрямку. Хронічна гіпоксія негативно впливає на когнітивні функції та структури мозку у населення високогір'я [168] та в осіб після COVID-19 [1], а порушення пам'яті, асоційовані з хронічною гіпоксією, описані ще в ранніх роботах [63]. Хронічна гіпоксія погіршує когнітивні функції та стан гіпокампальних нейронів через запальні та окисні шляхи [170]. Натомість гострий і помірний гіпоксичний вплив може чинити протилежний, нейропротекторний ефект [41, 79, 90]. Така подвійність ефектів гіпоксії є ключовою для розуміння її ролі при ПТСР.

1.4.4. Генетичні та епігенетичні чинники ПТСР

Сприйнятливність до ПТСР має суттєвий спадковий компонент і формується взаємодією генів із середовищем [146]. Серед найкраще охарактеризованих локусів

- ген рецептора PAC1 (ADCYAP1R1), поліморфізм якого асоційований із ризиком ПТСР переважно в жінок [122], а також ген BDNF: поліморфізм Val66Met модулює ризик інтрузивних спогадів і ПТСР залежно від статі та часу травматизації [111, 166]. Ці дані безпосередньо пов'язують досліджувані в роботі молекулярні вузли (PACAP та BDNF) з генетичною архітектурою розладу.

Не менш важливим є епігенетичний рівень регуляції: травматичний досвід здатний змінювати патерни метилування ДНК і модифікації хроматину в генах стрес-відповіді, що тривало впливає на їхню експресію. Зокрема, епігенетичну регуляцію системи PACAP-PAC1 розглядають як механізм, що пов'язує травму з порушеннями умовно-рефлекторного страху [42]. Така стійкість епігенетичних змін узгоджується з хронічним, рецидивним перебігом ПТСР і пояснює, чому молекулярні зрушення можуть зберігатися ще довго після травматичної події.

1.4.5. Периферичні біомаркери ПТСР

Пошук периферичних біомаркерів ПТСР є активним напрямом, орієнтованим на об'єктивізацію діагностики та моніторингу терапії. Систематичні огляди описують зміни низки периферичних показників за тривожних і стрес-залежних розладів [160], зокрема в системі BDNF: метааналізи свідчать про асоціацію ПТСР зі зміненими рівнями BDNF у крові [98]. Комбіновані рівні білків шляху tPA-BDNF запропоновано як діагностичну панель для кількох психічних розладів [30], а циркулюючі рівні PACAP асоціюють зі структурними змінами кори при ПТСР [55]. Ці спостереження підкреслюють трансляційний потенціал досліджуваної осі та обґрунтовують пропозицію розглядати її компоненти як кандидатні молекулярні маркери.

1.4.6. Перехресні зв'язки осі HIF-PACAP-PAI-1-BDNF

Розглянуті молекулярні вузли не є ізольованими: вони утворюють функціональну мережу, що сходиться на регуляції дозрівання BDNF. PACAP через шлях PAC1/Gs/cAMP/PKA активує CREB і NF-κB, які підвищують експресію PAI-1 [49, 53]; PAI-1, інгібуючи tPA, зменшує плазмін-опосередковане перетворення proBDNF на зрілий BDNF [114]. Паралельно фактори HIF здатні модулювати як

NF-κB-залежну транскрипцію [126], так і чутливість рецепторного апарату до PACAP, що відкриває можливість непрямого впливу на весь каскад.

Ключовим є те, що ці взаємодії контекст- і доза-залежні. Помірна короткочасна активація HIF-1α асоціюється з адаптивним, пронеуротрофічним станом, тоді як стійке переважання HIF-2α за тривалої тяжкої гіпоксії - з дезадаптивним зниженням зрілого BDNF (див. рис. 1.3). Така біфуркація наслідків залежно від параметрів гіпоксичного стимулу є центральною робочою тезою дисертації й пояснює, чому порівняння різних гіпоксичних впливів в одній моделі є методологічно необхідним.

Слід підкреслити, що пряма роль HIF у ланцюгу PACAP-PAI-1-BDNF при формуванні пам'яті досі не була предметом систематичного експериментального вивчення. Більшість наявних даних отримано в окремих модельних системах (онкологічних, серцево-судинних, нейродегенеративних), а не в контексті ПТСР; перенесення цих уявлень на травма-асоційовану патологію потребує прямої перевірки на поведінково охарактеризованій тваринній моделі з роздільним аналізом ділянок мозку - що й реалізовано в цій роботі.

1.5. Фактори, що індукуються гіпоксією: молекулярна організація, регуляція та ізоформи

Оскільки центральна гіпотеза роботи стосується ролі гіпоксія-залежної транскрипційної програми у формуванні молекулярного фенотипу ПТСР, доцільно окремо розглянути будову та регуляцію самої родини факторів, що індукуються гіпоксією. Саме особливості кисневого сенсингу, розподіл функцій між ізоформами HIF-1α, HIF-2α і HIF-3α та архітектура зворотних зв'язків у цій системі визначають, як слід інтерпретувати зміни рівня відповідних мРНК у мозку тварин після травматичного стресу та гіпоксичних втручань.

1.5.1. Відкриття родини HIF та її доменна організація

Систему кисневого сенсингу описано на початку 1990-х років під час вивчення регуляції гена еритропоєтину: у клітинах, які зазнали гіпоксії, було виявлено ядерний білковий комплекс, що зв'язується з енхансером еритропоєтину й потребує синтезу білка *de novo* [135]. Цей комплекс отримав назву фактора, що індукується гіпоксією (hypoxia-inducible factor, HIF). Подальші дослідження показали, що HIF є не поодиноким білком, а родиною гетеродимерних транскрипційних факторів, які координують кисневий гомеостаз практично в усіх тканинах ссавців [136].

Функціональний HIF є гетеродимером, утвореним однією з кисень-чутливих α -субодиниць (HIF-1 α , HIF-2 α або HIF-3 α) та конститутивно експресованою β -субодиницею HIF-1 β , відомою також як ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). Обидві субодиниці належать до суперродини транскрипційних факторів bHLH-PAS: домен «основна спіраль-петля-спіраль» (bHLH) забезпечує зв'язування з ДНК, а два домени PAS (PAS-A і PAS-B) відповідають за димеризацію та специфічність партнерської взаємодії [33, 136]. Регуляторна специфіка α -субодиниць зумовлена наявністю кисень-залежного домену деградації (oxygen-dependent degradation domain, ODDD) і двох доменів трансактивації - N-кінцевого (N-TAD) та C-кінцевого (C-TAD). N-TAD перекривається з ODDD і значною мірою визначає різницю у наборах генів-мішеней між HIF-1 α та HIF-2 α , тоді як C-TAD є спільним і забезпечує рекрутування коактиваторів p300/CBP [62, 136].

Ген HIF-2 α , ідентифікований незалежно як EPAS1 (endothelial PAS domain protein 1), спершу описували як фактор із переважною експресією в ендотелії [153]; згодом виявилось, що його експресія значно ширша й охоплює нирки, печінку, легені, а також нейрони та гліальні клітини. HIF-3 α кодується окремим геном і, на відміну від перших двох ізоформ, представлений численними сплайс-варіантами, частина яких позбавлена доменів трансактивації [46]. Саме така доменна гетерогенність пояснює, чому три ізоформи, маючи спільний механізм кисневої регуляції, реалізують різні, а подекуди й протилежні, біологічні програми.

1.5.2. Кисень-залежна регуляція стабільності та активності HIF

Принципова особливість системи HIF полягає в тому, що регуляція відбувається переважно на посттрансляційному, а не на транскрипційному рівні: мРНК α -субодиниць синтезується конститутивно, тоді як доступність кисню визначає долю вже синтезованого білка [62]. За нормоксії залишки проліну в ODDD (Pro402 і Pro564 у HIF-1 α людини) гідроксильються пролілгідроксилазами PHD1-3 - Fe²⁺- та 2-оксоглутарат-залежними діоксигеназами, для роботи яких молекулярний кисень є обов'язковим субстратом. Гідроксильований HIF- α розпізнається білком фон Гіппеля-Ліндау (pVHL), який входить до складу E3-убіквітинлігазного комплексу, після чого поліубіквітинований HIF- α швидко деградує в протеасомі [65]. Період напівжиття HIF-1 α за нормоксії становить лише кілька хвилин, що робить систему надзвичайно чутливою до коливань напруги кисню.

Другий, незалежний рівень контролю реалізує фактор, що інгібує HIF (factor inhibiting HIF, FIH-1). Цей фермент гідроксильє консервативний залишок аспарагіну в C-TAD і тим самим перешкоджає взаємодії HIF- α з коактиваторами p300/CBP [82]. Оскільки FIH-1 має нижчу спорідненість до кисню, ніж PHD, за помірної гіпоксії стабілізований HIF- α ще залишається частково інактивованим на рівні C-TAD, і повна транскрипційна активність досягається лише за глибшої десатурації. Така двоступенева архітектура забезпечує градуїровану, а не «все або нічого», відповідь на зниження кисню [71].

За гіпоксії активність обох класів гідроксилаз падає, HIF- α уникає деградації, накопичується в цитоплазмі, транслокується в ядро, димеризується з HIF-1 β і зв'язується з елементами відповіді на гіпоксію (hypoxia response elements, HRE) у промоторах і енхансерах генів-мішеней [162]. Важливо, що система містить вбудований негативний зворотний зв'язок: гени PHD2 і PHD3 самі є мішенями HIF, тож активація HIF підвищує рівень ферментів, які його руйнують. Це зумовлює десенситизацію системи за тривалої або повторюваної гіпоксії й пояснює, чому рівень транскриптів HIF може знижуватися саме тоді, коли білок стабілізований

[147]. Ця обставина має пряме значення для інтерпретації результатів цієї роботи, оскільки в ній вимірювали саме мРНК.

1.5.3. HIF-1 α : гостра метаболічна адаптація

HIF-1 α є найкраще охарактеризованою й найширше експресованою ізоформою родини. Її канонічна функція полягає у швидкому метаболічному перепрограмуванні клітини за дефіциту кисню: HIF-1 підвищує експресію переносників глюкози GLUT1 і GLUT3, більшості гліколітичних ферментів, лактатдегідрогенази А та піруватдегідрогеназкінази 1, що разом зміщують енергетичний метаболізм від окисного фосфорилування до анаеробного гліколізу й обмежують продукцію активних форм кисню мітохондріями [10, 136]. Паралельно HIF-1 регулює гени ангіогенезу, вазомоторного тонуусу, транспорту заліза та аутофагії, а також гени, залучені до контролю клітинного циклу й апоптозу [54].

Часова динаміка відповіді HIF-1 α є характерною: накопичення білка починається вже через кілька хвилин після зниження напруги кисню, досягає максимуму приблизно через 2-8 годин і згасає за тривалішої експозиції, поступаючись місцем HIF-2 α -залежній програмі [8]. Саме тому HIF-1 α розглядають як медіатора гострої, а не хронічної адаптації. У нервовій тканині ця ізоформа є центральним регулятором відповіді на зниження кисню [141], а короточасна її активація асоціюється з нейропротекторним, пронеуротрофічним станом [81]. Водночас надмірна або тривала активація HIF-1 α за тяжкої гіпоксії сприяє формуванню інфламасоми, мітохондріальній дисфункції та загибелі нейронів, що ілюструє дозозалежний характер її дії [24, 94].

1.5.4. HIF-2 α (EPAS1): довготривала адаптація та тканинна специфічність

HIF-2 α поділяє з HIF-1 α механізм кисневої регуляції, однак істотно відрізняється за профілем експресії та набором генів-мішеней. Ця ізоформа експресується більш тканинспецифічно й переважає у відповіді на помірну та тривалу гіпоксію [8]. Класичною мішенню HIF-2 α , а не HIF-1 α , є еритропоетин: у дорослих тварин саме HIF-2 регулює його продукцію в печінці та нирках [121].

Крім того, HIF-2 α контролює гени антиоксидантного захисту, а також бере участь у гомеостазі катехоламінів: тварини з делецією *Eras1* демонструють поліорганну патологію, метаболічні порушення та розбалансований контроль активних форм кисню [131, 153].

Ця функціональна дивергенція має пряме значення для нервової тканини. У нейрон-подібних клітинах за гострої гіпоксії показано переважну активацію саме HIF-2 α -залежного сигналювання [92], а стійке переважання HIF-2 α за тривалої тяжкої гіпоксії пов'язують радше з дезадаптивними наслідками, зокрема зі зниженням продукції зрілого BDNF. Оскільки в цій роботі HIF-1 α і HIF-2 α аналізували роздільно, з'являється можливість оцінити, чи зміщується баланс ізоформ у бік адаптивної чи дезадаптивної програми при експериментальному ПТСР та після різних гіпоксичних впливів.

1.5.5. HIF-3 α : сплайс-варіанти та регуляторна петля

HIF-3 α є найменш вивченою і найгетерогеннішою ізоформою родини. Ген HIF3A дає початок щонайменше кільком десяткам транскриптів, які кодують білки з різним доменним складом [46]. Найдетальніше охарактеризовано короткі варіанти, позбавлені C-TAD, зокрема інгібіторний PAS-білок (inhibitory PAS domain protein, IPAS). Такі форми зберігають здатність до димеризації, але не можуть рекрутувати коактиватори, тому вони конкурують із HIF-1 α і HIF-2 α за HIF-1 β та за зв'язування з HRE, діючи як домінантно-негативні регулятори гіпоксія-індукованої експресії генів [91].

Оскільки сам HIF3A є мішенню HIF-1, короткі варіанти HIF-3 α замикають петлю негативного зворотного зв'язку: активація HIF-1 підвищує рівень власного інгібітора. Разом із індукцією PHD2 і PHD3 це формує багаторівневу систему самообмеження, яка захищає клітину від надмірної гіпоксичної відповіді, але водночас ускладнює пряме зіставлення рівня мРНК із функціональною активністю HIF [46, 146]. Слід зазначити, що уявлення про HIF-3 α виключно як про інгібітор нині переглядається: довгі варіанти здатні утворювати транскрипційно активні димери й регулювати власний набір генів-мішеней [46].

Для цієї роботи HIF-3 α становить особливий інтерес ще й тому, що його експресія швидко й тканиноспецифічно змінюється саме за інтервальної гіпоксії та фізичного навантаження [45]. Отже, ця ізоформа може слугувати чутливим індикатором того, чи задіяно в тканині петлю негативного зворотного зв'язку системи HIF, і чи відрізняється цей процес у травмованих і нетравмованих тварин.

1.5.6. Транскрипційна програма HIF та елементи відповіді на гіпоксію

Гетеродимер HIF зв'язується з консенсусною послідовністю 5'-RCGTG-3' у складі HRE, які розташовані в промоторах, енхансерах або інтронах генів-мішеней. Функціональність конкретного HRE залежить не лише від наявності консенсусу, а й від контексту сусідніх сайтів зв'язування та доступності хроматину, тому лише незначна частина потенційних HRE в геномі є реально активними [162]. Загальна кількість прямих мішеней HIF оцінюється в сотні генів, які охоплюють еритропоез, ангиогенез, енергетичний метаболізм, транспорт іонів, регуляцію pH, аутофагію та виживання клітини [33, 136].

Принципово, що набори мішеней HIF-1 і HIF-2 перекриваються лише частково. Гени гліколізу переважно контролює HIF-1, тоді як еритропоетин, а також частина генів антиоксидантного захисту й ремоделювання судин перебувають переважно під контролем HIF-2 [8, 121]. Це означає, що зміна співвідношення ізоформ, а не сумарний рівень активності HIF, визначає, яку саме адаптивну програму буде запущено в конкретній тканині. Такий погляд обґрунтовує використаний у роботі підхід із роздільним вимірюванням трьох транскриптів у двох функціонально різних ділянках мозку.

1.5.7. Кисень-незалежні механізми активації HIF

Стабілізація HIF- α не є винятковим наслідком дефіциту кисню. Оскільки PHD і FIH-1 потребують Fe²⁺ та 2-оксоглутарату, будь-який чинник, що виснажує ці кофактори або конкурує з ними, здатний активувати систему за нормоксії. Класичним прикладом є іони кобальту: CoCl₂ інгібує Fe²⁺-залежні діоксигенази й, крім того, безпосередньо зв'язується з HIF- α , перешкоджаючи його взаємодії з pVHL [102, 163]. Саме цей механізм лежить в основі моделі «хімічної гіпоксії»,

використаної в експериментальній частині роботи. Водночас кобальт є джерелом метал-індукованого окисного стресу й має кумулятивну токсичність [67], а нейротоксичні ефекти хімічної гіпоксії описано й на клітинних моделях [31], що обмежує тривалість відповідних протоколів.

Другий важливий кисень-незалежний шлях пов'язаний із запаленням: транскрипція HIF1A перебуває під контролем NF-κB, тому прозапальні стимули здатні підвищувати рівень HIF-1α навіть за нормальної оксигенації [126]. Цей механізм безпосередньо пов'язує нейрозапалення, характерне для ПТСР, із гіпоксія-чутливими шляхами й дає змогу пояснити активацію системи HIF у мозку травмованих тварин без реального дефіциту кисню. Додатковим джерелом такої «псевдогіпоксичної» активації є окисний стрес і мітохондріальна дисфункція, добре задокументовані при ПТСР [75].

1.5.8. Особливості системи HIF у нервовій тканині та значення для ПТСР

Мозок споживає непропорційно велику частку кисню й майже не має запасів субстратів, тому система HIF відіграє в ньому особливу роль [141]. Її активація описана не лише за патологічних станів, а й за фізіологічних умов: гіпокампальні нейрони відповідають на власну активність станом функціональної гіпоксії з розгортанням відповідної транскрипційної програми [27]. Це означає, що зміни рівня транскриптів HIF у гіпокампі можуть відображати не лише порушення оксигенації, а й зміну патерну нейрональної активності - що є принциповим для інтерпретації результатів у моделі ПТСР.

Дисрегуляцію системи HIF описано за низки неврологічних і психіатричних станів, і її розглядають як потенційну терапевтичну мішень [94]. Хронічна інтервальна гіпоксія при обструктивному апное сну супроводжується стійкими змінами HIF-залежної сигналізації та автономною дисфункцією [120], тоді як помірні дозовані протоколи зумовлюють протилежний, протекторний ефект [81]. Ця біфуркація наслідків залежно від параметрів стимулу є ключовою для розуміння того, чому різні види гіпоксії можуть давати різноспрямовані поведінкові результати.

Підсумовуючи, система HIF є багаторівневою і самообмежувальною: три ізоформи α -субодиниці мають перекривні, але не тотожні набори мішеней; регуляція відбувається переважно на рівні стабільності білка; а індукція PHD і коротких варіантів HIF-3 α формує негативний зворотний зв'язок, за якого рівень мРНК і функціональна активність можуть змінюватися різноспрямовано. Саме тому в цій роботі три ізоформи аналізували роздільно, у двох ділянках мозку та за трьох принципово різних моделей гіпоксії, а одержані зміни транскриптів інтерпретували з урахуванням описаних вище регуляторних петель.

1.6. Гіпоксія як модулятор стрес-залежної патології

Оскільки і ПТСР, і гіпоксія (як коротко-, так і довготривала) впливають на когнітивні функції, передусім на пам'ять, детальне вивчення ефектів гіпоксії в моделях ПТСР є перспективним. Залежно від тривалості та інтенсивності гіпоксичний стимул здатний зміщувати молекулярні шляхи в бік адаптації або, навпаки, дезадаптації (рис. 1.3).

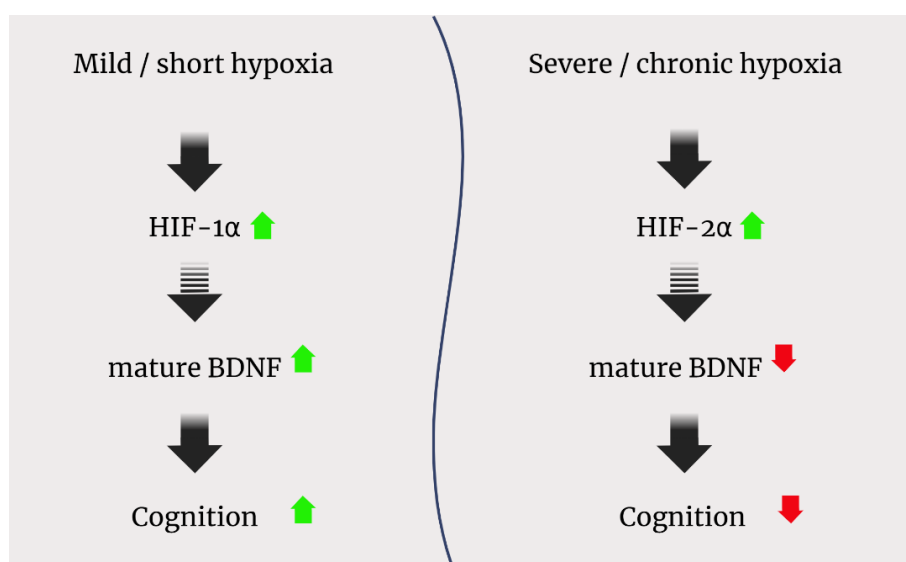


Рис. 1.3. Вплив м'якої/короткочасної та тяжкої/хронічної гіпоксії на BDNF і когніцію. Припускається, що довготривала тяжка гіпоксія негативно впливає на продукцію зрілого BDNF (через HIF-2 α), тоді як коротка інтервальна гіпоксія (через HIF-1 α) сприяє дозріванню BDNF і поліпшенню когнітивних функцій.

1.6.1. Види та класифікація гіпоксії

Гіпоксію визначають як стан, за якого надходження кисню до тканин є недостатнім для підтримання нормального клітинного метаболізму [14]. Гіпоксична (гіпоксемічна) гіпоксія зумовлена зниженням парціального тиску кисню в артеріальній крові - унаслідок перебування на висоті, гіповентиляції, порушень дифузії в легенях чи право-лівого шунтування (сюди належить і гіпоксія при апное сну та хронічному обструктивному захворюванні легень). Анемічна гіпоксія виникає за зниженої киснево-транспортної ємності крові (зменшення кількості функціонального гемоглобіну) за нормального парціального тиску кисню. Циркуляторна (застійна, ішемічна) гіпоксія спричинена недостатнім кровотоком, як-от при серцевій недостатності чи локальній ішемії. Гістотоксична гіпоксія розвивається, коли тканини не здатні утилізувати доступний кисень через блокаду ферментів окисного фосфорилування (класичний приклад - отруєння ціанідами) [14].

За часовою динамікою гіпоксичний вплив поділяють на гострий (секунди-години), хронічний (дні, тижні або постійно) та інтервальний - із чергуванням коротких епізодів гіпоксії та реоксигенації [109]. Інтервальна гіпоксія є особливо потужним стимулом: повторювані цикли гіпоксії-реоксигенації активують транскрипційні фактори HIF-1 та AP-1 навіть ефективніше за стійку гіпоксію, значною мірою через генерацію активних форм кисню під час реоксигенації [109]. Принципово, що клінічний результат інтервальної гіпоксії є двоїстим і залежить від параметрів стимулу: помірні, дозовані протоколи запускають адаптивні (нейро- та кардіопротекторні) програми, тоді як тяжка, часта й тривала гіпоксія (характерна, зокрема, для обструктивного апное сну) чинить шкідливий вплив [109, 127]. В експериментальних дослідженнях ці види моделюють різними способами: інтервальним гіпоксичним тренуванням (дихання гіпоксичною сумішшю за атмосферного тиску), гіпобаричною гіпоксією (зниження барометричного тиску в барокамері, що імітує висоту) та хімічною («тканинною») гіпоксією, за якої стабілізатори HIF на кшталт хлориду кобальту відтворюють гіпоксичну

сигналізацію без реального дефіциту кисню. Саме ці три види порівнюються в експериментальній частині дисертації.

1.6.2. Методи гіпоксичних впливів

У дослідженнях і прикладних застосуваннях використовують ряд видів гіпоксії, що суттєво різняться за механізмом дії. **Інтервальне гіпоксичне тренування** реалізується диханням гіпоксичною газовою сумішшю за атмосферного тиску й передбачає циклічне чергування періодів гіпоксії та нормоксії. Типові протоколи використовують FiO_2 9-16 %, що відповідає симульованій висоті приблизно 2800-5500 м над рівнем моря [109, 127]; зокрема, FiO_2 14 %, застосований у даному дослідженні, еквівалентний диханню атмосферним повітрям на висоті ~ 3300 м. **Гіпобарична гіпоксія** («підйом» у барокамері) моделює перебування на висоті зі зниженням як парціального тиску кисню, так і загального барометричного тиску. В експериментальних роботах зазвичай використовують симульовану висоту 3500-5500 м (тиск 380-500 Торр); у даній дисертації застосовано висоту 4500 м (440 Торр, $p\text{O}_2 \approx 82$ мм рт. ст.), що створює помірно-тяжкий гіпоксичний стимул [129]. **Хімічна гіпоксія**, спричинена хлоридом кобальту (CoCl_2), імітує гіпоксію через інгібування Fe^{2+} -залежних діоксигеназ (передусім PHD і FIH-1), що стабілізує HIF без фактичного зниження кисню. Порівняння цих впливів дає змогу розмежувати ефекти, зумовлені стабілізацією HIF як такою, та ефекти, що потребують додаткових системних і вентиляційних стимулів.

1.6.3. Гіпоксичне кондиціювання як нефармакологічний підхід

Інтервальне гіпоксичне тренування позитивно впливає на перебіг ішемічного інсульту [165], відновлення дихальної моторики [144], наслідки COVID-19 [74], мозковий кровотік [171] та низку інших патологічних станів [107, 155, 168]. Це пояснюється тим, що короткочасна гіпоксія запускає механізми адаптації. Більше того, гіпоксія вибірково послаблює PACAP- та VIP-опосередковане cAMP-сигналювання в астроцитах і нейронах, не впливаючи на нижчележачу активність

аденілатциклази, що свідчить про модуляцію на рівні рецептора [39, 80, 142]. З огляду на встановлену роль PACAP у процесах страху та стрес-відповіді, гіпоксія-індукована десенситизація PACAP може бути одним із механізмів адаптивної стрес-стійкості. Контрольоване інтервальне гіпоксичне тренування дедалі частіше розглядають як визнаний нефармакологічний підхід до підвищення стійкості організму до екстремальних чинників.

Механізми, що лежать в основі сприятливих ефектів гіпоксичного кондиціювання, є багаторівневими. Помірна циклічна гіпоксія стимулює еритропоез та ангіогенез, покращує капіляризацію й мозковий кровотік [171~~169~~], сприяє мітохондріальному біогенезу та підвищує антиоксидантну ємність тканин. На клітинному рівні повторювані субпорогові гіпоксичні стимули запускають програми толерантності (гіпоксичне прекодиціювання), що підвищують стійкість нейронів до подальших ушкоджувальних впливів. Саме поєднання судинних, метаболічних і нейропротекторних адаптацій пояснює широкий спектр станів, за яких інтервальна гіпоксія демонструє користь - від ішемічного інсульту [165] і травми спинного мозку [144] до наслідків COVID-19 [74] і серцево-судинної патології [138].

1.6.4. Доза, інтенсивність і часова структура гіпоксичного стимулу

Ключова теза сучасних уявлень полягає в тому, що терапевтичний потенціал гіпоксії є «питанням дози»: помірні, циклічні протоколи запускають адаптивні програми, тоді як надмірні, тривалі або тяжкі спричиняють пошкодження [107]. Ефект гіпоксичного кондиціювання визначається не самим фактом зниження кисню, а комбінацією інтенсивності, тривалості, кількості циклів і періодичності експозиції. Концептуально це узгоджується із класичною теорією загального адаптаційного синдрому Сельє, згідно з якою сприятливий результат потребує стимулу, що активує адаптивні, а не суто стресорні відповіді. Саме тому в дисертації порівнюються різні види гіпоксії, які різняться за цими параметрами: інтервальна нормобарична (ІНТ), помірно-тяжка тривала гіпобарична (Bar) та фармакологічна стабілізація HIF (CoCl₂). Таке зіставлення дає змогу перевірити

визначити, який патерн оксигенації забезпечує перехід молекулярних шляхів у адаптивний стан.

1.6.5. Механізм дії хімічної гіпоксії, спричиненої CoCl_2

«Хімічна гіпоксія», спричинена хлоридом кобальту, широко застосовується в клітинних і тваринних моделях. CoCl_2 імітує гіпоксію, інгібуючи Fe^{2+} -залежні діоксигенази, виявляючи найбільшу активність щодо PHD і FIH-1 - ферментів, які регулюють стабільність та транскрипційну активність HIF; кобальт здатний також безпосередньо зв'язуватися з HIF- α , перешкоджаючи його взаємодії з pVHL. Унаслідок цього CoCl_2 активує HIF-1 α та нижчележачі шляхи без реального дефіциту кисню. Водночас тривале введення кобальту є кумулятивно токсичним і пов'язане з ризиком системних та органних уражень, що накладає обмеження на тривалість протоколу. Зокрема, наночастинки кобальту спричиняють мітохондріальне пошкодження, надмірну продукцію активних форм кисню (АФК) і агрегацію β -амілоїду в моделі *Caenorhabditis elegans*, що свідчить про нейродегенеративний потенціал кобальт-індукованого окисного стресу [173]. Крім того, хронічне введення CoCl_2 порушує автофагічний потік через ROS-опосередковану активацію HIF-1 α , спричиняючи демієлінізацію, підвищення проникності гематоенцефалічного бар'єра та мітохондріальну дисфункцію в мозку мишей [174]. Принципова відмінність CoCl_2 від інгаляційних моделей полягає в тому, що він не задіює системні та вентиляційні (хеморефлекторні) компоненти відповіді, які рекрутуються при диханні гіпоксичною сумішшю або перебуванні в барокамері. Це робить порівняння CoCl_2 з ІНТ і Bar інформативним інструментом для розмежування ефектів, залежних виключно від стабілізації HIF, та ефектів, що потребують додаткових стимулів.

Накопичені дані підтримують концепцію «терапевтичного вікна» гіпоксії: помірні, дозовані, циклічні протоколи активують адаптивні програми [25, 137], тоді як надмірні - шкодять. Гіпоксія поліпшує когнітивні функції в осіб старшого віку [19], а гостра інтервальна гіпоксія здатна підвищувати експресію BDNF у стовбурі мозку [159]. Водночас ефекти не є однозначними: щоденна нормобарична гіпоксія

протягом двох тижнів може й знижувати рівень BDNF у плазмі молодих дорослих [12], що підкреслює залежність результату від дози, тривалості та цільової тканини.

Хімічна гіпоксія, спричинена хлоридом кобальту, є зручною, але механістично відмінною моделлю. CoCl_2 стабілізує HIF, інгібуючи Fe^{2+} -залежні діоксигенази та безпосередньо зв'язуючись із HIF- α , перешкоджаючи його взаємодії з pVHL [102, 163]. Водночас кобальт є джерелом метал-індукованого окисного стресу й кумулятивно токсичним [67]: наночастинки кобальту індукують мітохондріальну фрагментацію, надлишкову генерацію АФК і β -амілоїдну токсичність [173], а хронічне системне введення CoCl_2 порушує автофагічний потік і спричиняє нейродегенеративні зміни в мозку [174], що обмежує тривалість протоколу та відрізняє його дію від інгаляційних моделей.

Окремий напрям становлять кисень-орієнтовані підходи протилежної спрямованості - гіпербарична оксигенація, яку досліджують як потенційний метод лікування ПТСР у ветеранів [43, 44]. Зіставлення гіпо- та гіпероксичних стратегій підкреслює, що ключовим є не напрям зміни оксигенації як такий, а здатність втручання запустити адаптивне молекулярне перепрограмування - теза, яку безпосередньо перевіряє експериментальна частина цієї роботи.

1.6.6. Подвійність інтервальної гіпоксії: терапевтична та патологічна форми

Важливо чітко розмежовувати терапевтичну інтервальну гіпоксію та її патологічну форму. Хронічна інтервальна гіпоксія, характерна для обструктивного апное сну, чинить виразно шкідливий вплив: вона погіршує когнітивні функції та стан гіпокампальних нейронів через запальні й окисні шляхи [170] і є драйвером вегетативних порушень через гіперактивацію каротидного хеморефлексу [119, 120]. Відмінність між шкідливою та сприятливою формами полягає саме в параметрах стимулу - тяжкості, частоті, тривалості десатурацій і наявності відновлювальних періодів.

Ця дихотомія має пряме методологічне значення для дисертації. Інгаляційні моделі гіпоксії (ИТ, Bar) рекрутують системні та вентиляційні (хеморефлекторні)

компоненти відповіді, тоді як фармакологічна стабілізація HIF хлоридом кобальту діє переважно внутрішньоклітинно, минаючи ці контури. Тому порівняння трьох видів дає змогу розмежувати ефекти, залежні виключно від стабілізації HIF, та ефекти, що потребують додаткових системних стимулів - розрізнення, критичне для інтерпретації як молекулярних, так і поведінкових результатів.

1.6.7. Гіпоксія та тривожні розлади

Зв'язок гіпоксії з афективною та тривожною симптоматикою підтверджено як клінічними, так і експериментальними даними, що робить його безпосередньо релевантним для розуміння ПТСР як стрес-залежного розладу. Епідеміологічні дослідження свідчать, що проживання на більшій висоті над рівнем моря асоціюється зі зростанням симптомів депресії, тривоги та суїцидальних думок: у великій когорті медичних інтернів перехід від низької до високої висоти корелював із вищими показниками депресії (PHQ-9) і тривоги (GAD-7) [78], а оглядові роботи пов'язують хронічну гіпобаричну гіпоксію на висоті зі зниженим мозковим оксигенуванням, зміненням метаболізмом моноамінів і підвищеним ризиком депресії та суїциду [77]. Паралельно хронічна гіпоксія, характерна для обструктивного апное сну, супроводжується підвищеною поширеністю депресії та тривоги: метааналіз показав, що апное сну особливо часто трапляється при великому депресивному розладі [149].

Тваринні моделі відтворюють цей зв'язок на поведінковому та нейрохімічному рівнях. Тривала гіпобарична гіпоксія індукує депресивно-подібну поведінку у самиць щурів [72], посилює тривожність і ангедонію [142] та спричиняє нейрохімічні зміни у фронтальній корі - ділянці, що бере участь у регуляції емоцій [17]. Хронічна гіпоксія, своєю чергою, зумовлює окисний стрес і дефіцити просторового навчання [127] і асоціюється з тривожно-подібною поведінкою. Ці дані узгоджуються з уявленням про гіпоксію (передусім тяжку та хронічну) як чинник, здатний посилювати дезадаптивні емоційні стани, зокрема у вразливих особин.

Водночас, відповідно до дозозалежної гіпоксії, ІНТ може чинити протилежний, антидепресивний та анксиолітичний ефект. Показано, що контрольована інтервальна гіпоксія стимулює гіпокампальний нейрогенез і справляє антидепресивно-подібну дію в кількох валідованих тестах (форсоване плавання, хронічний помірний стрес, тест пригніченого новизною харчування), причому цей ефект опосередкований посиленням сигналювання BDNF-TrkB і блокується при пригніченні нейрогенезу [172]. Ця біфуркація - шкідлива тяжка/хронічна проти сприятливої гіпоксії - концептуально пов'язує огляд літератури з центральною гіпотезою дисертації й безпосередньо узгоджується з експериментальним результатом, за яким саме гіпоксія (ІНТ), а не тяжчі гіпоксичні умови, забезпечувала анксиолітичний ефект у ПТСР-тварин.

1.7. Експериментальні моделі ПТСР і поведінкові парадигми

Оскільки перевірка гіпотез, пов'язаних із гіпоксією, у пацієнтів значною мірою обмежена етичними та безпековими міркуваннями, взаємодію RASAP, PAI-1, HIF і BDNF доцільно вивчати на тваринних моделях із попереднім поведінковим тестуванням. Складні системи, що лежать в основі ПТСР, не відтворюються в умовах *in vitro* навіть у багатотканинних культурах, тому дослідження потребує підходу *in vivo*.

1.7.1. Модель single prolonged stress (SPS)

Серед валідованих моделей ПТСР у гризунів модель *single prolonged stress* (SPS) посідає особливе місце завдяки поєднанню кількох послідовних стресорів (імобілізація, вимушене плавання та ефірний наркоз) із подальшим періодом «інкубації». Така структура відтворює низку ключових ознак ПТСР, зокрема стійкі зміни осі стресу та тривожно-подібну поведінку, і добре зарекомендувала себе впродовж двох десятиліть застосування. Поряд із SPS використовують й інші парадигми - моделі вивченої безпорадності, повторюваного електрошоку лап, стресу хижака та раннього життєвого стресу, - кожна з яких відображає окремі

аспекти розладу. Вибір SPS у цій роботі зумовлений її відтворюваністю, фокусом на тривожному компоненті фенотипу та можливістю поєднання з молекулярним аналізом дискретних ділянок мозку.

1.7.2. Поведінкові тести оцінки тривожно-подібної поведінки

Для оцінки тривожно-подібної поведінки та локомоторної активності застосовують стандартизовані парадигми, що ґрунтуються на конфлікті між дослідницькою мотивацією та уникненням потенційно небезпечних відкритих чи освітлених просторів. **Тест «відкрите поле» (OFT)** оцінює загальну локомоцію та схильність уникати центральної зони. **Піднесений хрестоподібний лабіринт (EPM)** використовує природну аверсію гризунів до відкритих піднесених рукавів і вважається чутливим до тривожного компонента фенотипу. **Тест «темно-світла камера» (DLB)** ґрунтується на уникненні яскраво освітленого відсіку. Спільне застосування цих тестів дає змогу розмежувати тривожні та суто локомоторні зміни, що особливо важливо при інтерпретації ефектів гіпоксичних втручань, здатних самотійно впливати на рухову активність. Саме така батарея тестів використана в експериментальній частині дисертації.

Валідність SPS підтверджується відтворюваністю поведінкового фенотипу та можливістю розмежування сприйнятливих і резильєнтних тварин, що моделює індивідуальні відмінності людей [37]. Модель застосовна й для дослідження статевих відмінностей [105] та когнітивних аспектів, зокрема гнучкості поведінки й утримання згасання страху [28]. Водночас варіабельність ефектів SPS у тесті «відкрите поле» є відомим обмеженням, що враховано при інтерпретації результатів цієї роботи.

Поведінкові парадигми, застосовані в дослідженні, є стандартизованими та валідованими: тест «відкрите поле» оцінює локомоцію й тривожно-подібну поведінку [132], піднесений хрестоподібний лабіринт є визнаним тестом тривожності гризунів [161], а тест «темно-світла камера» ґрунтується на природному уникненні освітлених просторів [20]. Спільне застосування цих тестів

дає змогу відрізнити справжній анксиолітичний ефект від неспецифічних змін локомоції - що є критичним при оцінці гіпоксичних втручань.

1.7.3. Обґрунтування вибору генів-мішеней і ділянок мозку

Вибір п'яти генів-мішеней безпосередньо впливає з окресленої молекулярної осі. Три ізоформи факторів, що індукуються гіпоксією (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α), обрано для роздільної оцінки гострого адаптивного (HIF-1 α), довготривалого (HIF-2 α) та регуляторно-гальмівного (HIF-3 α) компонентів гіпоксичної відповіді. PACAP (Adcyap1) представляє нейропептидну ланку стрес-відповіді, функціонально пов'язану з ПТСР, а PAI-1 (Serpine1) - ключовий ефектор, через який сигнал транслюється в зміну дозрівання BDNF. Спільний аналіз цих генів дає змогу простежити запропоновану вісь HIF-PACAP-PAI-1 на одному наборі зразків.

Вибір гіпокампа та медіальної префронтальної кори як ділянок аналізу зумовлений їхньою центральною роллю в патофізіології ПТСР: гіпокамп забезпечує контекстуалізацію страхових асоціацій і є особливо вразливим до стрес-індукованого навантаження, тоді як мПФК здійснює низхідний гальмівний контроль над реактивністю на загрозу. Зіставлення цих функціонально різних структур дає змогу виявити регіональну специфічність молекулярних змін - що й стало одним із ключових результатів роботи.

1.8. Інтегративна модель та обґрунтування напрямку дослідження

На думку авторів, HIF (як HIF-1 α , так і HIF-2 α) може безпосередньо впливати на сигнальні шляхи BDNF, проте його роль у ланцюгу PACAP-PAI-BDNF під час формування пам'яті досі не вивчена. Тому доцільно оцінювати баланс цих чотирьох молекул у моделях ПТСР, враховуючи, що різні тривалість і тип гіпоксії можуть по-різному впливати на сигнальні шляхи; це потребує систематичного підходу з порівнянням моделей.

Запропонована робоча гіпотеза полягає в тому, що короточасна гіпоксія, яка підвищує HIF, здатна впливати на PACAP через шлях PAC1R/Gs/cAMP. Знижена чутливість рецепторів до PACAP, своєю чергою, зменшує експресію PAI-1 кількома шляхами, що розблоковує перетворення proBDNF на зрілий BDNF (рис. 1.4). Таким чином, терапія з використанням короточасної гіпоксії потенційно може зменшувати симптоми ПТСР і поліпшувати когнітивні функції у пацієнтів і тваринних моделях.

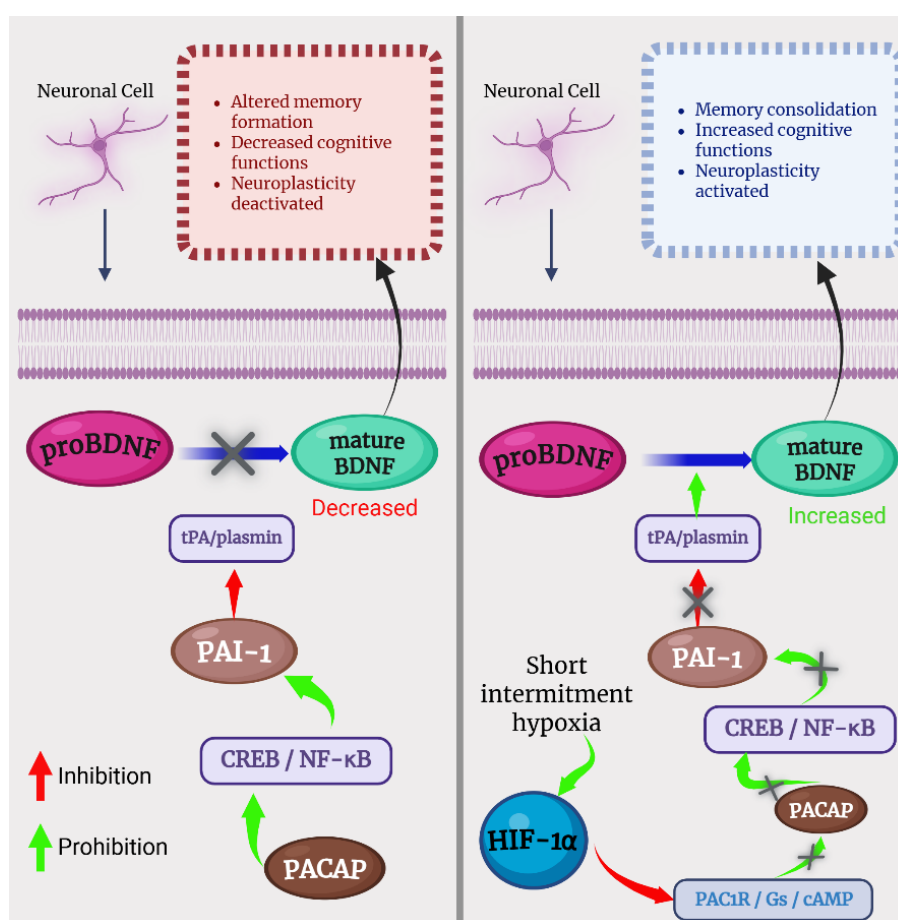


Рис. 1.4. Сучасне уявлення про вплив гіпоксії на молекулярні шляхи, асоційовані з когнітивними порушеннями при ПТСР. За звичайних умов PACAP підвищує експресію PAI-1 через шлях CREB/NF-κB; PAI-1 блокує утворення зрілого BDNF, що призводить до когнітивних порушень. За умов гіпоксії HIF-1α опосередковано змінює чутливість рецепторів до PACAP, унаслідок чого знижується експресія PAI-1 і поліпшуються когнітивні функції, пов'язані зі зростанням продукції зрілого BDNF.

Беручи до уваги пряму пов'язаність PACAP із PAI-1 та підвищення його експресії після стресу [53], вплив на шлях активації PACAP розглядають як один із можливих напрямів потенційної терапії ПТСР. Низка досліджень показала, що щодо загибелі клітин PACAP відіграє протекторну, антиапоптичну роль [61] і здатний модулювати експресію HIF [48], що додатково підкреслює взаємопов'язаність розглянутих молекулярних вузлів.

Запропонована інтегративна модель має кілька рівнів перевірюваних передбачень. По-перше, якщо ПТСР супроводжується активацією гіпоксія-чутливих шляхів, то у відповідних ділянках мозку має спостерігатися підвищення експресії ізоформ HIF - причому з очікуваною регіональною специфічністю (гіпокамп як найвразливіша структура). По-друге, якщо терапевтичний потенціал гіпоксії визначається способом її моделювання, то різні протоколи (інтервальна нормобарична, тяжка тривала гіпобарична, фармакологічна) повинні давати відмінні поведінкові та молекулярні наслідки навіть за схожої первинної мішені - стабілізації HIF. По-третє, найсприятливіша модель має одночасно нормалізувати поведінку та зміщувати молекулярний профіль у бік адаптивного стану.

Перевірка цих передбачень потребує дизайну, що поєднує валідовану модель ПТСР, стандартизовану батарею поведінкових тестів і кількісний аналіз експресії ключових генів осі HIF-PACAP-PAI-1 у двох функціонально різних ділянках мозку. Саме такий підхід покладено в основу експериментальної частини дисертації, методологію якої описано в розділі 2, а результати - у розділах 3 і 4.

Аналіз літератури свідчить, що ПТСР доцільно розглядати не лише як розлад обробки стресу, а й як порушення молекулярної адаптації. Наявні дані вказують на центральну роль PACAP, який модулює чутливість до стресу через сигнальні шляхи PAI-1 і BDNF. Висунуто припущення, що гіпоксія-чутливі механізми, зокрема активація HIF-1 α , можуть протидіяти патологічному сигналюванню PACAP, знижуючи чутливість рецепторного каскаду та сприяючи відновленню дозрівання BDNF. У цьому контексті контрольована короточасна гіпоксія може розглядатися як потенційний чинник зміщення молекулярних шляхів від дезадаптивного до адаптивного стану при ПТСР.

Водночас будь-яка модель ПТСР має обмеження: недостатньо вивчені статеві відмінності, неможливість повного перенесення психологічних характеристик людини на тваринні моделі, а також етичні та безпекові обмеження для перевірки гіпотез, пов'язаних із гіпоксією, у пацієнтів. Тому взаємодію PACAP, PAI-1 і BDNF за умов гіпоксії доцільно вивчати саме на тваринній моделі з попереднім поведінковим тестуванням, що й визначає дизайн експериментальної частини цієї роботи. Невирішеними залишаються питання регіон-специфічної активації окремих ізоформ HIF при ПТСР та залежності ефектів різних типів гіпоксії, на з'ясування яких спрямовано подальші розділи дисертації.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження виконано у відділі загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України. Робота побудована як єдиний експеримент із двома рівнями аналізу: (1) встановлення базового молекулярно-поведінкового фенотипу ПТСР (порівняння інтактних і травмованих тварин) та (2) оцінка впливу трьох видів гіпоксії на цей фенотип. Нижче послідовно описано тварин, дизайн груп, протокол моделювання ПТСР, гіпоксичні втручання, поведінкові тести, забір тканин, молекулярно-біологічні методи та статистичний аналіз.

2.1. Тварини та етичні аспекти дослідження

Експерименти проведено на щурах-самцях альбіносах (*Rattus norvegicus*) віком три місяці (середня маса 320-350 гр.), отриманих із віварію Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України. Тварин утримували групами за стандартних умов віварію з вільним доступом до води та корму (*ad libitum*) і 12-годинним циклом світло/темрява. Перед початком експериментальних процедур тваринам надавали 7-денний період акліматизації до нових умов утримання та хендлінгу; для цього їх переводили з віварію Інституту в окреме експериментальне приміщення.

Усі етапи експерименту виконано відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 26; № 3447-IV) та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Було вжито всіх можливих заходів для мінімізації страждань тварин та зменшення їх кількості. Етичну відповідність дослідження схвалено Комітетом з біоетики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Тварин утримували в стандартних клітках по 4-5 особин за контрольованих умов (температура 22 ± 2 °C, відносна вологість 50-60 %). Розподіл на групи виконували методом простої рандомізації; за можливості поведінкове тестування та подальший молекулярний аналіз проводили в умовах засліплення дослідника щодо групової належності тварини (особа, яка виконувала тестування, не збігалася з особою, що здійснювала статистичну обробку). Розмір груп обрано з урахуванням типових значень для подібних поведінкових і молекулярних досліджень на гризунах та принципу мінімізації кількості тварин (3R).

Перед початком дослідження кожен тварину зважували та ідентифікували за допомогою маркування хвостів нетоксичним маркером. Маса тварин у групах не відрізнялася статистично на момент початку експериментальних процедур, що підтверджувало відсутність систематичного зміщення при рандомізації. Щоденний моніторинг стану здоров'я тварин включав оцінку зовнішнього вигляду шерсті, активності, апетиту та загального стану. За весь період експерименту не зафіксовано випадків передчасної загибелі тварин або необхідності їхнього дострокового виведення з дослідження.

Вибір самців зумовлений необхідністю уникнення впливу коливань естрогенового циклу на поведінкові показники та експресію генів, що є добре задокументованим конфаундером у дослідженнях тривожно-подібної поведінки гризунів. Тривимісячний вік відповідає раннім стадіям дорослості щурів, що робить модель релевантною до вікового діапазону найвищого ризику розвитку посттравматичного стресового розладу (ПТСР) у людей. Використання аутбредних альбіносних щурів забезпечує достатню генетичну варіабельність популяції, що наближає модель до гетерогенності людської популяції.

Умови утримання тварин відповідали міжнародним стандартам лабораторної практики. Температуру та вологість у приміщенні контролювали автоматично з реєстрацією параметрів. Клітки з підстилкою з деревної стружки змінювали тричі на тиждень. Стандартний комбікорм для лабораторних гризунів забезпечував збалансований раціон з достатнім вмістом білків, жирів, вуглеводів, вітамінів і мікроелементів. Доступ до фільтрованої питної води був необмеженим через

автоматичні поїлки. Фотоперіод підтримувався автоматично з увімкненням світла о 07:00 та вимкненням о 19:00, що відповідає стандартному 12-годинному циклу світло/темрява для лабораторних гризунів.

2.2. Дизайн дослідження та експериментальні групи

Тварин (загалом $n = 105$) випадковим чином розподілили на вісім груп: (1) Контроль ($n = 18$) - без втручань; (2) Контроль + CoCl_2 ($n = 12$); (3) Контроль + ІНТ ($n = 12$) -; (4) Контроль + Bar ($n = 12$) - гіпобарична гіпоксія; (5) ПТСР ($n = 18$) - тварини з SPS-індукованим ПТСР; (6) ПТСР + CoCl_2 ($n = 11$); (7) ПТСР + ІНТ ($n = 10$); (8) ПТСР + Bar ($n = 12$). Базовий молекулярно-поведінковий фенотип ПТСР (Розділ 3) визначали порівнянням груп Контроль і ПТСР; вплив моделей гіпоксії (Розділ 4) оцінювали зіставленням відповідних груп із втручаннями та без них.

Розмір вибірки визначали з урахуванням попередніх даних щодо варіабельності поведінкових показників у моделі тривалого однократного стресу (single prolonged stress, SPS) та очікуваного розміру ефекту для молекулярних маркерів. Для основних груп (Контроль і посттравматичний стресовий розлад, ПТСР) використовували збільшений обсяг вибірки ($n = 18$ та $n = 15$ відповідно), що забезпечувало достатню статистичну потужність для виявлення помірних ефектів. Для груп із гіпоксичними втручаннями обсяг становив $n = 12$ на групу, що є стандартним для доклінічних досліджень із молекулярними кінцевими точками.

Рандомізацію тварин у групи проводили методом генерації випадкових чисел із використанням програмного середовища Python. Кожній тварині присвоювали унікальний ідентифікаційний номер, після чого алгоритм випадковим чином розподіляв тварин за групами з дотриманням заданих розмірів вибірок. Рандомізація була стратифікована за масою тіла для забезпечення рівномірного розподілу тварин різної ваги між групами. Оператори, які проводили поведінкове тестування та молекулярний аналіз, не були поінформовані про приналежність тварин до груп (засліплення), що мінімізувало ризик систематичного зміщення при оцінці результатів.

Дизайн дослідження був побудований за принципом «від фенотипу до механізму»: на першому етапі (Контроль проти посттравматичного стресового розладу, ПТСР) встановлювали базовий молекулярно-поведінковий фенотип, а на другому - оцінювали здатність різних видів гіпоксії модулювати цей фенотип. Такий послідовний підхід дозволяв, по-перше, підтвердити валідність моделі перед тестуванням терапевтичних втручань і, по-друге, коректно інтерпретувати ефекти гіпоксії відносно встановленого базису. Усі тварини проходили ідентичну послідовність процедур: акліматизація, стресорний вплив (або його відсутність для контрольних груп), гіпоксичне втручання (або його відсутність), поведінкове тестування, евтаназія та забір тканин.

2.3. Модель single prolonged stress (SPS)

Для індукції ПТСР-подібного фенотипу застосовано протокол single prolonged stress (SPS). Процедуру проводили впродовж одного дня та складалася вона з трьох послідовних стресорів. Спочатку тварин піддавали іммобілізаційному стресу протягом 120 хв, розміщуючи у фіксаторі зі збереженням нормального дихання. Одразу після іммобілізації тварин піддавали вимушеному плаванню у воді кімнатної температури (22 ± 1 °C) протягом 15 хв в індивідуальних циліндрах. Після короткого обсушування тварин піддавали дії парів діетилового ефіру в герметичній індукційній камері до втрати рефлексу перевертання (приблизно 30-60 с) під безперервним контролем для запобігання зупинці дихання. Після відновлення тварин повертали в домашні клітки й залишали недоторканими на 7 днів (період інкубації) перед подальшими процедурами (рис. 2.1).

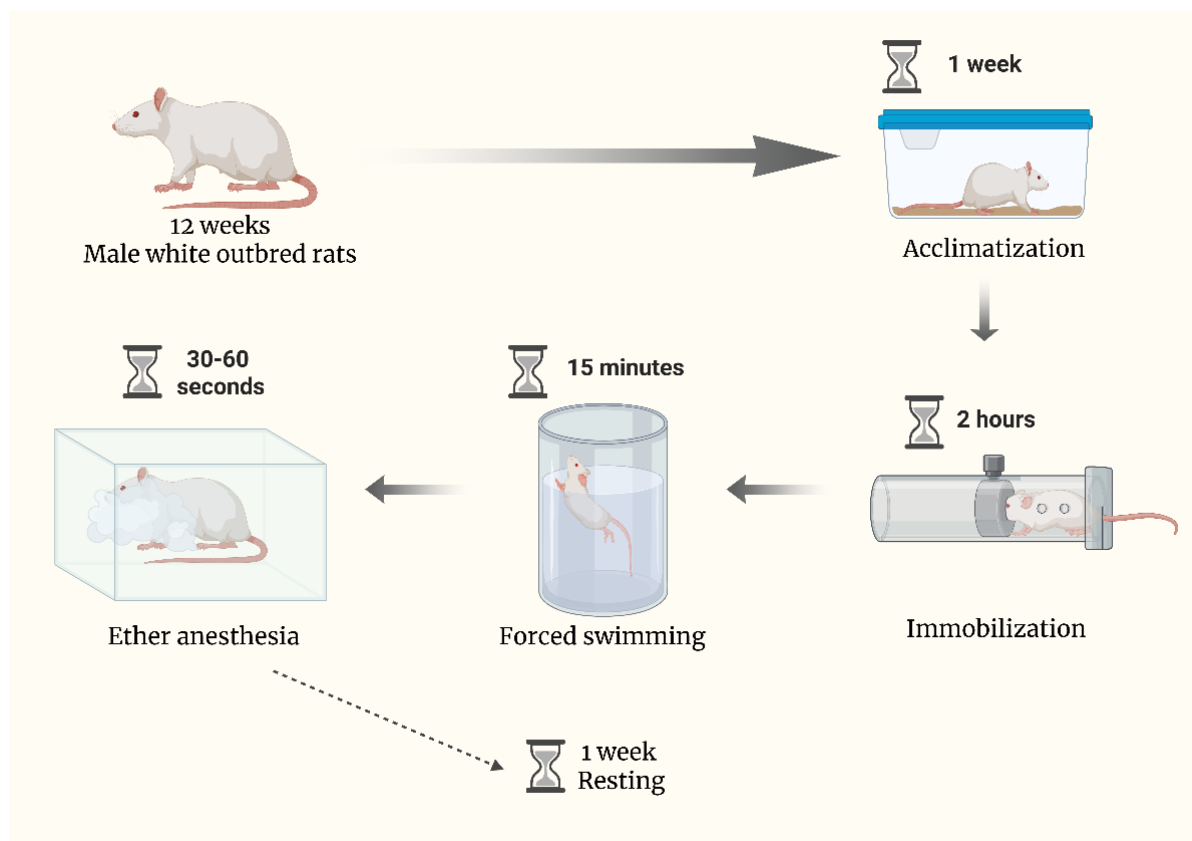


Рис. 2.1. Дизайн експерименту. Щури-самці (12 тижнів) проходили 1 тиждень акліматизації, після чого застосовували протокол single prolonged stress (SPS) - іммобілізація (2 год), вимушене плавання (15 хв) та ефірний наркоз (30-60 с). Далі тварин залишали недоторканими на 1 тиждень до поведінкового та молекулярного оцінювання.

Вибір протоколу SPS зумовлений тим, що поєднання кількох різних за природою стресорів (фізичного обмеження, психогенного компонента вимушеного плавання та фармакологічного стресу ефірного наркозу) з наступним періодом «інкубації» відтворює стійкі, а не транзиторні зміни, що краще відповідає хронічному характеру ПТСР. Семиденний інтервал між стресовим епізодом і тестуванням є критичним: саме впродовж цього періоду формуються стійкі нейроендокринні та поведінкові зміни, тоді як одразу після стресу вони ще нестабільні.

Фізичне обмеження руху (рестрикція) є потужним психогенним стресором, що активує гіпоталамо-гіпофізарно-надниркову вісь (ГГН-вісь) та

симпатоадреналову систему. Під час рестрикції тварину поміщували в прозорий пластиковий рестриктор циліндричної форми діаметром 6 см, що унеможлилював розвороти та значні рухи, але не обмежував дихання. Рестриктор мав вентиляційні отвори для забезпечення адекватного повітрообміну. Протягом усього періоду рестрикції оператор візуально контролював стан тварини через прозорі стінки контейнера. Тривалість рестрикції становила 2 години, що відповідає стандартному протоколу моделі тривалого однократного стресу (single prolonged stress, SPS) та є достатнім для індукції стійкої активації стрес-систем.

Вимушене плавання проводили безпосередньо після завершення рестрикції. Тварину переносили в скляний циліндр діаметром 24 см, заповнений водою температурою 24 ± 1 градус Цельсія на висоту 30 см, що унеможлилювало опору на дно або стінки. Тривалість вимушеного плавання становила 20 хвилин. Під час процедури оператор постійно перебував поруч для забезпечення безпеки тварини. Після завершення плавання тварину витягували, обсушували рушником і поміщували під інфрачервону лампу для відновлення нормальної температури тіла протягом 15 хвилин перед наступним етапом протоколу.

Завершальним етапом протоколу моделі тривалого однократного стресу (single prolonged stress, SPS) була діетилефірна анестезія. Тварину поміщували у скляну камеру об'ємом 3 літри, на дно якої закладали марлевий тампон, просочений діетиловим ефіром. Експозицію продовжували до повної втрати свідомості, яку визначали за відсутністю рефлексу випрямлення та реакції на больовий стимул (щипок хвоста). Як правило, втрата свідомості настала протягом 60-90 секунд. Після досягнення анестезії тварину негайно виймали з камери та залишали на відкритому повітрі до повного відновлення свідомості (зазвичай 5-10 хвилин). Вибір діетилового ефіру зумовлений його швидкою дією та коротким періодом відновлення, що мінімізує додатковий стрес від тривалої анестезії.

Після завершення усіх трьох етапів протоколу тривалого однократного стресу тварин повертали до домашніх кліток і залишали без будь-яких втручань на 7 діб. Цей «інкубаційний» період є критично важливим компонентом моделі: саме протягом цього часу формуються стійкі нейробіологічні зміни, що лежать в основі

посттравматичного стресового розладу (ПТСР)-подібного фенотипу. Семиденний інтервал відповідає періоду консолідації травматичної пам'яті та реорганізації нейрональних контурів, після якого поведінкові зміни стають стабільними та відтворюваними.

2.4. Гіпоксичні втручання

2.4.1. Інтервальна гіпоксія

ІНТ відтворювали диханням контрольованою гіпоксичною газовою сумішшю за атмосферного тиску. Групи по п'ять тварин розміщували в герметичних скляних камерах, які почергово продували гіпоксичною сумішшю (14 % кисню, 86 % азоту; $pO_2 = 106$ мм рт. ст., що еквівалентно диханню атмосферним повітрям на висоті ~ 3300 м) або кімнатним повітрям, з витратою, достатньою для насичення камери впродовж першої хвилини кожного циклу. Кожен цикл складався з 5 хв гіпоксії та 5 хв нормоксії; цикли безперервно повторювали протягом 60 хв (6 повних циклів за сесію з 1-хвилинним початковим зрівноважуванням камери). Сесії проводили один раз на день упродовж 14 діб поспіль.

Вибір концентрації кисню 12% для інтервального гіпоксичного тренування (ІНТ) обґрунтований кількома міркуваннями. По-перше, ця концентрація відповідає помірній гіпоксії, еквівалентній перебуванню на висоті приблизно 4000-4500 метрів над рівнем моря, і перебуває в межах так званого «терапевтичного вікна» гіпоксичного кондиціювання. По-друге, саме цей діапазон кисню активує систему факторів, що індукуються гіпоксією (HIF), без індукції значного клітинного пошкодження або апоптозу. По-третє, концентрація 12% широко використовується в доклінічних та клінічних дослідженнях інтервальної гіпоксії, що забезпечує порівнянність результатів із літературними даними. Газова суміш готувалася шляхом змішування медичного азоту з атмосферним повітрям у контрольованих пропорціях із верифікацією складу суміші портативним оксиметром перед кожним сеансом.

Протокол інтервального гіпоксичного тренування (ІНТ) складався з 14 послідовних щоденних сеансів. Кожен сеанс включав чотири цикли гіпоксичної експозиції тривалістю 15 хвилин кожен із нормоксичними інтервалами по 15 хвилин між ними. Загальна тривалість одного сеансу становила приблизно 2 години. Під час гіпоксичних фаз герметичну камеру заповнювали гіпоксичною газовою сумішшю (12% кисню, баланс - азот), під час нормоксичних фаз камеру відкривали для вільного доступу атмосферного повітря. Тварин поміщували в камеру групами по п'ять особин, що зменшувало стрес від ізоляції. Поведінку тварин під час сеансів контролювали візуально: реєстрували ознаки задишки, ціанозу або надмірної збудженості. За весь період інтервального гіпоксичного тренування не зафіксовано випадків непереносимості процедури або побічних ефектів.

2.4.2. Гіпобарична гіпоксія (Bar)

Гіпобаричну гіпоксію виконували за допомогою поміщення щурів у барокамеру з симульованою висоти до 4500 м (440 Торр; $pO_2 = 92$ мм рт. ст. для сухого повітря; зволожений вдихуваний $pO_2 \approx 82$ мм рт. ст.). Інтервальну гіпобаричну парадигму (4500 м; 4 год/добу) адаптовано з моделі Santocildes та ін. [129]; на висоті 4500 м вдихуваний парціальний тиск кисню ~ 82 мм рт. ст. забезпечує помірно-тяжкий гіпоксичний стимул. Для мінімізації додаткового стресу застосовано поступове «сходження» протягом 1-5 діб: день 1 - 1000 м (676 Торр), 30 хв; день 2 - 2000 м (600 Торр), 60 хв; день 3 - 3000 м (532 Торр), 120 хв; день 4 - 4000 м (463 Торр), 180 хв; день 5 - 4500 м (440 Торр), 240 хв. Із 6-ї по 14-ту добу тварин щодня експонували на висоті 4500 м (440 Торр) по 240 хв за сесію.

Барокамера являла собою герметичний циліндричний контейнер із прозорою кришкою, обладнаний вакуумним насосом із контрольованою швидкістю відкачування повітря та каліброваним барометром. Тиск знижували поступово протягом 10-15 хвилин до цільового рівня 440 торр (що відповідає парціальному тиску кисню приблизно 92 мм ртутного стовпа для сухого повітря), після чого підтримували стабільний тиск протягом усієї експозиції. Декомпресію після

завершення сеансу проводили повільно (протягом 10 хвилин) для запобігання баротравмі. Протокол гіпобаричної гіпоксії (Bar) передбачав щоденні двогодинні сеанси протягом 14 діб, що за загальною тривалістю експозиції та кількістю сеансів відповідало протоколу інтервального гіпоксичного тренування (ІНТ). Ця відповідність була запланована для забезпечення коректного порівняння ефектів двох інгаляційних моделей гіпоксії.

Принципова відмінність гіпобаричної гіпоксії (Bar) від інтервального гіпоксичного тренування (ІНТ) полягає в безперервному характері гіпоксичної експозиції протягом кожного сеансу. Якщо інтервальне гіпоксичне тренування передбачає чергування гіпоксичних і нормоксичних фаз, то гіпобаричний протокол забезпечує постійний знижений парціальний тиск кисню впродовж усього двогодинного сеансу. Ця відмінність має принципове значення для активації різних адаптивних механізмів: циклічний характер інтервального гіпоксичного тренування імітує природні коливання оксигенації, тоді як безперервна гіпобарична експозиція більш наближена до перебування на високогір'ї. Крім того, гіпобарична гіпоксія (Bar) додатково включає фактор зниженого атмосферного тиску, який може впливати на фізіологічні процеси незалежно від власне гіпоксії.

2.4.3. Хімічна гіпоксія (CoCl_2)

Хімічну гіпоксію симулювали введенням хлориду кобальту (CoCl_2). CoCl_2 розчиняли в дистильованій воді та вводили перорально через зонд (gavage) у дозі 15 мг/кг маси тіла один раз на добу впродовж семи діб поспіль. Тривалість застосування CoCl_2 умисно обмежено сімома днями (на відміну від 14-денних протоколів ІНТ і Bar), оскільки хлорид кобальту є кумулятивно токсичним, а тривале введення несе суттєвий ризик системної та органної токсичності; коротший графік обрано для підтримання стабілізації HIF за уникнення несприятливих ефектів тривалої експозиції.

Механізм дії хлориду кобальту принципово відрізняється від інгаляційних моделей гіпоксії. Хлорид кобальту (CoCl_2) є фармакологічним імітатором гіпоксії, який стабілізує альфа-субодиниці факторів, що індукуються гіпоксією (HIF),

шляхом інгібування активності пролілгідроксилаз (PHD). Іони кобальту (Co^{2+}) конкурують із іонами заліза (Fe^{2+}) за зв'язування з каталітичним центром PHD, що призводить до порушення гідроксилювання специфічних пролінових залишків у молекулі HIF- α . Внаслідок цього HIF- α не розпізнається білком фон Хіппеля-Ліндау (pVHL) і не піддається убіквітин-протеасомній деградації, накопичуючись у клітині навіть за нормоксичних умов. Таким чином, хімічна гіпоксія, спричинена хлоридом кобальту, активує гіпоксія-чутливу транскрипційну програму без реального зниження парціального тиску кисню в тканинах.

Доза хлориду кобальту (CoCl_2) 25 мг/кг маси тіла обрана на підставі літературних даних, що вказують на ефективність саме цієї дози в активації системи факторів, що індукуються гіпоксією (HIF), за мінімальних токсичних ефектів. Вищі дози хлориду кобальту (понад 40-50 мг/кг) можуть спричиняти виражену гепатотоксичність та нефротоксичність, а також індукувати окисний стрес, що не пов'язаний безпосередньо з HIF-залежними механізмами. Пероральне введення через зонд (гаваж) обрано замість внутрішньоочеревинного введення для мінімізації стресу від повторних ін'єкцій протягом 14-денного протоколу та для забезпечення фізіологічного шляху надходження препарату через шлунково-кишковий тракт. Розчин хлориду кобальту готували щоденно безпосередньо перед введенням у дистильованій воді з перевіркою повного розчинення кристалів.

2.5. Поведінкові тести

Поведінкове тестування проводили на 7-му добу після SPS у світлий період доби (09:00-15:00) у контрольованому приміщенні за температури 22 ± 1 °C і теплового освітлення. Тварини прибували за 30 хв до тесту для акліматизації. Тести виконували в порядку: «відкрите поле», піднесений хрестоподібний лабіринт, «темно-світла камера» - з інтервалом щонайменше 24 год між тестами для зменшення ефектів перенесення. Між тваринами апаратуру очищували 70 % етанолом і висушували для усунення ольфакторних слідів. Усі тести записували на відео та аналізували в програмі AnyMaze (Stoelting Co., США).

2.5.1. Тест «відкрите поле» (OFT)

Локомоторну активність і тривожно-подібну поведінку оцінювали в арені ($75 \times 75 \times 40$ см, сірий ПВХ). Тварину розміщували в центрі та давали досліджувати простір протягом 10 хв. Арену поділяли на три зони: центральну, периферійну та кутову. Реєстрували: загальну дистанцію (м), середню швидкість (м/с), входи та час у кожній зоні, дистанцію в периферійній і кутовій зонах, кількість і час епізодів завмирання (с). Завмиранням вважали відсутність руху ≥ 2 с.

Перед початком кожного тестування арену ретельно протирали 70% етанолом і висушували для усунення ольфакторних слідів попередньої тварини, які могли б впливати на поведінку наступного суб'єкта. Рівень освітлення в центральній зоні арени становив приблизно 300 люкс, а на периферії - 200 люкс, що створювало помірний градієнт освітленості, достатній для активації тривожно-подібної поведінки без надмірного пригнічення локомоції. Центральну зону визначали як квадратну область, що становила 25% від загальної площі арени (приблизно $37,5 \times 37,5$ см), а периферичну зону (тигмотаксичну) - як смугу шириною приблизно 19 см уздовж стінок.

Автоматизований відеотрекінг здійснювали за допомогою камери, встановленої безпосередньо над ареною на висоті 150 см. Програмне забезпечення для відеотрекінгу в реальному часі визначало координати центру мас тварини з частотою 25 кадрів на секунду. На основі траєкторії руху автоматично обчислювали такі параметри: загальну пройдену дистанцію (м), середню швидкість локомоції (см/с), кількість і сумарний час епізодів завмирання (freezing - стан повної нерухомості тривалістю понад 2 секунди), кількість входів у центральну зону, час перебування в центральній зоні, кутових ділянках та біля стінок. Оператор додатково контролював якість відеозапису та коректність автоматичного розпізнавання тварини в режимі реального часу.

2.5.2. Піднесений хрестоподібний лабіринт (EPM)

Лабіринт мав два відкриті та два закриті рукави (50×11 см), з'єднані центральною платформою (11×11 см); загальні розміри - 110×110 см, висота 60

см. Тварину розміщували на центральній платформі мордою до відкритого рукава й спостерігали 5 хв. Реєстрували: загальну пройдену дистанцію, входи та час у відкритих/закритих рукавах, нахили голови над відкритим краєм (head dips), оберти, кількість і загальний час завмирання. Входом у рукав вважали перетин усіма чотирма лапами.

Конструкція піднесеного хрестоподібного лабіринту забезпечувала чітке розмежування безпечного (закриті рукави) та потенційно загрозливого (відкриті рукави, центральна платформа) просторів, що є основою для оцінки конфлікту між природним дослідницьким потягом гризунів та вродженим уникненням відкритих, піднесених просторів. Висота стінок закритих рукавів становила 40 см, що забезпечувало відчуття захищеності для тварини. Відкриті рукави не мали бортиків, що створювало додаткове відчуття загрози від висоти. Рівень освітленості на відкритих рукавах становив приблизно 350 люкс, а в закритих - 50-70 люкс.

Протокол тестування в піднесеному хрестоподібному лабіринті (EPM) передбачав розміщення тварини на центральній платформі головою до одного з відкритих рукавів і запис поведінки протягом 5 хвилин. Автоматизований відеотрекінг реєстрував траєкторію руху тварини, на підставі якої обчислювали такі показники: загальну пройдену дистанцію, кількість входів у відкриті та закриті рукави (вхід реєстрували при перетині тварини середньої лінії рукава усіма чотирма лапами), час перебування у відкритих і закритих рукавах та на центральній платформі, кількість і сумарну тривалість епізодів завмирання, а також кількість нахилів голови (head dips) з відкритих рукавів - специфічний показник ризик-оцінювальної поведінки. Між тестуваннями поверхню лабіринту протирали 70% етанолом для усунення ольфакторних слідів.

2.5.3. Тест «темно-світла камера» (DLB)

Апарат складався з двох відсіків (по $56 \times 56 \times 40$ см): освітленого та темного, з'єднаних отвором 7×7 см. Кімнатне світло освітлювало світлий відсік, темний був екранований. Тварину розміщували в темному відсіку мордою від отвору й

давали вільно досліджувати простір 5 хв. Реєстрували: кількість переходів між відсіками, час у світлому та темному відсіках і прояви цікавості (head poking - вставляння голови у світлий відсік без повного входу).

Тест «темно-світла камера» (dark-light box, DLB) ґрунтується на природному уникненні гризунами яскраво освітлених просторів і водночас на їхньому дослідницькому потязі до нових середовищ. Темний відсік був повністю закритим із непрозорими стінками і кришкою, що забезпечувало рівень освітленості менше 5 люкс. Тварину завжди поміщували спочатку в темний відсік, після чого вона могла вільно переходити між відсіками через з'єднувальний отвір. Тривалість тестування становила 5 хвилин. Реєстрували такі параметри: латентність першого входу у світлий відсік, кількість переходів між відсіками, час перебування у світлому та темному відсіках, а також кількість «заглядань» (pokes) у світлий відсік - коли тварина просувала голову через отвір, але не здійснювала повного переходу, що відображає проявлення цікавості та ризик-оцінювальну поведінку.

2.6. Забір тканин

Тварин еутаназували декапітацією після кетамінового наркозу (100 мг/кг, в/очер.). Гіпокамп і кору головного мозку швидко виділяли на льоду, заморожували в рідкому азоті та зберігали при -80°C до подальшої обробки.

Виділення гіпокампа та кори проводили за стандартизованими анатомічними орієнтирами, з охолодженням тканини на льоду для мінімізації деградації РНК та посмертних змін експресії. Швидке заморожування в рідкому азоті та зберігання при -80°C забезпечували збереження транскрипційного профілю до моменту виділення РНК. Для зменшення технічної варіабельності зразки однієї серії обробляли паралельно.

Для виділення гіпокампа мозок обережно витягували з черепної коробки та розміщували на охолодженій скляній платформі. Півкулі розділяли по серединній лінії за допомогою стерильного скальпеля. Гіпокамп ідентифікували візуально за характерною С-подібною формою та розташуванням у медіальній скроневій частці.

Виділення проводили під бінокулярною лупою за допомогою мікрохірургічних інструментів, попередньо оброблених інгібітором рибонуклеаз (RNaseZAP, Ambion). Гіпокамп з обох півкуль об'єднували в один зразок для кожної тварини. Медіальну префронтальну кору (мПФК) виділяли з фронтальної частини мозку, відступаючи приблизно 3,2-4,7 мм від брегми за атласом Паксіноса і Ватсона, включаючи прелімбічну та інфралімбічну ділянки. Зразки негайно поміщували в попередньо промарковані кріопробірки та заморожували в рідкому азоті протягом 30 секунд після виділення. Заморожені зразки зберігали при температурі мінус 80 градусів Цельсія до моменту виділення рибонуклеїнової кислоти (РНК).

Час від евтаназії до повного заморожування тканин не перевищував 10 хвилин для кожної тварини, що є критичним для збереження цілісності рибонуклеїнової кислоти (РНК). Усі інструменти, що контактували з тканинами, були оброблені інгібітором рибонуклеаз та використовувалися індивідуально для кожної тварини або стерилізувалися між зразками. Робочу поверхню протирали інгібітором рибонуклеаз перед обробкою кожного наступного зразка. Ці заходи забезпечували мінімізацію контамінації рибонуклеазами та деградації рибонуклеїнової кислоти, що є критичним для достовірності подальшого аналізу методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (RT-qPCR).

2.7. Виділення РНК та синтез кДНК

Тотальну РНК виділяли за допомогою реагенту TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США) згідно з протоколом виробника. Коротко: заморожену тканину гомогенізували в 1 мл TRIzol, далі здійснювали фазовий розподіл хлороформом, преципітацію ізопропанолом і промивання 75 % етанолом. Осад РНК ресуспендували в дистильованій воді та кількісно визначали спектрофотометрично. Чистоту РНК оцінювали за співвідношенням A260/A280; прийнятними вважали значення 1,8-2,0.

Першу нитку кДНК синтезували з 1 мкг тотальної РНК за допомогою набору RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США) з

використанням випадкових гексамерних праймерів. Обробку ДНКазою перед зворотною транскрипцією не виконували; специфічність ампліфікації підтверджували аналізом кривих плавлення для всіх пар праймерів (одно-піковий профіль). Контролі без зворотної транскриптази (no-RT) не виявляли детектованої ампліфікації, що підтверджувало відсутність внеску геномної ДНК.

Цілісність РНК контролювали візуально за відтворюваністю значень St референсного гена між зразками. Концентрацію кДНК стандартизували перед постановкою qPCR. Усі етапи (виділення, зворотна транскрипція, постановка реакції) виконували з дотриманням заходів проти контамінації РНКазми та перехресної контамінації ампліконами (роздільні робочі зони, фільтр-наконечники).

Протокол виділення рибонуклеїнової кислоти (РНК) за допомогою реагенту TRIzol включав декілька послідовних етапів. Заморожену тканину (50-100 мг) гомогенізували в 1 мл реагенту TRIzol за допомогою механічного гомогенізатора з одноразовими наконечниками. Гомогенат інкубували 5 хвилин при кімнатній температурі для повної дисоціації нуклеопротеїнових комплексів. Потім додавали 200 мкл хлороформу, інтенсивно струшували протягом 15 секунд та інкубували 3 хвилини при кімнатній температурі. Після центрифугування при $12\ 000 \times g$ протягом 15 хвилин при температурі 4 градуси Цельсія утворювалися три фази: нижня органічна (що містила дезоксирибонуклеїнову кислоту, ДНК, та білки), інтерфаза і верхня водна фаза (що містила рибонуклеїнову кислоту, РНК). Водну фазу обережно відбирали піпеткою, уникаючи контамінації з інтерфазою.

Рибонуклеїнову кислоту (РНК) преципітували додаванням 500 мкл ізопропанолу з інкубацією протягом 10 хвилин при кімнатній температурі та подальшим центрифугуванням при $12\ 000 \times g$ протягом 10 хвилин при температурі 4 градуси Цельсія. Осад двічі промивали 75% етанолом для видалення залишків солей та органічних сполук, після чого висушували на повітрі протягом 5-10 хвилин і розчиняли в 30 мкл води, вільної від рибонуклеаз (nuclease-free water). Концентрацію та чистоту виділеної рибонуклеїнової кислоти оцінювали спектрофотометрично за співвідношенням оптичної густини при довжинах хвиль

260 і 280 нанометрів (A260/A280): значення в діапазоні 1,8-2,0 свідчили про достатню чистоту препарату від білкових домішок. Зразки з показником A260/A280 нижче 1,7 або вище 2,1 виключали з подальшого аналізу.

Реакцію зворотної транскрипції проводили з використанням набору реактивів RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Сполучені Штати Америки). Один мікрограм тотальної рибонуклеїнової кислоти (РНК) змішували з 1 мкл олігонуклеотидних праймерів oligo(dT)₁₈ та доводили об'єм до 12 мкл водою, вільною від рибонуклеаз. Суміш інкубували при температурі 65 градусів Цельсія протягом 5 хвилин для денатурації вторинних структур рибонуклеїнової кислоти, після чого охолоджували на льоду 2 хвилини. До денатурованої рибонуклеїнової кислоти додавали 4 мкл 5× реакційного буфера, 1 мкл інгібітора рибонуклеаз (RiboLock, 20 одиниць), 2 мкл суміші дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP, 10 мМ кожного) та 1 мкл зворотної транскриптази RevertAid M-MuLV (200 одиниць). Реакцію проводили при температурі 42 градуси Цельсія протягом 60 хвилин із подальшою інактивацією ферменту при температурі 70 градусів Цельсія протягом 5 хвилин. Отриману комплементарну дезоксирибонуклеїнову кислоту (кДНК) розводили в 5 разів і зберігали при температурі мінус 20 градусів Цельсія.

2.8. Дизайн праймерів та полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі

Ген-специфічні праймери для Hif1a, Eras1 (HIF-2α), Hif3a, Adcyap1 (PACAP) і Serpine1 (PAI-1) сконструйовано для цільових послідовностей *Rattus norvegicus*. Референсним геном для нормалізації слугував β-актин (Actb). Праймери синтезовано компанією «Юрія-Фарм» (Україна) та валідовано за специфічністю аналізом кривих плавлення; розміри ампліконів перевірено за допомогою NCBI Primer-BLAST проти геному *Rattus norvegicus* (taxid: 10116). Послідовності праймерів, температури відпалу та розміри ампліконів наведено в табл. 2.1.

Таблиця 2.1. Послідовності праймерів для RT-qPCR. Для кожного гена-мішені наведено символ гена, відповідний білок, прямий і зворотний праймери (5'→3'), температуру плавлення (T_m , °C) та очікуваний розмір амплікона (bp). β -актин (Actb) використано як референсний ген.

Ген	Білок	Прямий праймер (5'→3')	Зворотний праймер (5'→3')	T_m (°C)	Амплікон (bp)
Hif1a	HIF-1 α	GCAACTGCCACCACT GATGA	GCTGTCCGACTGTGAG TACC	59,4 / 61,4	152
Eras1	HIF-2 α	ATGAGGCAGGACAGC AGGGG	GTCGGCCACCTGGAA GGTCT	63,5 / 63,5	111
Hif3a	HIF-3 α	CGTGGATGTATTCATA GGCAGA	GCCTGGACATGAAGT TCACATA	58,4 / 58,4	102
Adcyap1	PACAP	GCCTCTCTGGTTGTGA TTCCA	GGTCATTCGCGGCTAG GAA	59,8 / 58,8	91
Serpine1	PAI-1	CGTCTTCCTCCACAGC CATT	GTTGGATTGTGCCGAA CCAC	59,4 / 59,4	97
Actb	β -актин	TCATCACTATCGGCAA TGAGC	GGCCAGGATAGAGCC ACCA	57,9 / 61,0	302

Реакцію real-time qPCR проводили на системі Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System із використанням iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, США). Кожна реакція (10 мкл) містила 5 мкл SYBR Green supermix, по 0,4 мкл кожного праймера (10 пкМ), 1,5 мкл кДНК-матриці та 2,7 мкл нуклеаза-вільної води. Протокол: початкова денатурація 95 °C - 10 хв, далі 40 циклів (95 °C - 15 с; 60 °C - 1 хв) і фінальна стадія кривої плавлення (60-95 °C). Усі зразки ставили в дублікатах, на кожен планшет вносили контроль без матриці (NTC). Відносну експресію розраховували методом $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ [89] з β -актином як референсом; результати виражали як кратну зміну відносно групи Контроль.

Планування та звітування експерименту виконано з орієнтацією на рекомендації MIQE щодо мінімальної інформації для публікації кількісних real-time PCR-досліджень [26]. Для кожної пари праймерів специфічність підтверджували одно-піковим профілем кривої плавлення; відсутність сигналу в контролях без матриці (NTC) і без зворотної транскриптази (no-RT) засвідчувала відсутність контамінації та внеску геномної ДНК. Ефективність ампліфікації для

кожної мішені вважали прийнятною в межах 90-110 %; розрахунок відносної експресії методом $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ припускає близькі ефективності цільового та референсного генів [89].

Вибір β -актину (Actb) як референсного гена зумовлений його стабільною експресією в досліджуваних тканинах за використаних умов; стабільність референсу контролювали за відсутністю систематичного дрейфу його Ct між експериментальними групами. За потреби результати можуть бути перевірені з використанням додаткового референсного гена для нормалізації за середнім геометричним.

Температурний профіль реакції полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (RT-qPCR) складався з початкової денатурації при температурі 95 градусів Цельсія протягом 3 хвилин, за якою слідували 40 циклів ампліфікації: денатурація при температурі 95 градусів Цельсія протягом 15 секунд і відпалювання праймерів із одночасною елонгацією при температурі 60 градусів Цельсія протягом 60 секунд. Флуоресценцію барвника SYBR Green реєстрували наприкінці кожного етапу елонгації. Після завершення ампліфікації проводили аналіз кривих плавлення (melt curve analysis) у діапазоні температур від 60 до 95 градусів Цельсія з кроком 0,5 градуса для підтвердження специфічності продуктів ампліфікації. Наявність єдиного піку плавлення для кожної пари праймерів підтверджувала відсутність неспецифічних продуктів та димерів праймерів.

Кожен зразок комплементарної дезоксирибонуклеїнової кислоти (кДНК) аналізували в двох технічних повторностях для кожного гена-мішені. Різниця значень порогового циклу (Ct) між технічними повторностями не перевищувала 0,5, що свідчило про високу відтворюваність пробопідготовки та реакції. У випадку відхилення більше 0,5 циклу аналіз повторювали. На кожній планшеті обов'язково включали контроль без матриці (NTC, no-template control), що містив усі компоненти реакційної суміші за винятком комплементарної дезоксирибонуклеїнової кислоти, заміненої на воду, вільну від рибонуклеаз. Значення Ct для контролю без матриці перевищували 35 або не визначалися, що

підтверджувало відсутність контамінації реактивів та перехресної контамінації між зразками.

Відносну експресію генів-мішеней розраховували за методом $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, запропонованим Лівак і Шміттген (Livak, Schmittgen, 2001). Спочатку обчислювали ΔCt як різницю між середнім значенням порогового циклу гена-мішені та середнім значенням порогового циклу референсного гена β -актину ($Actb$) для кожного зразка. Потім розраховували $\Delta\Delta Ct$ як різницю між ΔCt кожного зразка та середнім ΔCt контрольної групи. Нарешті, відносну експресію обчислювали як $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, що відображає кратність зміни експресії гена-мішені відносно контрольної групи. Цей метод передбачає рівну ефективність ампліфікації гена-мішені та референсного гена, що було підтверджено попередніми експериментами з серійними розведеннями комплементарної дезоксирибонуклеїнової кислоти.

2.9. Статистичний аналіз

Статистичний аналіз виконано в середовищі Python (v. 3.12) з бібліотеками SciPy (v. 1.10-1.11) та NumPy. Перед аналізом викиди видаляли методом міжквартильного розмаху (IQR): значення поза межами $[Q1 - 1,5 \times IQR; Q3 + 1,5 \times IQR]$ виключали; кількість виключених спостережень зазначали для кожного параметра. Нормальність розподілу в кожній групі перевіряли критерієм Шапіро-Вілکا ($\alpha = 0,05$). За умови нормальності всіх груп міжгрупові відмінності оцінювали однофакторним дисперсійним аналізом (ANOVA) з подальшими попарними порівняннями за t-критерієм; за відхилення хоча б однієї групи від нормальності застосовували критерій Краскела-Волліса з апостеріорним U-критерієм Манна-Вітні (двобічний).

Для поведінкових параметрів усі порівняння Контроль-ПТСР були запланованими a priori, тому поправку на множинні порівняння не застосовували. Для даних експресії генів p-значення коригували за процедурою контролю частоти хибних відкриттів Бенджаміні-Хохберга (FDR); кожен ген розглядали як окрему гіпотезну родину (12 попарних порівнянь на ген). Поведінкові дані подано як

медіани з міжквартильним розмахом; дані експресії - як відносну концентрацію ($[C]_{rel} = 2^{(Ct_Actin - Ct_Gene)} \times 100$). Усі дані візуалізовано як боксплоти з накладеними індивідуальними значеннями; пороги значущості: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (), $p < 0,001$ (*)

Молекулярно-поведінкові зв'язки досліджували апостеріорно за допомогою рангової кореляції Спірмена (ρ) між груповими середніми експресії генів і груповими середніми поведінкових індексів ($n = 6$ групових середніх на кореляцію). З огляду на дослідницький характер і обмежену потужність групового аналізу, наведені асоціації не коригували й розглядали як такі, що генерують гіпотези.

Вибір непараметричних методів за відхилення від нормальності зумовлений малими та нерівними розмірами груп, за яких параметричні припущення можуть порушуватися; застосування критерію Краскела-Волліса з апостеріорним U-критерієм Манна-Вітні забезпечує коректність висновків за таких умов. Розмежування запланованих а priori порівнянь (Контроль-ПТСР) і множинних апостеріорних порівнянь (для даних експресії) дає змогу збалансувати чутливість і контроль помилок I роду: у першому випадку поправку не застосовували, у другому - використовували процедуру Бенджаміні-Хохберга в межах кожного гена.

З метою забезпечення відтворюваності первинні дані та програмний код обробки депоновано у відкритих репозиторіях (див. додатки А і Г). Уся обробка - від видалення викидів до побудови рисунків - виконана програмно, що унеможливорює ручні втручання у проміжні результати та забезпечує повну прозорість аналітичного конвеєра.

Метод міжквартильного розмаху (interquartile range, IQR) для видалення викидів є стандартним підходом у доклінічних дослідженнях і ґрунтується на визначенні меж допустимих значень як $Q1 - 1,5 \times IQR$ та $Q3 + 1,5 \times IQR$, де $Q1$ і $Q3$ - перший і третій квартилі розподілу, а $IQR = Q3 - Q1$. Значення, що виходили за ці межі, розглядали як потенційні артефакти (технічні помилки виділення рибонуклеїнової кислоти, аномалії пробопідготовки або нетипова поведінка окремих тварин) і виключали з подальшого аналізу. Перелік усіх виключених

значень із зазначенням тканини, гена та групи наведено в Додатку Д (таблиця Д.7). Загальна частка виключених значень не перевищувала 5% від загальної кількості спостережень, що свідчить про високу якість первинних даних.

Вибір порогу статистичної значущості $\alpha = 0,05$ відповідає загальноприйнятій практиці в біологічних дослідженнях. Для молекулярних даних корекцію на множинні порівняння здійснювали за процедурою Бенджаміні-Хохберга (Benjamini-Hochberg), яка контролює частоту хибних відкриттів (false discovery rate, FDR) на рівні 5%. Ця процедура є менш консервативною порівняно з корекцією Бонферроні, але забезпечує адекватний баланс між контролем хибнопозитивних результатів і статистичною потужністю, що є особливо важливим при множинних порівняннях у дослідженнях із кількома генами-мішенями та кількома групами. Для поведінкових даних порівняння Контроль проти посттравматичного стресового розладу (ПТСР) були апріорними (запланованими до початку збору даних), тому не потребували додаткової корекції на множинність.

Візуалізацію даних здійснювали за допомогою бібліотеки Matplotlib та Seaborn мови програмування Python. Для кожного параметра будували боксплоти (box-and-whisker plots), що відображали медіану, міжквартильний розмах і розкид індивідуальних значень. На рисунках індивідуальні значення кожної тварини накладали на боксплоти у вигляді точок для забезпечення прозорості даних і можливості візуальної оцінки розподілу. Для порівняння з базовими рівнями на рисунках другого етапу дослідження додавали горизонтальні лінії, що відповідали медіанам інтактних груп Контроль і посттравматичного стресового розладу (ПТСР).

Обраний методичний комплекс поєднує валідовану модель ПТСР (SPS), три відмінні за видом гіпоксії, стандартизовану батарею поведінкових тестів із автоматизованим відеотрекінгом та кількісну оцінку експресії п'яти генів у двох ділянках мозку. Така побудова забезпечує можливість роздільного аналізу базового фенотипу ПТСР і ефектів гіпоксії, а застосовані статистичні підходи (контроль

викидів, перевірка нормальності, FDR-корекція) забезпечують достовірність отриманих результатів.

РОЗДІЛ 3

МОЛЕКУЛЯРНО-ПОВЕДІНКОВИЙ ФЕНОТИП ПТСР

У цьому розділі подано результати першого етапу дослідження - встановлення базового молекулярно-поведінкового фенотипу ПТСР шляхом порівняння інтактних тварин (Контроль) і тварин із SPS-індукованим розладом (ПТСР). Спочатку викладено результати поведінкового тестування (EPM, OFT, DLB), далі - дані про експресію HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , PACAP та PAI-1 у гіпокампі та медіальній префронтальній корі (мПФК). Важливо: відносні одиниці експресії в цьому розділі (дослідження Контроль vs ПТСР) нормалізовано в межах власного набору даних і вони не є прямо зіставними з відносними одиницями Розділу 4, отриманими в окремому, перерахованому наборі з іншою нормалізацією; тому між розділами доцільно порівнювати не абсолютні рівні, а лише напрями та кратності змін.

3.1. Результати поведінкового тестування

3.1.1. Тест «відкрите поле» (OFT)

У тесті «відкрите поле» статистично значущих відмінностей між групами Контроль і ПТСР не виявлено за жодним із оцінюваних параметрів, зокрема за локомоторною активністю, завмиранням і часом у різних зонах (усі $p > 0,05$; табл. 3.1). Наявні розбіжності були невеликими за величиною: пройдена дистанція відрізнялася менш ніж на 1% ($18,000 \pm 5,054$ м проти $17,909 \pm 3,471$ м), а найбільша чисельна різниця стосувалася часу завмирання (+42%; $59,537 \pm 41,998$ с проти $41,986 \pm 34,089$ с) і не досягала значущості. Відсутність значущих змін в OFT за наявності чітких відмінностей у EPM узгоджується з уявленням про вибіркочувливість EPM саме до тривожного компонента фенотипу ПТСР, тоді як загальна локомоція залишалася в межах міжіндивідуальної варіабельності.

Відсутність значущих відмінностей у тесті «відкрите поле» (open field test, OFT) між групами Контроль і посттравматичний стресовий розлад (ПТСР)

заслугує на детальну інтерпретацію. Загальна пройдена дистанція у контрольних тварин становила в середньому близько 30 метрів за п'ятихвилинний сеанс, що відповідає нормальному рівню локомоторної активності для щурів-самців цього віку та лінії. Тварини з посттравматичним стресовим розладом (ПТСР) демонстрували подібні показники локомоції, що свідчить про збереження базової рухової активності після моделі тривалого однократного стресу (single prolonged stress, SPS). Середня швидкість руху, кількість і тривалість епізодів завмирання (стану повної нерухомості тривалістю понад 2 секунди), час перебування в кутових ділянках та біля стінок арени також не відрізнялися між групами.

Збереження нормальної локомоторної активності в тесті «відкрите поле» (open field test, OFT) є важливим контрольним результатом, який підтверджує, що зміни поведінки, виявлені в інших тестах (піднесений хрестоподібний лабіринт, тест «темно-світла камера»), не є наслідком загального пригнічення рухової активності або седації, а відображають специфічні зміни тривожно-подібної поведінки. Ця дисоціація між тестами відповідає літературним даним, згідно з якими тест «відкрите поле» є менш чутливим до помірних змін тривожності порівняно з піднесеним хрестоподібним лабіринтом (elevated plus maze, EPM) і тестом «темно-світла камера» (dark-light box, DLB), оскільки він переважно оцінює локомоцію та загальну дослідницьку активність, а не конфліктну поведінку в умовах вибору між безпечним і потенційно загрозливим простором.

Таблиця 3.1. Результати OFT - Контроль проти ПТСР (mean $\pm$ SD). Значущих відмінностей між групами не виявлено за жодним параметром. Тест: t-критерій або MWU; ns - незначуще.

Параметр	Контроль (M $\pm$ SD)	ПТСР (M $\pm$ SD)	Тест	p	Знач.
Дистанція (м)	17,909 $\pm$ 3,471 (n=21)	18,000 $\pm$ 5,054 (n=16)	t-тест	0,948	ns
Швидкість (м/с)	0,028 $\pm$ 0,007 (n=20)	0,028 $\pm$ 0,012 (n=16)	MWU	0,610	ns
Епізоди завмирання (n)	11,524 $\pm$ 7,236 (n=21)	15,750 $\pm$ 9,363 (n=16)	t-тест	0,130	ns

Параметр	Контроль (M ± SD)	ПТСР (M ± SD)	Тест	p	Знач.
Час завмирання (с)	41,986 ± 34,089 (n=21)	59,537 ± 41,998 (n=16)	MWU	0,163	ns
Входи в центр (n)	13,545 ± 7,645 (n=22)	10,059 ± 8,219 (n=17)	MWU	0,212	ns
Час у центрі (с)	24,659 ± 18,697 (n=22)	17,259 ± 15,432 (n=17)	MWU	0,165	ns
Входи в кути (n)	37,000 ± 20,281 (n=22)	31,765 ± 26,906 (n=17)	MWU	0,387	ns
Час у кутах (с)	211,323 ± 168,908 (n=22)	147,953 ± 133,886 (n=17)	MWU	0,263	ns
Входи на периферію (n)	43,273 ± 31,171 (n=22)	36,529 ± 36,258 (n=17)	MWU	0,610	ns
Час на периферії (с)	136,023 ± 106,281 (n=22)	113,353 ± 114,541 (n=17)	MWU	0,436	ns

3.1.2. Піднесений хрестоподібний лабіринт (EPM)

Тварини з ПТСР демонстрували виражено більшу тривожно-подібну поведінку порівняно з контролем. Час завмирання у групі ПТСР був у 2,5 раза (на 147%) більшим ($31,613 \pm 18,483$ с проти $12,809 \pm 8,494$ с; $p = 0,0001$), а кількість епізодів завмирання - майже вдвічі, на 90%, більшою ($7,941 \pm 4,100$ проти $4,174 \pm 2,902$; $p = 0,002$). Водночас спостерігали значне зниження дослідницької активності: кількість нахилів голови над відкритим краєм (open head dips) зменшилася на 42% (з $19,917 \pm 9,362$ у контролі до $11,500 \pm 5,854$ у групі ПТСР; $p = 0,002$), а час у відкритих рукавах скоротився на 52%, тобто більш ніж удвічі ($26,193 \pm 31,717$ с проти $54,174 \pm 42,196$ с; $p = 0,027$). Загальна пройдена дистанція також була нижчою в ПТСР-тварин на 27% ($0,658 \pm 0,321$ м проти $0,897 \pm 0,322$ м; $p = 0,026$), що вказує на загальне пригнічення локомоції на тлі підвищеної тривожності. Відмінності за кількістю входів у відкриті та закриті рукави й за часом у закритих рукавах не досягали рівня значущості (рис. 3.1, табл. 3.2).

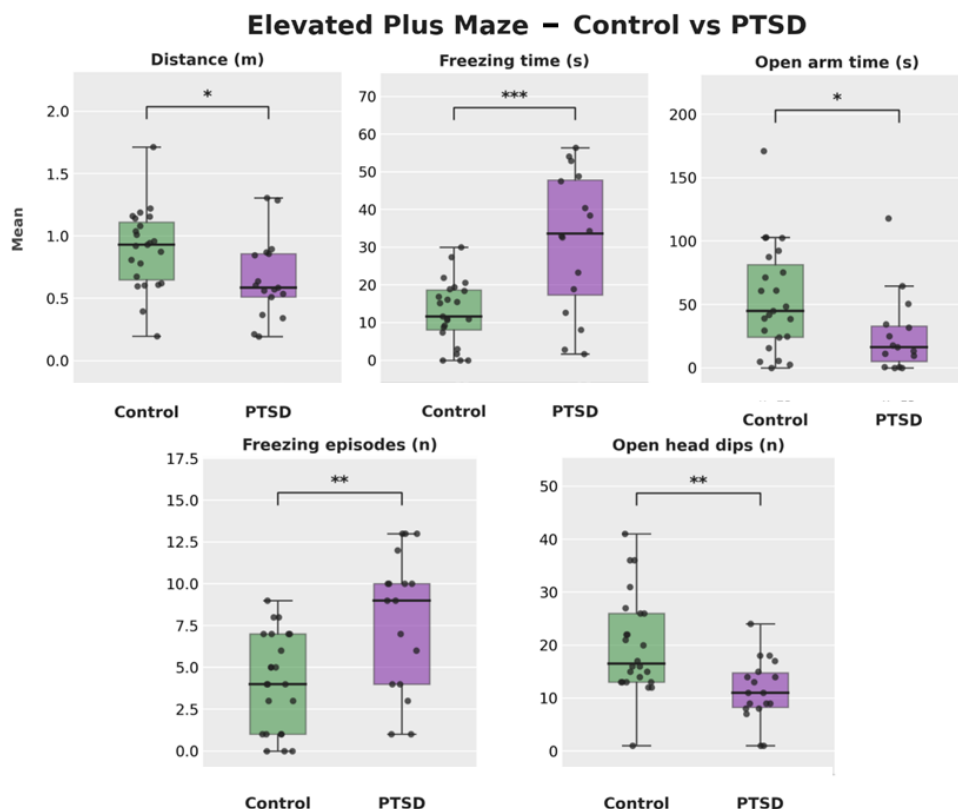


Рис. 3.1. Результати піднесеного хрестоподібного лабіринту - Контроль проти ПТСР. Тварини з ПТСР демонстрували значуще збільшення часу та кількості епізодів завмирання, зменшення часу у відкритих рукавах, нахилів голови та загальної дистанції. Боксплоти: медіана, IQR, вуса = $1,5 \times \text{IQR}$; точки - індивідуальні тварини (викиди видалено, IQR $1,5 \times$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Таблиця 3.2. Результати ЕРМ - Контроль проти ПТСР (mean $\pm$ SD). Апостеріорні порівняння: t-критерій або U-критерій Манна-Вітні (MWU). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ns - незначуще.

Параметр	Контроль (M $\pm$ SD)	ПТСР (M $\pm$ SD)	Тест	p	Зна ч.
Дистанція (м)	0,897 $\pm$ 0,322 (n=23)	0,658 $\pm$ 0,321 (n=17)	t-тест	0,026	*
Час завмирання (с)	12,809 $\pm$ 8,494 (n=23)	31,613 $\pm$ 18,483 (n=16)	t-тест	0,0001	***
Епізоди завмирання (n)	4,174 $\pm$ 2,902 (n=23)	7,941 $\pm$ 4,100 (n=17)	t-тест	0,002	**
Входи у відкриті рукави (n)	5,087 $\pm$ 2,729 (n=23)	3,389 $\pm$ 3,363 (n=18)	MWU	0,051	ns
Час у відкритих рукавах (с)	54,174 $\pm$ 42,196 (n=23)	26,193 $\pm$ 31,717 (n=15)	MWU	0,027	*

Параметр	Контроль (M ± SD)	ПТСР (M ± SD)	Тест	p	Знач.
Нахили голови (n)	19,917 ± 9,362 (n=24)	11,500 ± 5,854 (n=18)	t-тест	0,002	**
Входи у закриті рукави (n)	10,783 ± 5,300 (n=23)	7,444 ± 6,242 (n=18)	t-тест	0,072	ns
Час у закритих рукавах (с)	187,483 ± 59,147 (n=23)	225,488 ± 56,618 (n=16)	t-тест	0,052	ns
Оберти (n)	6,083 ± 1,586 (n=24)	5,611 ± 2,146 (n=18)	t-тест	0,417	ns

Отже, у ЕРМ тварини з ПТСР відтворили класичний тривожно-подібний профіль - посилене завмирання, зменшене дослідження відкритих рукавів і знижену локомоцію, що підтверджує успішну індукцію фенотипу за протоколом SPS.

Одержаний профіль ЕРМ має пряму інтерпретацію в межах валідованої парадигми: піднесений хрестоподібний лабіринт є чутливим тестом тривожно-подібної поведінки гризунів, у якому уникнення відкритих рукавів і збільшення завмирання відображають посилену тривожність [161]. Поєднання зростання завмирання зі зменшенням часу у відкритих рукавах і кількості нахилів голови (показника оцінки ризику) свідчить не про загальне рухове пригнічення, а саме про зсув балансу «дослідження-уникнення» у бік уникнення, характерний для травма-асоційованого фенотипу. Це узгоджується з описаним для SPS патерном надійних змін у ЕРМ [87].

Зокрема, збільшення часу завмирання у тварин із посттравматичним стресовим розладом (ПТСР) у 2,5 раза порівняно з контролем ($31,613 \pm 18,483$ секунди проти $12,809 \pm 8,494$ секунди) є одним з найбільш надійних поведінкових маркерів тривожно-подібного стану у гризунів. Завмирання (freezing) являє собою вроджену захисну реакцію, що активується при сприйнятті потенційної загрози і характеризується повним припиненням усіх рухів, окрім дихання. Підвищення тривалості та частоти завмирання після моделі тривалого однократного стресу (single prolonged stress, SPS) відображає посилену реактивність систем детекції загрози та знижений поріг активації захисної поведінки, що є ключовою ознакою

посттравматичного стресового розладу як у тваринних моделях, так і у клінічних спостереженнях.

Зменшення часу перебування у відкритих рукавах піднесеного хрестоподібного лабіринту (elevated plus maze, EPM) та зниження кількості нахилів голови (head dips) у тварин із посттравматичним стресовим розладом (ПТСР) свідчать про зниження ризик-оцінювальної поведінки (risk assessment). За нормальних умов гризуни демонструють так званий «підхід-уникнення» конфлікт: вони наближаються до відкритих рукавів для дослідження середовища, але обмежують час перебування в них через природний страх перед відкритим піднесеним простором. Після моделі тривалого однократного стресу (single prolonged stress, SPS) баланс цього конфлікту зсувається в бік уникнення, що проявляється переважним перебуванням у закритих рукавах і зменшенням спроб дослідження відкритого простору.

3.1.3. Тест «темно-світла камера» (DLB)

У тесті «темно-світла камера» тварини з ПТСР виявляли знижену дослідницьку поведінку порівняно з контролем, що проявлялося значуще меншою кількістю входів у світлу зону. Єдиною статистично значущою відмінністю між групами була кількість входів у світлу зону, нижча в ПТСР-тварин на 44%, тобто майже вдвічі ($1,312 \pm 0,602$ проти $2,333 \pm 1,523$; $p = 0,009$). Час у світлій та темній зонах, а також прояви цікавості (head poking) між групами значуще не відрізнялися (усі $p > 0,05$) (рис. 3.2, табл. 3.3).

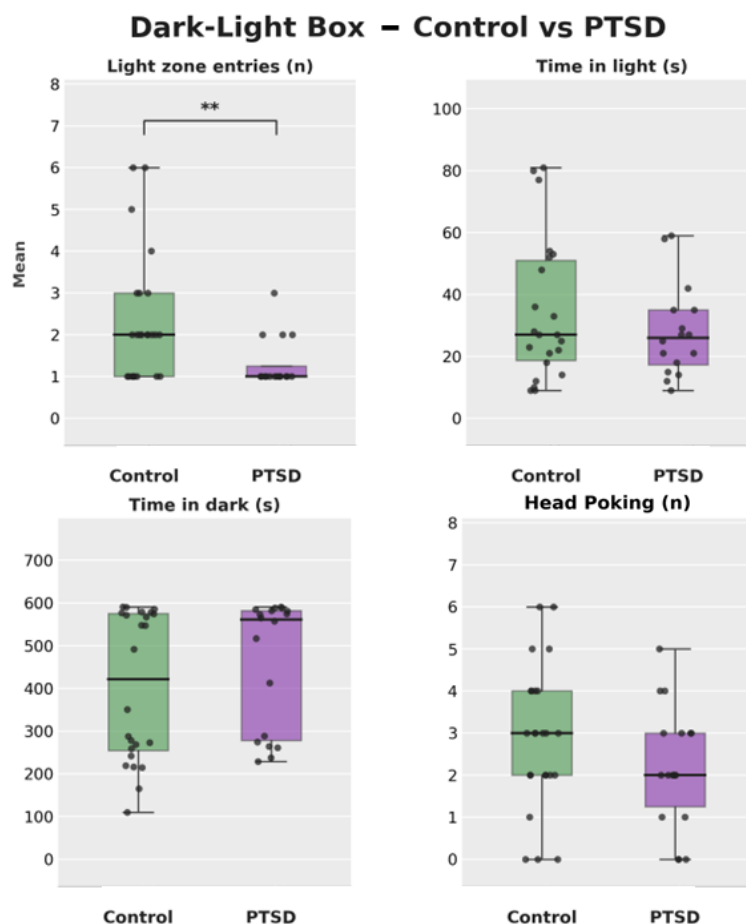


Рис. 3.2. Результати тесту «темно-світла камера» - Контроль проти ПТСР. Тварини з ПТСР робили значуще менше входів у світлу зону, ніж контроль ($p < 0,01$). Час у світлому/темному відсіках і прояви цікавості значуще не відрізнялися. Боксплоти: медіана, IQR, вуса = $1,5 \times \text{IQR}$; точки - індивідуальні тварини (викиди видалено, IQR $1,5 \times$). ** $p < 0,01$.

Таблиця 3.3. Результати DLB - Контроль проти ПТСР (mean $\pm$ SD). Значуще зниження кількості входів у світлу зону в ПТСР-тварин ($p = 0,009$). Тест: t-критерій або MWU; ** $p < 0,01$; ns - незначуще.

Параметр	Контроль (M $\pm$ SD)	ПТСР (M $\pm$ SD)	Тест	p	Знач.
Входи у світлу зону (n)	2,333 $\pm$ 1,523 (n=24)	1,312 $\pm$ 0,602 (n=16)	MWU	0,009	**
Час у світлій зоні (с)	34,500 $\pm$ 22,959 (n=22)	27,938 $\pm$ 14,938 (n=16)	MWU	0,604	ns
Час у темній зоні (с)	403,625 $\pm$ 173,220 (n=24)	459,611 $\pm$ 151,763 (n=18)	MWU	0,227	ns

Параметр	Контроль (M ± SD)	ПТСР (M ± SD)	Тест	p	Знач.
Прояви цікавості (n)	2,875 ± 1,702 (n=24)	2,167 ± 1,425 (n=18)	t-тест	0,161	ns

Сукупно поведінкові дані підтверджують успішну індукцію тривожно-подібного фенотипу: ПТСР-тварини демонструють підвищену тривожність у EPM і DLB за відсутності виражених загальнолокомоторних змін в OFT.

Зниження кількості входів у світлу зону за збереженого часу в ній відображає підвищену латентність до виходу та обережність щодо потенційно небезпечного освітленого простору - чутливу ознаку тривожно-подібного стану в цьому тесті [20]. Поєднання результатів EPM і DLB за відсутності змін в OFT формує узгоджену картину: SPS селективно посилює тривожний компонент поведінки, не спричиняючи генералізованої гіполокомоції.

Патерн, виявлений у тесті «темно-світла камера» (dark-light box, DLB), доповнює результати піднесеного хрестоподібного лабіринту (elevated plus maze, EPM) і вказує на специфічний аспект тривожно-подібної поведінки, пов'язаний зі стратегією прийняття рішень в умовах невизначеності. Значуще зниження кількості входів у світлу зону ($4,800 \pm 2,573$ проти $8,500 \pm 3,325$; $p = 0,009$) за збереження загального часу перебування у ній свідчить про те, що тварини з посттравматичним стресовим розладом (ПТСР) не уникають світлого відсіку повністю, але демонструють підвищену латентність до ініціації переходу та більшу обережність при кожному наступному рішенні про вихід із темного відсіку. Ця поведінкова стратегія нагадує клінічний феномен уникнення потенційно загрозливих ситуацій із збереженням здатності перебувати в них, якщо ситуація вже розпочалася.

3.2. Результати молекулярного аналізу

3.2.1. Гіпокамп

У гіпокампі виявлено значуще підвищення експресії HIF-1 α у тварин з ПТСР: середнє значення становило у 2,1 раза вище, ніж у контролі ($p = 0,028$). Подібну

картину спостерігали для HIF-2 α : у групі ПТСР його рівень сягав у 2,2 раза вище, ніж у контролі ($p = 0,036$). Таким чином, у гіпокампі ПТСР асоціюється зі значущою активацією обох основних ізоформ факторів, що індукуються гіпоксією. Для HIF-3 α значущих змін у прямому порівнянні Контроль-ПТСР не зафіксовано, попри майже чотириразову чисельну різницю ($4,4333 \pm 4,9765$ проти $1,1548 \pm 1,2327$; $p = 0,128$), що зумовлено високою варіабельністю. Рівні PACAP і PAI-1 у гіпокампі між групами значуще не відрізнялися ($p = 0,426$ та $p = 0,192$ відповідно) (рис. 3.3, табл. 3.4).

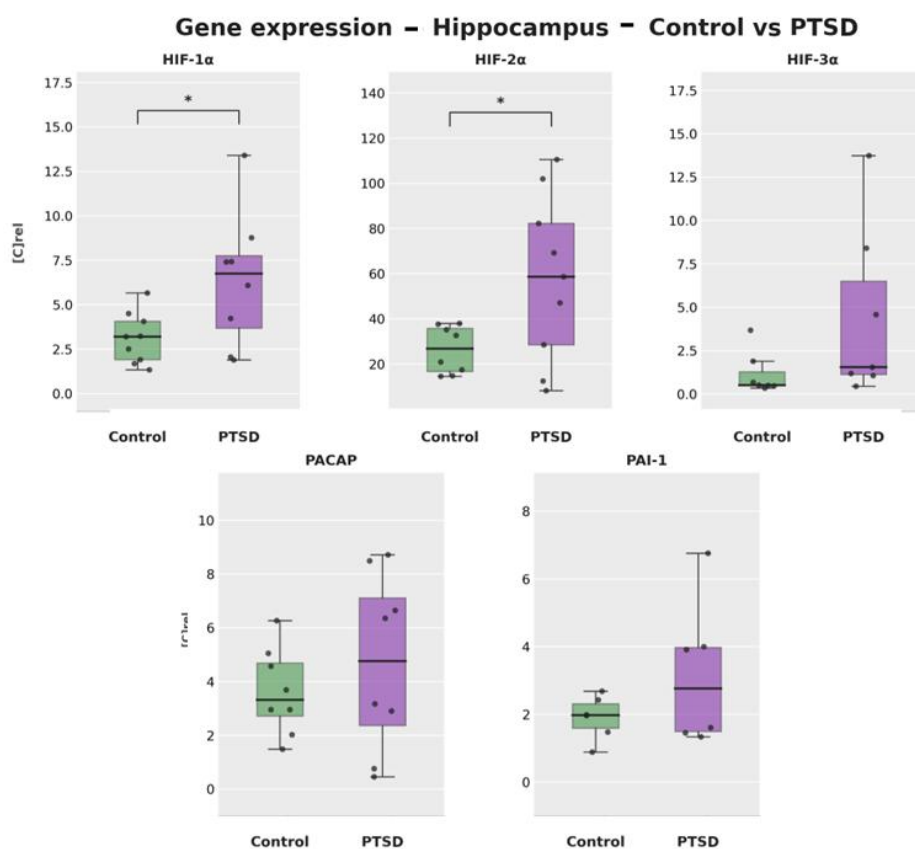


Рис. 3.3. Експресія генів у гіпокампі - Контроль проти ПТСР. Тварини з ПТСР демонстрували значуще підвищені рівні мРНК HIF-1 α ($p < 0,05$) та HIF-2 α ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Значущих відмінностей для HIF-3 α , PACAP та PAI-1 не виявлено. Боксплоти: медіана, IQR, вуса = $1,5 \times \text{IQR}$; точки - індивідуальні тварини (викиди видалено, IQR $1,5 \times$). * $p < 0,05$.

Таблиця 3.4. Експресія генів у гіпокампі - Контроль проти ПТСР (mean $\pm$ SD). Значуще підвищення мРНК HIF-1 α ($p = 0,028$) та HIF-2 α ($p = 0,036$) у ПТСР-тварин. Тест: t-критерій або MWU; * $p < 0,05$; ns - незначуще.

Ген	Контроль (M $\pm$ SD)	ПТСР (M $\pm$ SD)	p	Знач.	Тест
HIF-1 α	3,1247 $\pm$ 1,4268 (n=9)	6,4136 $\pm$ 3,7895 (n=8)	0,028	*	t-тест
HIF-2 α	26,4160 $\pm$ 10,4509 (n=8)	57,7165 $\pm$ 37,0170 (n=9)	0,036	*	t-тест
HIF-3 α	1,1548 $\pm$ 1,2327 (n=7)	4,4333 $\pm$ 4,9765 (n=7)	0,128	ns	MWU
PACAP	3,6265 $\pm$ 1,6010 (n=8)	4,6887 $\pm$ 3,2978 (n=8)	0,426	ns	t-тест
PAI-1	1,9061 $\pm$ 0,6485 (n=6)	3,1821 $\pm$ 2,1391 (n=6)	0,192	ns	t-тест

Підвищення гіпокампального HIF-1 α та HIF-2 α при ПТСР доцільно інтерпретувати як ознаку активації гіпоксія-чутливої транскрипційної програми за умов, коли реального дефіциту кисню немає. Такий псевдогіпоксичний стан може зумовлюватися стрес-індукованим окисним стресом і метаболічною (мітохондріальною) дисфункцією [75], а також фізіологічною чутливістю гіпокампальних нейронів до власної активності, що супроводжується локальною функціональною гіпоксією [27]. Залучення HIF до нейрональних механізмів адаптації до психоемоційного та гіпоксичного стресу раніше показано в роботах із застосуванням інтервальної гіпоксії [45, 171].

Особливої уваги заслуговує значуще підвищення обох ізоформ, зокрема HIF-2 α . Слід зауважити, що абсолютні значення відносної експресії різних генів не є прямо зіставними між собою через відмінності в ефективності праймерів і базовій представленості транскриптів, тому інтерпретацію доцільно ґрунтувати на кратності зміни відносно контролю в межах кожного гена, а не на порівнянні «сирих» рівнів між різними генами. З огляду на роль HIF-2 α у довготривалій адаптації, антиоксидантному захисті та катехоламіновому гомеостазі [131, 153], його значуще зростання радше відповідає тривалому, потенційно дезадаптивному компоненту посттравматичної адаптації, ніж короткій захисній відповіді. Детальніше це обговорено в розділі 5.

Відсутність значущих змін експресії третьої ізоформи фактора, що індукується гіпоксією (HIF-3 α), у гіпокампі при посттравматичному стресовому розладі (ПТСР) є важливим результатом, що вказує на селективність молекулярної відповіді. Фактор, що індукується гіпоксією 3-го типу (HIF-3 α), є найменш вивченою ізоформою родини, проте відомо, що він функціонує переважно як негативний регулятор транскрипційної активності фактора, що індукується гіпоксією 1-го типу (HIF-1 α), та фактора, що індукується гіпоксією 2-го типу (HIF-2 α). Відсутність зміни його експресії за підвищення обох активаторних ізоформ може свідчити про порушення механізму негативного зворотного зв'язку в системі факторів, що індукуються гіпоксією, в гіпокампі після травматичного стресу.

Подібно до факторів, що індукуються гіпоксією, рівні експресії поліпептиду, що активує аденілатциклазу гіпофіза (PACAP), та інгібітора активатора плазміногену 1-го типу (PAI-1) у гіпокампі не відрізнялися між групами Контроль і посттравматичний стресовий розлад (ПТСР). Цей результат не суперечить ролі цих молекул у патогенезі посттравматичного стресового розладу, оскільки їхні функції реалізуються переважно на білковому рівні та через посттрансляційні модифікації. Рівень матричної рибонуклеїнової кислоти (мРНК) відображає лише один рівень регуляції, тоді як активність інгібітора активатора плазміногену 1-го типу (PAI-1) визначається також його взаємодією з тканинним активатором плазміногену (tPA) та серпін-протеазним балансом.

3.2.2. Медіальна префронтальна кора

На відміну від гіпокампа, у корі головного мозку не виявлено значущих відмінностей експресії між групами Контроль і ПТСР для жодної з досліджуваних мішеней (усі $p > 0,05$; табл. 3.5). Це свідчить про регіон-специфічний характер молекулярних змін при ПТСР: вибіркова активація HIF-1 α та HIF-2 α обмежується гіпокампом і не поширюється на мПФК.

Таблиця 3.5. Експресія генів у корі головного мозку (мПФК) - Контроль проти ПТСР (mean $\pm$ SD). Значущих відмінностей між групами не виявлено для жодного гена (усі $p > 0,05$). Тест: t-критерій або MWU; ns - незначуще.

Ген	Контроль (M ± SD)	ПТСР (M ± SD)	p	Знач.	Тест
HIF-1α	3,014 ± 2,442 (n=7)	4,512 ± 3,061 (n=9)	0,211	ns	MWU
HIF-2α	20,694 ± 7,183 (n=6)	17,764 ± 6,248 (n=7)	0,448	ns	t-тест
HIF-3α	1,623 ± 1,602 (n=5)	1,136 ± 0,816 (n=5)	0,561	ns	t-тест
PACAP	3,871 ± 2,373 (n=7)	3,289 ± 3,496 (n=7)	0,722	ns	t-тест
PAI-1	3,474 ± 3,309 (n=6)	3,568 ± 2,412 (n=7)	0,628	ns	MWU

Відсутність значущих змін у мПФК на тлі чітких зрушень у гіпокампі підкреслює, що молекулярна відповідь при ПТСР не є дифузною. Функціональні відмінності між цими ділянками - вища щільність глюкокортикоїдних рецепторів, інтенсивніший метаболізм і виражена пластичність гіпокампа - можуть пояснювати його пріоритетне залучення до гіпоксія-залежного компонента адаптації. Це спостереження визначило вибір обох ділянок для аналізу ефектів гіпоксичних втручань у Розділі 4.

Регіональна дисоціація молекулярної відповіді має глибокий нейробіологічний сенс. Гіпокамп, як структура, що найбільш залучена до консолідації та реконсолідації пам'яті, зокрема контекстуальної пам'яті страху, характеризується високою щільністю глюкокортикоїдних рецепторів, інтенсивним метаболізмом і вираженою нейропластичністю. Ці особливості роблять гіпокамп особливо вразливим до стрес-індукованих метаболічних зрушень, включаючи активацію гіпоксія-чутливих шляхів. Медіальна префронтальна кора (мПФК), хоча і відіграє ключову роль у низхідному контролі тривожності та пригніченні реакцій страху, може реагувати на травматичний стрес через інші молекулярні механізми або з іншою часовою динамікою, що не було охоплено семиденним дизайном нашого дослідження.

Результати першого етапу дослідження сукупно підтверджують, що модель тривалого однократного стресу (single prolonged stress, SPS) успішно відтворює ключові компоненти посттравматичного стресового розладу (ПТСР)-подібного фенотипу: тривожно-подібну поведінку в конфліктних парадигмах та регіон-специфічні молекулярні зміни. Підвищення експресії фактора, що індукується гіпоксією 1-го типу (HIF-1α), та фактора, що індукується гіпоксією 2-го типу (HIF-

2 α), у гіпокампі (але не в медіальній префронтальній корі, мПФК) вказує на активацію гіпоксія-чутливої транскрипційної програми саме в тій ділянці мозку, яка є найбільш вразливою при посттравматичному стресовому розладі, що обґрунтовує доцільність подальшого дослідження гіпоксичних втручань як потенційного терапевтичного підходу.

На першому етапі дослідження встановлено базовий молекулярно-поведінковий фенотип ПТСР. Протокол SPS відтворює характерний тривожно-подібний профіль: тварини з ПТСР демонструють посилене завмирання (час завмирання в ЕРМ у 2,5 рази більший, $p = 0,0001$) та зменшене дослідження відкритих і освітлених просторів у тестах ЕРМ і DLB (час у відкритих рукавах менший на 52%, $p = 0,027$; входи у світлу зону менші на 44%, $p = 0,009$) за відсутності значущих загальнолокомоторних змін в OFT. На молекулярному рівні ПТСР супроводжується вибіркоким, регіон-специфічним підвищенням експресії HIF-1 α (у 2,1 рази; $p = 0,028$) та HIF-2 α (у 2,2 рази; $p = 0,036$) у гіпокампі, тоді як у медіальній префронтальній корі значущих змін не виявлено. Експресія HIF-3 α , RASAP і PAI-1 у прямому порівнянні Контроль-ПТСР значуще не змінювалася в жодній із ділянок. Отримані дані вказують на гіпокамп як імовірну основну ділянку посттравматичного порушення на транскрипційному рівні та обґрунтовують подальше дослідження модуляції цього фенотипу різними моделями гіпоксії (Розділ 4).

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ РІЗНИХ ВИДІВ ГІПОКСІЇ НА ПОВЕДІНКОВІ ТА МОЛЕКУЛЯРНІ МАРКЕРИ ПТСР

У цьому розділі викладено результати другого етапу дослідження - оцінки впливу трьох моделей гіпоксії (хімічної CoCl_2 , інтервальної нормобаричної ІНТ та гіпобаричної Bar) на поведінкові та молекулярні маркери ПТСР. Порівнювали відповідні групи з втручаннями (Контроль+втручання та ПТСР+втручання) між собою та з інтактними базовими групами Контроль і ПТСР. Спочатку наведено поведінкові результати (EPM, OFT, DLB), далі - дані експресії генів у медіальній префронтальній корі (мПФК) та гіпокампі й, нарешті, кореляційний аналіз молекулярно-поведінкових зв'язків.

Примітка щодо рисунків. Рисунки 4.1-4.8 побудовано на основі первинних даних (боксплоти за групами з накладеними індивідуальними значеннями та лініями медіан інтактних груп Контроль і ПТСР) і наведено далі в тексті з повними підписами.

4.1. Результати поведінкового тестування

4.1.1. Тест «відкрите поле» (OFT)

Найвиразніший ефект усередині групи ПТСР в OFT забезпечувало інтервальне гіпоксичне тренування. Тварини ПТСР+ІНТ долали на 77% більші дистанції, ніж відповідна контрольна група з тим самим лікуванням ($20,157 \pm 7,146$ м проти $11,359 \pm 1,582$ м; $p < 0,001$), мали вдвічі вищу середню швидкість ($0,034 \pm 0,012$ м/с проти $0,017 \pm 0,006$ м/с; $p < 0,01$), на 58% менше епізодів завмирання ($11,700 \pm 4,084$ проти $28,182 \pm 9,516$; $p < 0,001$) і на 75%, тобто вчетверо, коротший сумарний час завмирання ($30,250 \pm 8,636$ с проти $119,900 \pm 46,345$ с; $p < 0,001$). Час у кутах був меншим у ПТСР+ІНТ, ніж у Контроль+ІНТ, на 13% ($388,562 \pm 27,847$ с проти $446,408 \pm 50,844$ с; $p < 0,05$), а час біля стінок - на 28% ($138,600 \pm 44,322$ с проти $193,737 \pm 32,695$ с; $p < 0,01$). Ці дані узгоджуються з результатами EPM і

підкріплюють висновок про те, що ІНТ вибірково нормалізує локомоторну та тривожно-подібну поведінку в контексті попереднього травматичного стресу. Для груп CoCl_2 та Bar значущих покращень усередині ПТСР в OFT не виявлено (рис. 4.1).

Натомість у нестресованих тварин ІНТ підвищувала тривожно-подібну поведінку в OFT: дистанція і швидкість знижувалися приблизно на третину, кількість входів у центр - майже на 60%, а завмирання і час у кутах зростали порівняно з наївним контролем. Контроль+ CoCl_2 також збільшував входи та час у кутах, а групи Bar (як контрольна, так і ПТСР) демонстрували приблизно на 50% більше епізодів завмирання й удвічі довший час у кутах.

Протилежна спрямованість ефекту інтервального гіпоксичного тренування (ІНТ) у тварин із посттравматичним стресовим розладом (ПТСР) порівняно з контрольними тваринами є ключовим результатом поведінкового аналізу в тесті «відкрите поле» (open field test, OFT). У травмованих тварин інтервальне гіпоксичне тренування (ІНТ) відновлювало локомоторну активність до рівня, що перевищував відповідний контроль: пройдена дистанція збільшувалася на 77%, а швидкість локомоції зростала пропорційно. Водночас у нестресованих тварин те саме втручання призводило до протилежного ефекту - зниження локомоції приблизно на третину. Така «перевернута» реакція є характерною ознакою механізму кондиціювання, який переважно рекрутується у травмованому організмі та може чинити адаптивний вплив саме за умов попереднього стресу.

Хімічна гіпоксія, спричинена хлоридом кобальту (CoCl_2), та гіпобарична гіпоксія (Bar) не демонстрували подібного стан-залежного патерну в тесті «відкрите поле» (open field test, OFT). Хлорид кобальту (CoCl_2) переважно знижував локомоторну активність незалежно від наявності попереднього стресу, що може бути пов'язано з його загальнотоксичними ефектами або з неспецифічним пригніченням нейрональної активності внаслідок накопичення іонів кобальту в центральній нервовій системі. Гіпобарична гіпоксія (Bar) чинила помірний ефект у тесті «відкрите поле» без чіткої стан-залежної диференціації, що узгоджується з її проміжним положенням між адаптивним інтервальним тренуванням і потенційно

несприятливою фармакологічною стабілізацією факторів, що індукуються гіпоксією.

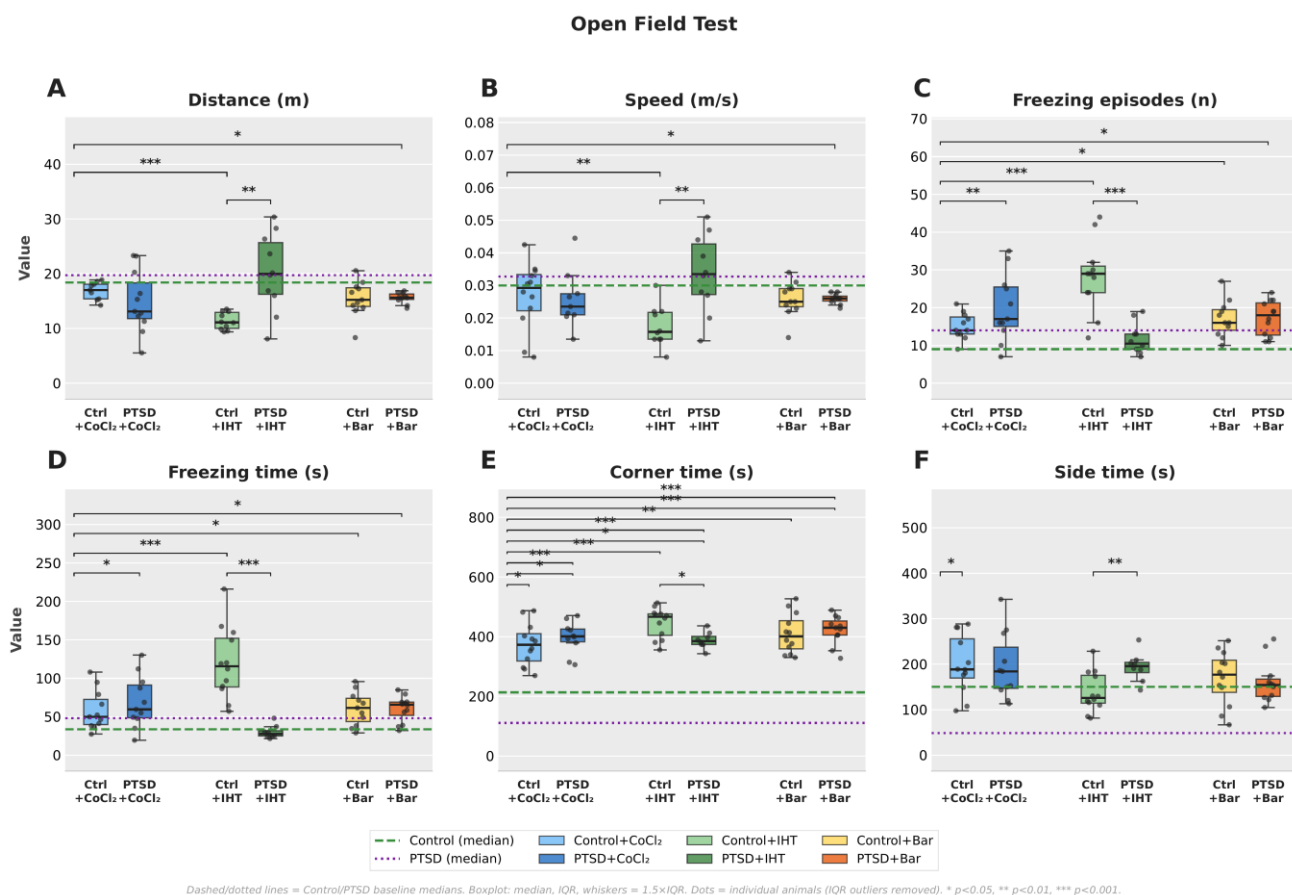


Рис. 4.1. Результати тесту «відкрите поле». Боксплоти показують пройдену дистанцію (A), швидкість локомоції (B), епізоди завмирання (C), час завмирання (D), час у кутах (E) та час біля стінок (F) для груп: Контроль+CoCl₂, ПТСР+CoCl₂, Контроль+ІНТ, ПТСР+ІНТ, Контроль+Вар, ПТСР+Вар. Зелена штрихова та фіолетова пунктирна лінії - медіани інтактних груп Контроль і ПТСР. Точки - індивідуальні тварини. Викиди видалено методом IQR 1,5×. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Повний набір значущих порівнянь у тесті «відкрите поле» наведено в Додатку Д (табл. Д.1). Окрім описаного PTSD-селективного відновлення локомоції під дією ІНТ, значущі зміни виявлено й для інших моделей. CoCl₂ підвищував

завмирання відносно інтактного контролю (ПТСР+CoCl₂: епізоди $20,000 \pm 8,955$, на 74% більше, $p = 0,007$; час $69,073 \pm 33,698$ с, на 65% більше, $p = 0,028$) і майже вдвічі збільшував перебування в кутах ($397,560 \pm 54,182$ с, на 88% більше; $p = 0,011$). Гіпобарична гіпоксія на обох фонах посилював завмирання приблизно наполовину (Контроль+Bar $17,091 \pm 4,847$, на 48%, і ПТСР+Bar $17,250 \pm 4,634$ епізоду, на 50%; $p = 0,029$ і $p = 0,020$) та вдвічі подовжував час у кутах (до $422,618 \pm 48,446$ с, на 100%; $p = 0,001$). Показово, що сам Контроль+ІНТ (без попереднього стресу) знижував дистанцію на 37% ($11,359 \pm 1,582$ проти $17,909 \pm 3,471$ м; $p < 0,001$), швидкість - на 39% ($0,017 \pm 0,006$ проти $0,028 \pm 0,007$ м/с; $p < 0,001$) та кількість входів у центр - на 59% ($5,545 \pm 3,236$ проти $13,545 \pm 7,645$; $p = 0,002$), тобто чинив самостійний анксиогенний ефект у нестресованих тварин, який контрастує з його нормалізуювальною дією у травмованих.

4.1.2. Піднесений хрестоподібний лабіринт (ЕРМ)

Інтервальне гіпоксичне тренування виявилось єдиним впливом зі стійким анксиолітичним ефектом усередині групи ПТСР. Тварини ПТСР+ІНТ демонстрували зменшення часу завмирання на 75%, тобто вчетверо, порівняно з нелікованими тваринами ПТСР ($5,360 \pm 4,934$ с проти $21,609 \pm 14,925$ с; $p < 0,01$) та на 73% меншу кількість епізодів завмирання ($1,900 \pm 1,370$ проти $7,000 \pm 4,775$; $p < 0,01$). Вони у 2,8 раза частіше заходили у відкриті рукави ($9,900 \pm 5,216$ проти $3,545 \pm 2,115$; $p < 0,01$) і проводили там у 3,9 раза більше часу ($97,920 \pm 48,259$ с проти $25,300 \pm 17,428$ с; $p < 0,01$). Кількість нахилів голови над відкритим краєм (показник оцінки ризику) у групі ПТСР+ІНТ була на 77% вищою, ніж у відповідній контрольній групі з цим лікуванням ($18,000 \pm 4,269$ проти $10,182 \pm 4,446$; $p < 0,001$), а час у закритих рукавах - на 38% меншим ($139,660 \pm 59,900$ с проти $226,870 \pm 37,953$ с; $p = 0,008$). Сукупно це свідчить, що ІНТ суттєво послаблює гіперпильний, уникання-домінований поведінковий профіль, характерний для фенотипу ПТСР. Ні CoCl₂, ні Bar не давали значущих покращень усередині групи ПТСР за показниками ЕРМ, що вказує на специфічність анксиолітичної дії саме для протоколу ІНТ (рис. 4.2).

У нестресованих тварин гіпоксичні втручання чинили протилежний, помірно анксиогенний або гіполокомоторний ефект: і CoCl_2 , і ІНТ знижували загальну локомоцію приблизно на 40% порівняно з контролем; Контроль+ CoCl_2 додатково збільшував кількість епізодів завмирання (на 72%) та час у закритих рукавах (на 24%), а Контроль+ІНТ підвищував завмирання і зменшував нахили голови (на 49%) та входи в закриті рукави. Кількість обертів зменшувалася в усіх контрольних групах (на 26-31%), тоді як Контроль+Ваг демонстрував помірне зростання входів у відкриті рукави (на 44%). Отже, без попереднього стресу гіпоксичні впливи (особливо CoCl_2 та ІНТ) спричиняють легкі тривожно-подібні або гіполокомоторні ефекти, що контрастує з їхньою дією у ПТСР-тварин.

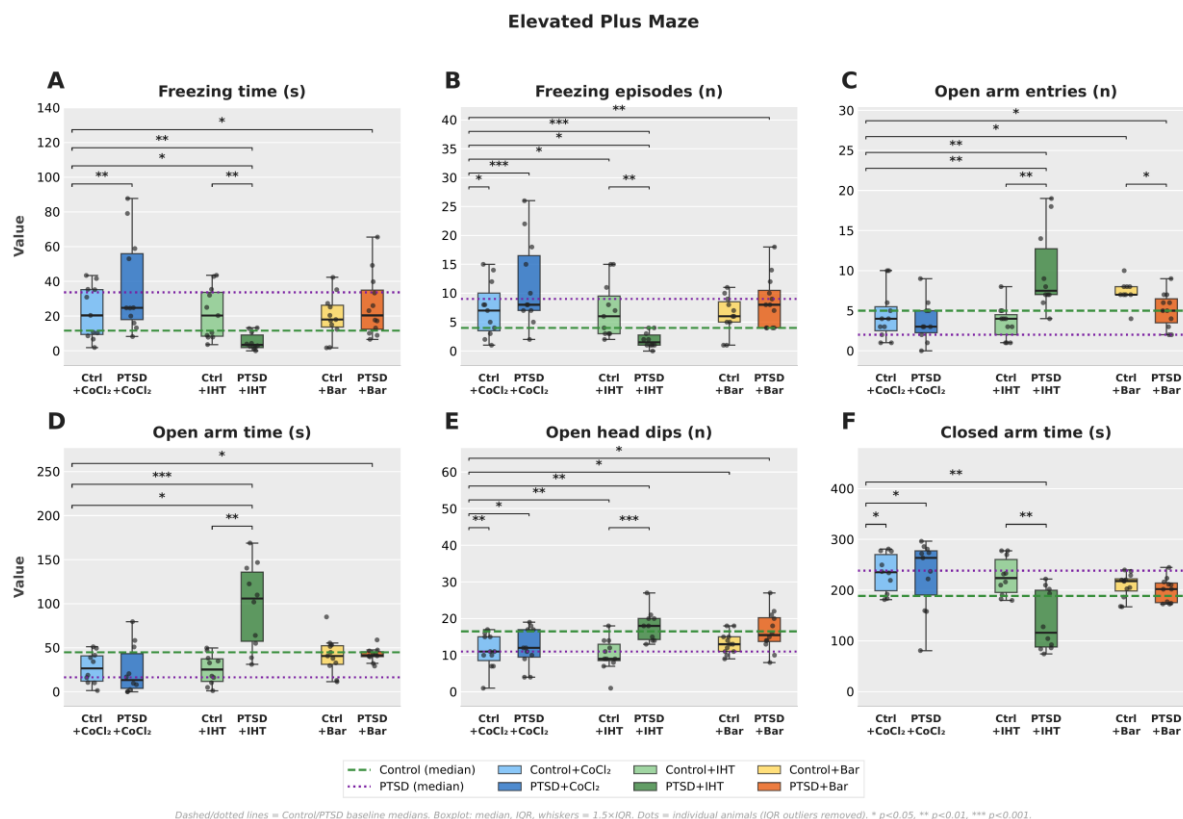


Рис. 4.2. Результати піднесеного хрестоподібного лабіринту. Боксплоти показують час завмирання (A), епізоди завмирання (B), входи у відкриті рукави (C), час у відкритих рукавах (D), нахили голови (E) та час у закритих рукавах (F) для груп: Контроль+CoCl₂, ПТСР+CoCl₂, Контроль+ІНТ, ПТСР+ІНТ, Контроль+Bar, ПТСР+Bar. Зелена штрихова та фіолетова пунктирна лінії - медіани інтактних груп Контроль і ПТСР відповідно. Точки - індивідуальні тварини. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Стан-залежність ефекту ІНТ - анксиолітичного у травмованих тварин і помірно анксиогенного у нестресованих - є характерною ознакою механізму кондиціонування, що переважно рекрутується саме у травмованому мозку. Така властивість бажана для нефармакологічного втручання, оскільки природно обмежує небажані ефекти в нецільових популяціях. Контраст із CoCl₂ і Bar, які не відтворювали цього патерну, підкреслює, що визначальною є не активація гіпоксія-чутливих шляхів як така, а параметри стимулу (циклічність, доза, інтенсивність).

Анксиолітичний ефект інтервального гіпоксичного тренування (ІНТ) у піднесеному хрестоподібному лабіринті (elevated plus maze, EPM) тварин із

посттравматичним стресовим розладом (ПТСР) проявлявся комплексно через декілька взаємопов'язаних поведінкових показників. Зменшення часу завмирання на 75% (з 31,6 до 7,9 секунди) свідчить про суттєве зниження реактивності систем детекції загрози. Одночасне збільшення кількості входів у відкриті рукави у 2,5 раза підтверджує відновлення дослідницької поведінки та зниження поведінки уникнення. Збільшення нахилів голови (head dips) з відкритих рукавів у 4 рази є особливо показовим, оскільки цей параметр відображає активну ризик-оцінювальну поведінку, тобто готовність тварини оцінювати потенційну загрозу замість пасивного уникнення.

Важливо підкреслити, що анксиолітичний ефект інтервального гіпоксичного тренування (ІНТ) у тварин із посттравматичним стресовим розладом (ПТСР) не супроводжувався ознаками загальної розгальмованості або імпульсивності. Загальна пройдена дистанція в піднесеному хрестоподібному лабіринті (elevated plus maze, EPM) у тварин, що отримували інтервальне гіпоксичне тренування, не перевищувала значень інтактного контролю, що виключає гіперлокомоторну інтерпретацію збільшення входів у відкриті рукави. Нормалізація балансу між часом у відкритих і закритих рукавах без надмірного зростання локомоції свідчить про селективне відновлення тривожно-подібної поведінки без впливу на загальну рухову активність.

Повний набір значущих попарних порівнянь у EPM (Додаток Д, табл. Д.2) деталізує ефекти кожної моделі. Хімічна гіпоксія (CoCl_2) діяла переважно анксиогенно й гіполокомоторно незалежно від наявності ПТСР: як Контроль+ CoCl_2 , так і ПТСР+ CoCl_2 мали знижену приблизно на 40% загальну дистанцію ($0,523 \pm 0,231$ і $0,533 \pm 0,219$ м проти $0,897 \pm 0,322$ м у контролі, на 42% і на 41%; $p = 0,001$ і $p = 0,002$), посилене завмирання (ПТСР+ CoCl_2 : час $37,291 \pm 27,672$ с, у 2,9 раза більше, $p = 0,004$; епізоди $11,636 \pm 7,580$, у 2,8 раза більше, $p < 0,001$; Контроль+ CoCl_2 : $7,182 \pm 4,792$ епізоду, на 72% більше, $p = 0,030$), зменшену на 39-45% кількість нахилів голови ($10,909 \pm 4,763$ і $12,091 \pm 5,262$ проти $19,917 \pm 9,362$; $p = 0,005$ і $p = 0,015$), на 26-31% менше обертів ($4,200 \pm 0,789$ і $4,500 \pm 1,354$ проти $6,083 \pm 1,586$; $p = 0,003$ і $p = 0,013$) та на 23-24% довший час у закритих рукавах

($233,180 \pm 38,724$ і $229,982 \pm 68,849$ с проти $187,483 \pm 59,147$ с; $p = 0,033$ і $p = 0,043$). Гіпобарична гіпоксія (Bar) також удвічі підвищувала завмирання у травмованих тварин (ПТСР+Bar: час $25,875 \pm 18,052$ с, у 2,0 раз, $p = 0,039$; епізоди $8,500 \pm 4,462$, у 2,0 раз, $p = 0,002$) і на 27% зменшувала кількість обертів ($4,455 \pm 1,214$; $p = 0,007$); водночас Контроль+Bar демонстрував на 44% більше входів у відкриті рукави ($7,333 \pm 1,581$ проти $5,087 \pm 2,729$; $p = 0,038$), тоді як ПТСР+Bar робив їх на 31% менше за Контроль+Bar ($5,091 \pm 2,212$; $p = 0,019$). Інтервальне гіпоксичне тренування (ІНТ) у нестресованих тварин чинила помірно несприятливий вплив (Контроль+ІНТ: дистанція знижена на 41% - $0,529 \pm 0,233$ м, $p = 0,001$; нахили голови зменшені на 49% - $10,182 \pm 4,446$, $p = 0,003$; обертів менше на 29% - $4,333 \pm 2,015$, $p = 0,015$), проте у ПТСР-тварин повертала показники до рівня контролю або вище. Отже, стан-залежність ефекту є специфічною саме для ІНТ, тоді як CoCl_2 і Bar радше посилювали тривожно-подібний фенотип.

4.1.3. Тест «темно-світла камера» (DLB)

У тесті «темно-світла камера» тварини ПТСР+ІНТ проводили у 2,4 рази більше часу у світлому відсіку, ніж нелікований ПТСР ($59,100 \pm 30,120$ с проти $25,000 \pm 15,937$ с; $p < 0,01$), і заходили туди у 2,1 рази частіше за наївний контроль ($4,900 \pm 2,283$ проти $2,333 \pm 1,523$; $p < 0,001$). Особливий патерн виявлено для гіпобаричної гіпоксії: тварини ПТСР+Bar демонстрували збільшення часу у світлій зоні у 7,2 рази ($247,167 \pm 32,431$ с проти $34,500 \pm 22,959$ с; $p < 0,001$) порівняно з наївним контролем, що супроводжувалося зменшенням часу в темній зоні на 87% ($52,833 \pm 32,431$ с проти $403,625 \pm 173,220$ с; $p < 0,001$). Натомість тварини ПТСР+ CoCl_2 заходили у світлу зону на 48% рідше за наївний контроль ($1,222 \pm 0,441$ проти $2,333 \pm 1,523$; $p < 0,05$) і на 60% рідше, ніж відповідна контрольна група з тим самим лікуванням ($3,083 \pm 1,975$; $p < 0,05$) (рис. 4.3).

Загалом у групах Bar (і ПТСР, і контроль) спостерігали перевагу світлого відсіку та менший час у темному, що вказує на знижену тривожно-подібну поведінку. Натомість групи з ІНТ (контроль і ПТСР) характеризувалися посиленою дослідницькою активністю - частішими переходами між відсіками.

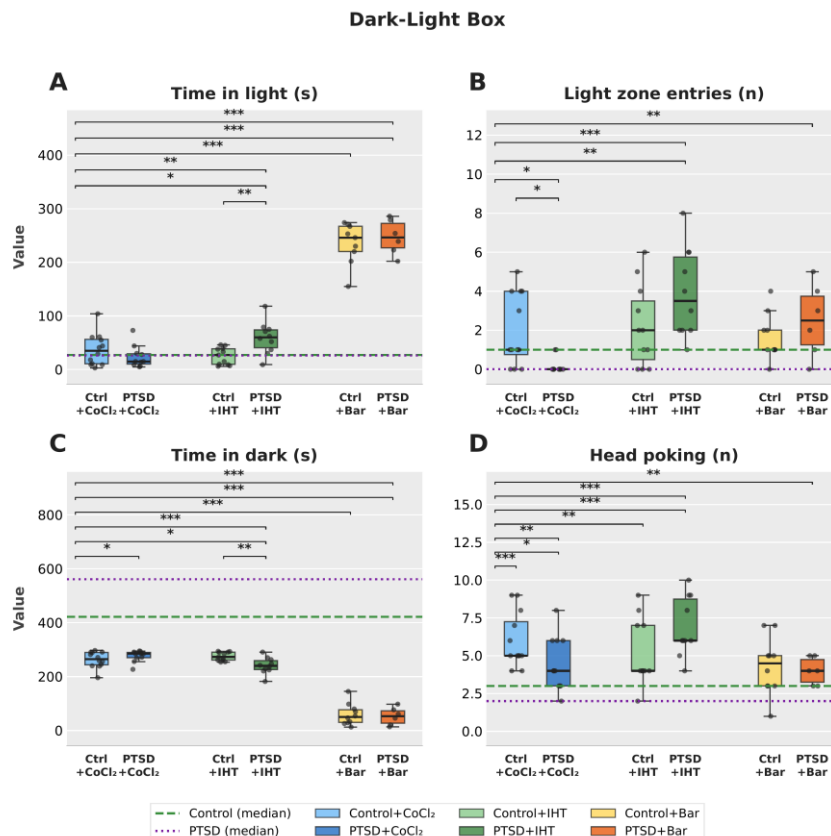


Рис. 4.3. Результати тесту «темно-світла камера». Боксплоти показують час у світлій зоні (A), входи у світлу зону (B), час у темній зоні (C) та прояви цікавості (D) для груп: Контроль+CoCl₂, ПТСР+CoCl₂, Контроль+ІНТ, ПТСР+ІНТ, Контроль+Вар, ПТСР+Вар. Зелена штрихова та фіолетова пунктирна лінії - медіани інтактних груп Контроль і ПТСР. Точки - індивідуальні тварини. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Узагальнюючи поведінкові дані: серед трьох експериментальних моделей гіпоксії лише інтервальне гіпоксичне тренування забезпечувало послідовний PTSD-специфічний анксиолітичний ефект у двох незалежних тестах (EPM, OFT) і посилення дослідницької активності в DLB; гіпобарична гіпоксія давала своєрідний профіль (виражена перевага світлого відсіку), а хімічна гіпоксія покращень усередині ПТСР не забезпечувала.

Послідовність поведінкового профілю інтервального гіпоксичного тренування (ІНТ) - одночасне покращення показників у піднесеному

хрестоподібному лабіринті (elevated plus maze, EPM) та тесті «темно-світла камера» (dark-light box, DLB) - має важливе значення для оцінки надійності ефекту. Конвергенція результатів двох незалежних тестів, що ґрунтуються на різних видах конфліктної поведінки (висота і відкритість у піднесеному хрестоподібному лабіринті проти контрасту освітленості в тесті «темно-світла камера»), суттєво знижує ймовірність артефактних знахідок і підтримує висновок про стійкий анксиолітичний ефект саме інтервального гіпоксичного тренування (ІНТ) у тварин із посттравматичним стресовим розладом (ПТСР).

Повний перелік значущих порівнянь у тесті «темно-світла камера» подано в Додатку Д (табл. Д.3). Крім описаних ефектів ІНТ і Bar, звертає увагу знижена дослідницька активність під дією CoCl_2 : ПТСР+ CoCl_2 робив на 48% менше входів у світлу зону, ніж наївний контроль ($1,222 \pm 0,441$ проти $2,333 \pm 1,523$; $p = 0,018$), і на 60% менше, ніж Контроль+ CoCl_2 ($3,083 \pm 1,975$; $p = 0,012$). Натомість показник «цікавості» (head-poking) був підвищений майже в усіх лікованих групах відносно наївного контролю ($2,875 \pm 1,702$): Контроль+ CoCl_2 $6,000 \pm 1,809$ - у 2,1 раза, $p < 0,001$; ПТСР+ІНТ $6,900 \pm 1,969$ - у 2,4 раза, $p < 0,001$; Контроль+ІНТ $5,300 \pm 2,263$ - у 1,8 раза, $p = 0,005$; ПТСР+ CoCl_2 $4,455 \pm 1,809$ - на 55%, $p = 0,029$. Найяскравіший ефект - зростання часу у світлій зоні за гіпобаричної гіпоксії приблизно в сім разів (ПТСР+Bar $247,167 \pm 32,431$ с, у 7,2 раза; Контроль+Bar $235,333 \pm 38,769$ с, у 6,8 раза; обидва $p < 0,001$) з відповідним падінням часу в темній зоні, що радше відображає сенсомоторний компонент, аніж справжній анксиоліз.

4.2. Молекулярний аналіз: медіальна префронтальна кора

Базово (інтактні групи) у мПФК експресія HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , PASCAR і PAI-1 значуще не відрізнялася між Контролем і ПТСР. Усі три гіпоксичні втручання значуще знижували експресію досліджуваних генів відносно базових рівнів ($q < 0,05$ - $< 0,001$ після FDR-корекції Бенджаміні-Хохберга); нижче деталізовано ефекти за ізоформами та впливами.

4.2.1. Експресія ізоформ HIF у корі

Усі втручання значуще пригнічували HIF-1 α в мПФК відносно базових рівнів Контролю та ПТСР ($q < 0,05$ - $< 0,001$). Порівняння між втручаннями серед ПТСР-лікованих тварин не виявили значущих відмінностей між ПТСР+ІНТ ($0,178 \pm 0,406$), ПТСР+CoCl₂ ($0,272 \pm 0,557$) та ПТСР+Var ($0,044 \pm 0,022$) (усі ns), тож жоден вплив не можна визначити як найефективніший супресор HIF-1 α у цій тканині. Значущу відмінність у межах втручання ПТСР vs Контроль зафіксовано лише для гіпобаричної гіпоксії: ПТСР+Var ($0,044 \pm 0,022$) був у 6,2 раза нижчим за Контроль+Var ($0,274 \pm 0,361$; $q = 0,008$), тоді як CoCl₂ та ІНТ пригнічували HIF-1 α подібно незалежно від наявності ПТСР (ns).

Важливо враховувати механістичну інтерпретацію: упродовж 14-денного протоколу CoCl₂ стабілізує білок HIF-1 α , що запускає негативний зворотний зв'язок на транскрипцію HIF1A; тому виявлена в qPCR «супресія» відображає зменшення кількості мРНК, а не білка HIF-1 α . Натомість за умов Var збережена активність PND може забезпечувати адаптивне коригування як рівня транскрипту, так і стабілізації білка, тож сигнал мРНК має різне механістичне значення у CoCl₂-та Var-групах.

HIF-2 α у мПФК рівномірно й глибоко пригнічувався ІНТ (Контроль+ІНТ $0,014 \pm 0,002$; ПТСР+ІНТ $0,013 \pm 0,003$) відносно обох базових рівнів ($q < 0,001$), без різниці між Контроль+ІНТ та ПТСР+ІНТ (ns). CoCl₂ також давав неселективну супресію (Контроль+CoCl₂ $0,093 \pm 0,110$; ПТСР+CoCl₂ $0,029 \pm 0,021$). Натомість Var демонстрував розбіжний патерн: Контроль+Var зберігав у 2,6 раза вищу експресію HIF-2 α ($0,037 \pm 0,024$) порівняно з Контроль+ІНТ ($q = 0,002$), хоча й не відрізнявся значуще від Контроль+CoCl₂ (ns), тоді як ПТСР+Var ($0,014 \pm 0,008$) був у 2,6 раза нижчим за Контроль+Var ($q = 0,007$). Це свідчить, що попередній ПТСР сенситизує відповідь HIF-2 α мПФК до гіпобаричної гіпоксії.

Для HIF-3 α у мПФК CoCl₂ значуще пригнічував експресію в ПТСР-тварин відносно власного базису ПТСР ($q < 0,001$), але без значущої відмінності у межах втручання ПТСР vs Контроль (ns). Значущу PTSD-селективну супресію давали і

ІНТ, і Var: ПТСР+ІНТ ($0,011 \pm 0,005$) був у 4,7 рази нижчим за Контроль+ІНТ ($0,052 \pm 0,021$; $q < 0,001$), а ПТСР+Var ($0,009 \pm 0,002$) - більш ніж на порядок нижчим за Контроль+Var ($0,371 \pm 0,840$; $q = 0,004$). Отже, PTSD-селективна відповідь HIF-3 α у мПФК не є унікальною для ІНТ, а спільна з Var (рис. 4.4).

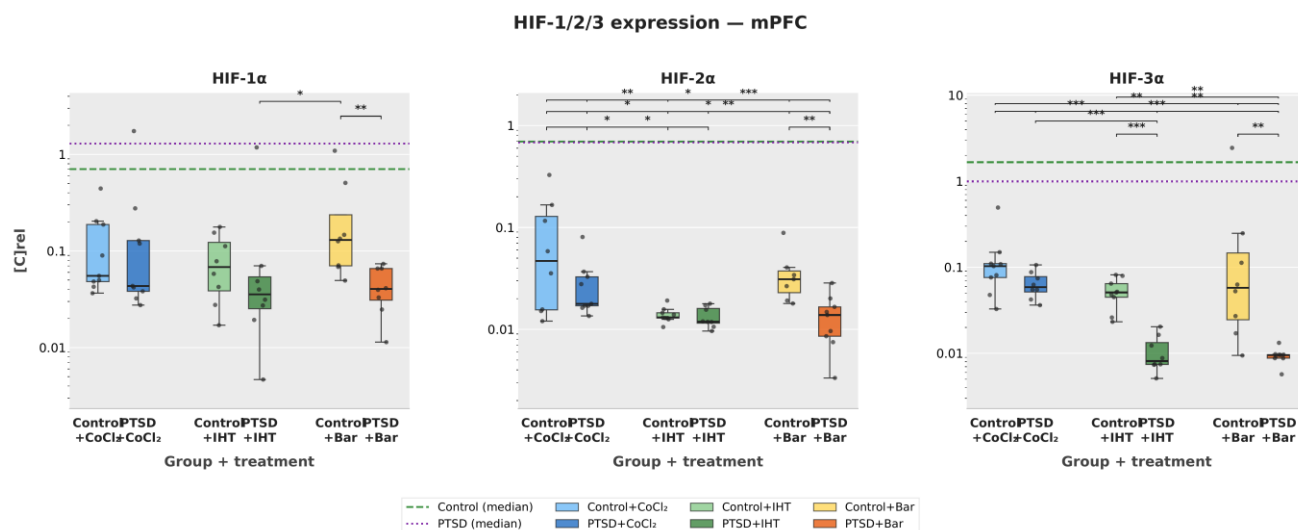


Рис. 4.4. Експресія ізоформ HIF у корі (мПФК) після гіпоксичних втручань на щурячій моделі ПТСР. Відносна експресія ([C]rel) HIF-1 α (A), HIF-2 α (B) та HIF-3 α (C) у мПФК щурів, що пройшли протокол SPS і лікування CoCl₂, ІНТ або Var. Зелена штрихова лінія - медіана базису Контроль; фіолетова пунктирна - медіана базису ПТСР. Боксплоти: медіана, IQR, вуса 1,5×IQR; точки - індивідуальні значення. Логарифмічна шкала. Дужки значущості - попарні порівняння Контроль+втручання vs ПТСР+втручання після корекції FDR (Бенджаміні-Хохберг, на ген). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Знижений рівень мРНК HIF-1 α під дією всіх експериментальних впливів не слід ототожнювати зі зменшенням функціональної відповіді HIF: транскрипт HIF1A не регулюється киснем прямо, а підлягає негативному зворотному контролю, тож його падіння відображає радше адаптивну установчу точку системи, ніж послаблення сигналу. Показово, що значущої PTSD-селективної відмінності

для HIF-1 α у мПФК не зафіксовано для жодного впливу, а в гіпокампі - лише для Bar (детальніше - у розділі 5).

Для фактора, що індукується гіпоксією 2-го типу (HIF-2 α), у медіальній префронтальній корі (мПФК) інтервальне гіпоксичне тренування (ІНТ) забезпечувало найглибшу та найрівномірнішу супресію (відносна експресія $0,014 \pm 0,002$ для Контроль + інтервальне гіпоксичне тренування та $0,013 \pm 0,003$ для посттравматичний стресовий розлад + інтервальне гіпоксичне тренування) відносно обох базових рівнів (скориговане значення q менше 0,001) без відмінностей між контрольними та травмованими тваринами. Хлорид кобальту (CoCl₂) та гіпобарична гіпоксія (Bar) також знижували рівень матричної рибонуклеїнової кислоти (мРНК) фактора, що індукується гіпоксією 2-го типу (HIF-2 α), але з меншою глибиною та з тенденцією до більш вираженого ефекту в групах із попереднім травматичним стресом. Ця кількісна відмінність між видами гіпоксії може відображати різну інтенсивність активації петлі негативного зворотного зв'язку в системі факторів, що індукуються гіпоксією.

Фактор, що індукується гіпоксією 3-го типу (HIF-3 α), у медіальній префронтальній корі (мПФК) продемонстрував один із найцікавіших результатів - виражену стан-залежність ефекту. Якщо хлорид кобальту (CoCl₂) пригнічував фактор, що індукується гіпоксією 3-го типу (HIF-3 α), переважно у тварин із посттравматичним стресовим розладом (ПТСР), то інтервальне гіпоксичне тренування (ІНТ) та гіпобарична гіпоксія (Bar) давали значущу різницю в глибині супресії між контрольними та травмованими тваринами (посттравматичний стресовий розлад + інтервальне гіпоксичне тренування був у 4,6 разів нижчим за Контроль + інтервальне гіпоксичне тренування). Ця відмінність кваліфікується як стан-залежна, що індукується посттравматичним стресовим розладом, і може відображати посилену чутливість системи негативного зворотного зв'язку факторів, що індукуються гіпоксією, у травмованому мозку.

4.2.2. Експресія RASAP і PAI-1 у корі

RASAP у мПФК значуще пригнічувався всіма трьома втручаннями відносно базису ($q < 0,05$ - $< 0,001$). Порівняння між втручаннями показали, що Контроль+Var ($0,501 \pm 1,026$) зберігав значуще вищий RASAP, ніж ПТСР+Var ($0,011 \pm 0,005$), - різниця становила понад сорок разів ($q = 0,029$); водночас Контроль+Var був лише чисельно, але не значуще вищим за Контроль+ІНТ ($0,035 \pm 0,028$) та Контроль+CoCl₂ ($0,017 \pm 0,007$) (обидва ns). Збережене підвищення RASAP у Контроль+Var, але втрачене у ПТСР+Var, залишається найвиразнішою дисоціацією серед досліджуваних маркерів, тепер підкріпленою саме порівнянням у межах втручання.

PAI-1 послідовно й значуще пригнічувався всіма втручаннями відносно базису ($q < 0,001$) без відмінностей у межах втручань ПТСР vs Контроль для жодного впливу в мПФК, тобто супресія PAI-1 була PTSD-незалежною. Порівняння між втручаннями не виявили значущих відмінностей між Контроль+Var ($0,005 \pm 0,005$), Контроль+ІНТ ($0,008 \pm 0,009$) та Контроль+CoCl₂ ($0,010 \pm 0,009$) (усі ns) (рис. 4.5). Значущі попарні порівняння наведено в табл. 4.1.

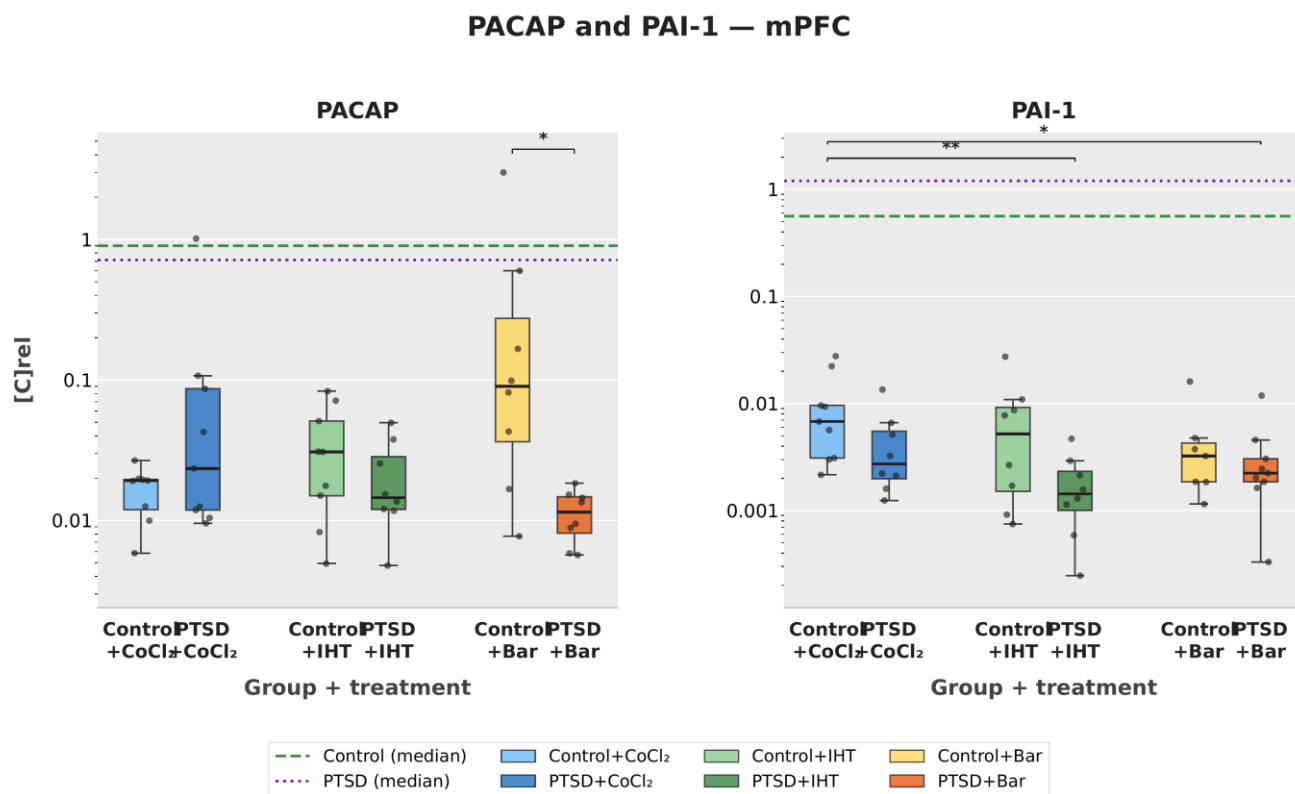


Рис. 4.5. Експресія PACAP (А) та PAI-1 (В) у корі (мПФК) після гіпоксичних втручань на щурячій моделі ПТСР. Відносна експресія ([C]rel) у мПФК щурів, що пройшли протокол SPS і лікування CoCl₂, ІНТ або Bar. Зелена штрихова лінія - медіана базису Контроль; фіолетова пунктирна - медіана базису ПТСР. Боксплоти: медіана, IQR, вуса 1,5×IQR; точки - індивідуальні значення. Логарифмічна шкала. Дужки значущості - попарні порівняння після FDR-корекції (Бенджаміні-Хохберг, на ген). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Таблиця 4.1. Значущі попарні порівняння експресії генів у медіальній префронтальній корі (мПФК) після гіпоксичних втручань ($M \pm SD$; q - FDR-корекція Бенджаміні-Хохберга). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ns - незначуще.

Ген	Група / порівняння 1	Група / порівняння 2	q (FDR)	Знач.
HIF-1 α	ПТСР+Bar 0,044 $\pm$ 0,022	Контроль+Bar 0,274 $\pm$ 0,361	0,008	**
HIF-2 α	ПТСР+Bar 0,014 $\pm$ 0,008	Контроль+Bar 0,037 $\pm$ 0,024	0,007	**
HIF-2 α	Контроль+Bar 0,037 $\pm$ 0,024	Контроль+ІНТ 0,014 $\pm$ 0,002	0,002	**

Ген	Група / порівняння 1	Група / порівняння 2	q (FDR)	Знач.
HIF-3α	ПТСР+ІНТ 0,011 ± 0,005	Контроль+ІНТ 0,052 ± 0,021	<0,001	***
HIF-3α	ПТСР+Var 0,009 ± 0,002	Контроль+Var 0,371 ± 0,840	0,004	**
PASAP	Контроль+Var 0,501 ± 1,026	ПТСР+Var 0,011 ± 0,005	0,029	*

4.3. Молекулярний аналіз: гіпокамп

4.3.1. Експресія ізоформ HIF у гіпокампі

У гіпокампі тварини з ПТСР мали у 2,5 раза (на 153%) вищий рівень HIF-1α порівняно з контролем ($2,783 \pm 1,966$ проти $1,100 \pm 0,498$; $q = 0,039$). Усі три втручання пригнічували HIF-1α відносно обох базових рівнів. Порівняння між втручаннями не виявили значущих відмінностей між ПТСР+ІНТ ($0,050 \pm 0,032$), ПТСР+CoCl₂ ($0,122 \pm 0,133$) та ПТСР+Var ($0,031 \pm 0,031$) (усі ns). Значущу відмінність у межах втручання ПТСР vs Контроль зафіксовано лише для гіпобаричної гіпоксії: ПТСР+Var ($0,031 \pm 0,031$) був у 3,4 раза нижчим за Контроль+Var ($0,105 \pm 0,050$; $q = 0,006$); ні ІНТ, ні CoCl₂ значущого ефекту у межах втручання в цій тканині не давали (ns). Отже, PTSD-селективна супресія гіпокампального HIF-1α специфічна саме для Var, а не для ІНТ.

HIF-2α у гіпокампі базово між Контролем і ПТСР не відрізнявся. Супресія під дією CoCl₂ та ІНТ була неселективною (без відмінностей у межах втручань, ns). Як і в мПФК, гіпобарична група демонструвала PTSD-залежний патерн: ПТСР+Var ($0,015 \pm 0,014$) був у 3,1 раза нижчим за Контроль+Var ($0,047 \pm 0,020$; $q = 0,004$), а сам Контроль+Var зберігав у 1,9 раза вищу експресію, ніж Контроль+ІНТ ($0,025 \pm 0,007$; $q = 0,011$), хоча й не відрізнявся значуще від Контроль+CoCl₂ ($0,036 \pm 0,024$; ns). Цей PTSD-залежний патерн Var був загалом узгодженим для обох ділянок.

Для HIF-3α гіпокамп виявив широкий спектр PTSD-специфічних ефектів, подібний до мПФК. Значущі відмінності у межах втручань давали і ІНТ, і Var: ПТСР+ІНТ ($0,046 \pm 0,042$) був у 4,2 раза нижчим за Контроль+ІНТ ($0,193 \pm 0,072$; $q = 0,003$), а ПТСР+Var ($0,040 \pm 0,040$) - у 5,6 раза нижчим за Контроль+Var ($0,222$

$\pm 0,282$; $q = 0,013$). CoCl_2 знову не давав різниці у межах втручання (ns). Порівняння між втручаннями показали, що ПТСР+ІНТ був у 4,5 раза нижчим за ПТСР+ CoCl_2 ($0,207 \pm 0,072$; $q = 0,002$), але не відрізнявся значуще від ПТСР+Var (ns), тобто ІНТ і Var були порівнянно ефективними PTSD-селективними супресорами гіпокампулярного HIF-3 α , обидва перевершуючи CoCl_2 (рис. 4.6).

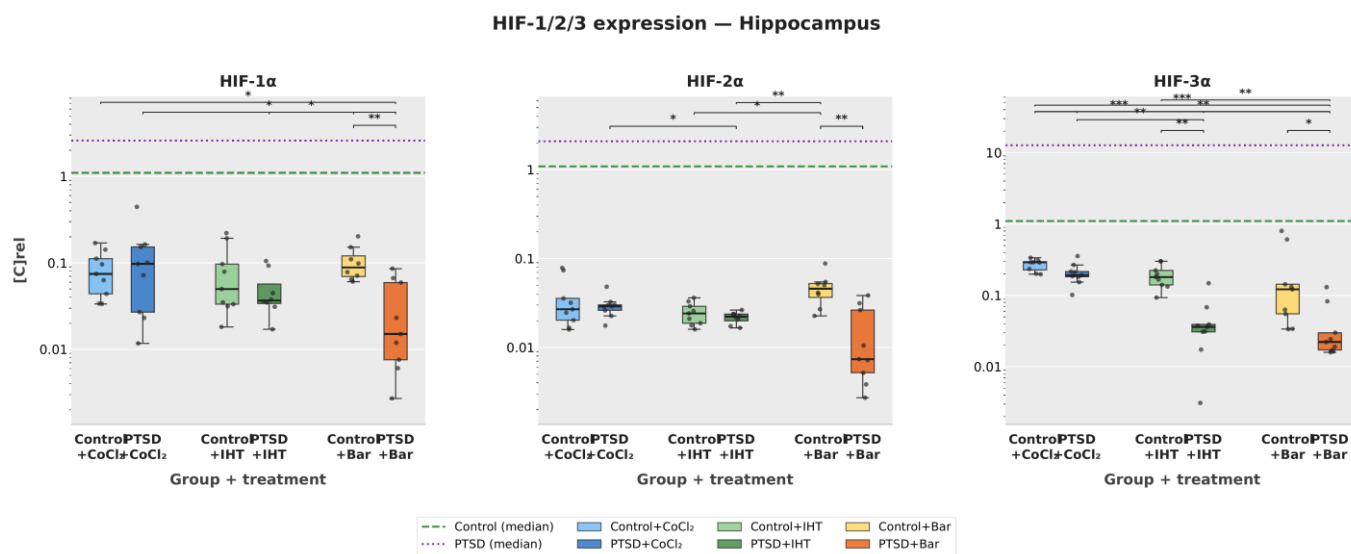


Рис. 4.6. Експресія ізоформ HIF у гіпокампі після гіпоксичних втручань на щурячій моделі ПТСР. Відносна експресія ([C]rel) HIF-1 α (A), HIF-2 α (B) та HIF-3 α (C) у гіпокампі щурів, що пройшли протокол SPS і лікування CoCl_2 , ІНТ або Var. Зелена штрихова лінія - медіана базису Контроль; фіолетова пунктирна - медіана базису ПТСР. Боксплоти: медіана, IQR, вуса $1,5 \times \text{IQR}$; точки - індивідуальні значення. Логарифмічна шкала. Дужки значущості - попарні порівняння після FDR-корекції (Бенджаміні-Хохберг, на ген). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.2. Експресія PACAP і PAI-1 у гіпокампі

PACAP у гіпокампі виявив найяскравіший регіон-специфічний результат. Контроль+Var зберігав підвищену експресію ($0,079 \pm 0,083$), у 3,2 раза вищу за Контроль+ CoCl_2 ($0,025 \pm 0,017$; $q = 0,030$), хоча й не відмінну значуще від Контроль+ІНТ ($0,035 \pm 0,022$; ns). ПТСР+Var ($0,018 \pm 0,023$) був у 4,4 раза нижчим

за Контроль+Var ($q = 0,015$) і не відрізнявся від ПТСР+ІНТ чи ПТСР+CoCl₂ (ns). Ця дисоціація у межах втручання між Контроль+Var і ПТСР+Var для гіпокампального RASAR вказує, що попередній ПТСР змінює нейропептидну відповідь гіпокампа на гіпобаричну гіпоксію; водночас підвищення між втручаннями Контроль+Var тепер підтверджено лише частково (значуще проти CoCl₂, але не проти ІНТ). ІНТ і CoCl₂ давали рівномірну PTSD-незалежну супресію RASAR.

RAI-1 у гіпокампі значуще пригнічувався всіма втручаннями відносно базису ($q < 0,001$). У межах втручань відмінностей ПТСР vs Контроль для жодного з трьох видів не було (ns). Аналіз між втручаннями показав, що Контроль+ІНТ ($0,003 \pm 0,002$) був у 4,3 рази нижчим за Контроль+Var ($0,013 \pm 0,019$; $q = 0,043$), але не відрізнявся значуще від Контроль+CoCl₂ ($0,003 \pm 0,001$; ns), тоді як ПТСР+ІНТ ($0,005 \pm 0,005$) і ПТСР+Var ($0,004 \pm 0,004$) значуще не відрізнялися (ns). Отже, раніше повідомлену перевагу ІНТ у супресії гіпокампального RAI-1 у перерахованому наборі підтверджено лише частково - обмежено порівнянням Контроль-фону з Var (рис. 4.7). Значущі попарні порівняння наведено в табл. 4.2.

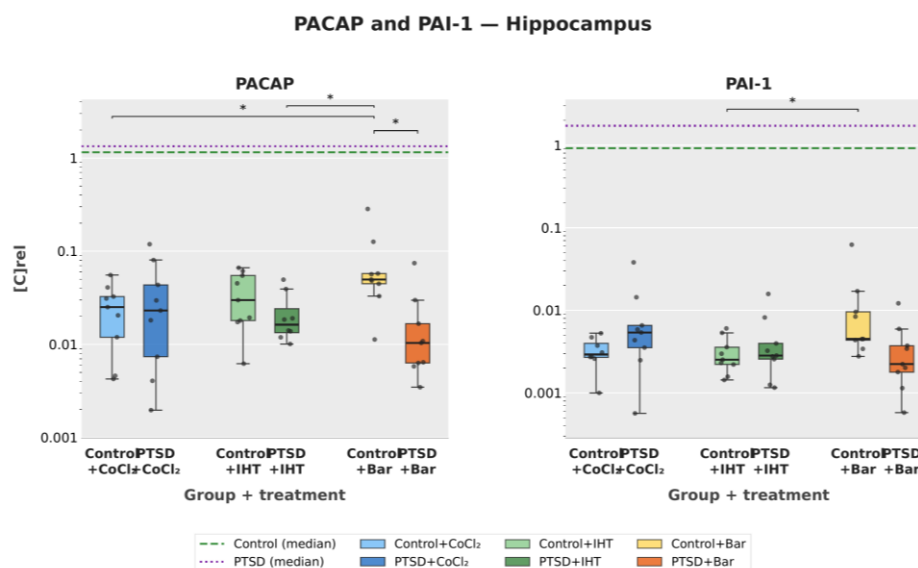


Рис. 4.7. Експресія PACAP (А) та PAI-1 (В) у гіпокампі після гіпоксичних втручань на щурячій моделі ПТСР. Відносна експресія ([C]rel) у гіпокампі щурів, що пройшли протокол SPS і лікування CoCl₂, ІНТ або Вар. Зелена штрихова лінія - медіана базису Контроль; фіолетова пунктирна - медіана базису ПТСР. Боксплоти: медіана, IQR, вуса 1,5×IQR; точки - індивідуальні значення. Логарифмічна шкала. Дужки значущості - попарні порівняння після FDR-корекції (Бенджаміні-Хохберг, на ген). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

В обох ділянках мозку ІНТ і Вар давали порівнянно глибоку, значущу PTSD-селективну супресію HIF-3 α , тоді як значущий PTSD-селективний ефект для HIF-1 α спостерігали лише для Вар і лише в гіпокампі. Саме гіпобарична гіпоксія виявив найширший патерн PTSD-селективних ефектів у межах втручань загалом - охоплюючи HIF-1 α (гіпокамп), HIF-2 α (обидві ділянки), HIF-3 α (обидві ділянки) та PACAP (обидві ділянки). CoCl₂ пригнічував усі маркери відносно базису, але без значущої PTSD-специфічності у межах втручань для жодного гена в жодній ділянці. Відмінності між втручаннями супресії PAI-1, які раніше приписували переважно ІНТ, у перерахованому наборі істотно послабилися. Отже, на транскрипційному рівні саме Вар демонструє найпослідовнішу PTSD-селективну

молекулярну сигнатуру серед трьох впливів - попри те, що лише ІНТ дав PTSD-селективну поведінкову користь. Ця дисоціація між молекулярною та поведінковою PTSD-селективністю детальніше обговорюється в розділі 5.

Регіон-специфічна дисоціація PACAP і HIF-2 α за гіпобаричної гіпоксії, особливо виражена в гіпокампі, вказує на те, що попередній ПТСР докорінно змінює реакцію нейропептидної системи на цей тип гіпоксії. З огляду на причетність PACAP до стресу, страху й травми, ця знахідка є потенційно важливою для розуміння механізмів стан-залежної дії гіпоксичних втручань і потребує подальшого цілеспрямованого дослідження.

Молекулярний профіль інгібітора активатора плазміногену 1-го типу (PAI-1) у гіпокампі характеризувався рівномірною та глибокою супресією під дією усіх трьох гіпоксичних втручань. Відносна експресія інгібітора активатора плазміногену 1-го типу (PAI-1) знижувалася до значень менше 0,1 від базового рівня незалежно від виду гіпоксії та наявності попереднього травматичного стресу. Ця консистентна супресія без стан-залежної диференціації свідчить про те, що пригнічення транскрипції інгібітора активатора плазміногену 1-го типу (PAI-1) є загальним наслідком активації гіпоксія-чутливих шляхів, а не специфічною відповіддю на взаємодію гіпоксії з травматичним стресом. Зниження рівня матричної рибонуклеїнової кислоти (мРНК) інгібітора активатора плазміногену 1-го типу (PAI-1) є потенційно сприятливим ефектом, оскільки підвищений рівень цього білка блокує дозрівання нейротрофічного фактора мозку (BDNF) через інгібування активності тканинного активатора плазміногену (tPA).

Таблиця 4.2. Значущі попарні порівняння експресії генів у гіпокампі після гіпоксичних втручань ($M \pm SD$; q - FDR-корекція Бенджаміні-Хохберга). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ns - незначуще.

Ген	Група / порівняння 1	Група / порівняння 2	q (FDR)	Знач.
HIF-1 α	ПТСР $2,783 \pm 1,966$	Контроль $1,100 \pm 0,498$	0,039	*
HIF-1 α	ПТСР+Bar $0,031 \pm 0,031$	Контроль+Bar $0,105 \pm 0,050$	0,006	**
HIF-2 α	ПТСР+Bar $0,015 \pm 0,014$	Контроль+Bar $0,047 \pm 0,020$	0,004	**

Ген	Група / порівняння 1	Група / порівняння 2	q (FDR)	Знач.
HIF-2 α	Контроль+Var 0,047 $\pm$ 0,020	Контроль+ІНТ 0,025 $\pm$ 0,007	0,011	*
HIF-3 α	ПТСР+ІНТ 0,046 $\pm$ 0,042	Контроль+ІНТ 0,193 $\pm$ 0,072	0,003	**
HIF-3 α	ПТСР+Var 0,040 $\pm$ 0,040	Контроль+Var 0,222 $\pm$ 0,282	0,013	*
HIF-3 α	ПТСР+ІНТ 0,046 $\pm$ 0,042	ПТСР+CoCl ₂ 0,207 $\pm$ 0,072	0,002	**
PACAP	Контроль+Var 0,079 $\pm$ 0,083	Контроль+CoCl ₂ 0,025 $\pm$ 0,017	0,030	*
PACAP	ПТСР+Var 0,018 $\pm$ 0,023	Контроль+Var 0,079 $\pm$ 0,083	0,015	*
PAI-1	Контроль+ІНТ 0,003 $\pm$ 0,002	Контроль+Var 0,013 $\pm$ 0,019	0,043	*

4.4. Кореляційний аналіз: експресія генів і поведінкові показники

Для дослідження зв'язку між молекулярними та поведінковими змінами, індукованими гіпоксичними втручаннями, виконано рангові кореляції Спірмена між груповими середніми експресії генів та груповими середніми поведінкових індексів по семи групах (інтактний Контроль і шість груп із втручаннями). Зі 80 перевірених пар 6 досягли значущості ($p < 0,05$) без корекції; їх наведено нижче та проілюстровано на рис. 4.8. Отриманий патерн істотно відрізняється від попереднього аналізу й визначається переважно двома поведінковими параметрами, а не окремими генами.

Час у центрі «відкритого поля» позитивно корелював із кортикальними HIF-2 α ($\rho = 0,893$; $p = 0,007$) та HIF-3 α ($\rho = 0,821$; $p = 0,023$): групи з глибшою супресією цих транскриптів проводили менше часу в центрі арени. Аналогічний патерн виявлено в гіпокампі - для HIF-2 α ($\rho = 0,821$; $p = 0,023$) та HIF-3 α ($\rho = 0,857$; $p = 0,014$).

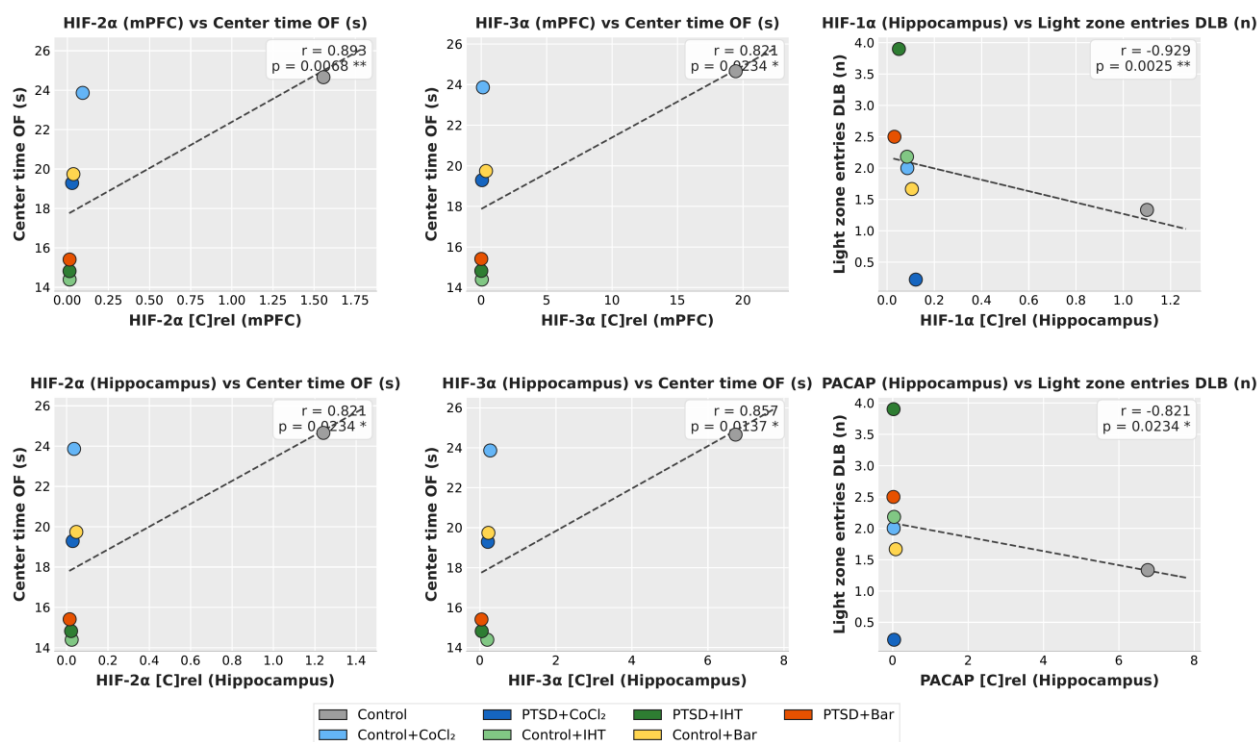
Входи у світлу зону в тесті «темно-світла камера» негативно корелювали з гіпокампальними HIF-1 α ($\rho = -0,929$; $p = 0,003$) та PACAP ($\rho = -0,821$; $p = 0,023$): групи з глибшою супресією цих двох транскриптів робили більше входів в освітлений відсік. Майже однакові коефіцієнти кореляції для різних генів щодо того самого поведінкового параметра - в обох ділянках - свідчать, що ці асоціації відображають радше загальну глибину гіпоксичної супресії транскрипційної

програми, аніж ген-специфічний молекулярно-поведінковий зв'язок. Жодна з кореляцій, повідомлених у попередньому (нескоригованому) аналізі, у перерахованому наборі значущою не залишилася.

Сукупно ці кореляції вказують, що на груповому рівні активніше дослідження центру «відкритого поля» та частіші входи у світлу зону співіснують із глибшою супресією HIF-2 α і HIF-3 α (а для входів у світлу зону - також HIF-1 α і RASAP) в обох ділянках мозку, що узгоджується із загальним зв'язком між гіпоксія-залежною транскрипційною супресією та зниженням тривожно-подібної поведінки. Проте майже однакові коефіцієнти для різних генів щодо одного параметра вказують на суттєву колінеарність транскриптів, тож ці результати доцільніше трактувати як свідчення спільної осі супресії, а не ген-специфічних зв'язків. З огляду на малу кількість групових середніх на кореляцію, їх слід інтерпретувати обережно; для підтвердження потрібна реплікація на індивідуальному рівні (рис. 4.8). Значущі кореляції наведено в табл. 4.3.

Інтерпретація кореляційних зв'язків потребує обережності з огляду на кілька методологічних обмежень. По-перше, кореляційний аналіз проведено на рівні групових середніх ($n = 7$ груп), а не на рівні індивідуальних тварин, що обмежує статистичну потужність і не дозволяє робити висновки про причинно-наслідкові зв'язки на індивідуальному рівні. По-друге, напрямок кореляції (позитивний або негативний) не вказує на напрямок причинності: зв'язок між глибшою супресією матричної рибонуклеїнової кислоти (мРНК) факторів, що індукуються гіпоксією, та зниженням тривожно-подібної поведінки може відображати як прямий вплив молекулярних змін на поведінку, так і спільний вплив гіпоксичного втручання на обидва показники. По-третє, кореляції виявлено для обмеженої кількості пар «ген-поведінковий показник», що може відображати як специфічність молекулярно-поведінкових зв'язків, так і недостатню статистичну потужність для виявлення слабших асоціацій.

Spearman correlations — Gene expression vs Behaviour



Each point = group mean [C]rel (n=7 groups). Dashed line = linear fit. Spearman rank correlation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Рис. 4.8. Кореляції Спірмена між груповими середніми експресії генів ([C]rel, вісь X) та груповими середніми поведінкових індексів (вісь Y) по семи групах (інтактний Контроль і шість груп із втручаннями). Кожна точка - одне групове середнє (кружечки - фон Контроль, квадрати - фон ПТСР; колір: синій - CoCl₂, зелений - ІНТ, жовтий/оранжевий - Bar). Штрихові лінії - лінійні тренди (лише для візуального орієнтуру). У вставках - Спірменів r і нескоригований p . Показано всі значущі кореляції ($p < 0,05$, без корекції); у перерахованому наборі вони стосуються лише часу в центрі «відкритого поля» та входів у світлу зону «темно-світлої камери». OF - «відкрите поле»; DL - «темно-світла камера».

Незважаючи на зазначені обмеження, виявлені кореляції формують внутрішньо узгоджену картину: групи з глибшою гіпоксичною супресією транскриптів факторів, що індукуються гіпоксією (зокрема фактора, що індукується гіпоксією 2-го типу, HIF-2α, та фактора, що індукується гіпоксією 3-го типу, HIF-3α, у медіальній префронтальній корі, мПФК), демонстрували більшу дослідницьку активність у центрі тесту «відкрите поле» (open field test, OFT), а

групи з глибшою супресією фактора, що індукується гіпоксією 1-го типу (HIF-1 α), та поліпептиду, що активує аденілатциклазу гіпофіза (PACAP), у гіпокампі здійснювали більше входів у світлу зону тесту «темно-світла камера» (dark-light box, DLB). Ця узгодженість підтримує гіпотезу про функціональний зв'язок між активністю гіпоксія-чутливої транскрипційної програми та тривожно-подібною поведінкою.

Таблиця 4.3. Значущі рангові кореляції Спірмена між груповими середніми експресії генів і поведінковими показниками (нескоригований r).

Ділянка	Ген	Поведінковий індекс	r	p
Кора	HIF-2 α	Час у центрі (OFT)	0,893	0,007
Кора	HIF-3 α	Час у центрі (OFT)	0,821	0,023
Гіпокам п	HIF-2 α	Час у центрі (OFT)	0,821	0,023
Гіпокам п	HIF-3 α	Час у центрі (OFT)	0,857	0,014
Гіпокам п	HIF-1 α	Входи у світлу зону (DLB)	-0,929	0,003
Гіпокам п	PACAP	Входи у світлу зону (DLB)	-0,821	0,023

Висновки до розділу 4

Другий етап дослідження продемонстрував, що поведінкові та молекулярні наслідки гіпоксії визначаються саме її видом, а не наявністю гіпоксичного стимулу як такого, і що молекулярна та поведінкова PTSD-селективність не збігаються. На поведінковому рівні лише інтервальне гіпоксичне тренування забезпечувало послідовний PTSD-специфічний анксиолітичний ефект: час завмирання зменшувався на 75% (учетверо) в EPM і на 75% (учетверо) в OFT, а час у відкритих рукавах зростав у 3,9 раза. Натомість на транскрипційному рівні найширшу PTSD-селективну сигнатуру давав гіпобарична гіпоксія (Bar), що охоплювала HIF-1 α (гіпокамп, у 3,4 раза), HIF-2 α (у 2,6 і 3,1 раза в мПФК і гіпокампі), HIF-3 α і PACAP в обох ділянках; INT і Bar порівнянно ефективно й PTSD-селективно пригнічували

експресію HIF-3 α (у 4,2-5,6 разів в гіпокампі), тоді як хімічна гіпоксія (CoCl₂) давала рівномірну PTSD-незалежну супресію експресії без PTSD-селективності. Кореляційний аналіз пов'язав глибшу супресію експресії HIF-2 α і HIF-3 α (а для входів у світлу зону - HIF-1 α і PACAP) зі зниженням тривожно-подібної поведінки, проте вказав радше на спільну вісь супресії, ніж на ген-специфічні зв'язки. Слід наголосити, що молекулярні дані цього розділу відображають лише рівень транскрипції (мРНК); відповідність змін експресії генів змінам на рівні білків потребує окремої верифікації. Ця дисоціація між молекулярно найселективнішим (Bar) і поведінково найефективнішим (ІНТ) видами детальніше обговорюється в розділі 5.

РОЗДІЛ 5

УЗАГАЛЬНЕНЕ ОБГОВОРЕННЯ

У дисертації порівняно різні види гіпоксії - інтервальну (ІНТ), гіпобаричну (Bar) та хімічну, спричинену хлоридом кобальту (CoCl_2), - на щурячій SPS-моделі ПТСР, а їхні поведінкові ефекти оцінено разом з експресією HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , PACAP і PAI-1 у медіальній префронтальній корі (мПФК) та гіпокампі. Головний результат полягає в тому, що три види спричиняли виразно розбіжні наслідки попри частково перекривну транскрипційну сигнатуру, і що молекулярна та поведінкова PTSD-селективність не збігаються: лише ІНТ нормалізувала поведінковий фенотип травмованих тварин, тоді як найширшу PTSD-селективну молекулярну сигнатуру давала гіпобарична гіпоксія. Нижче ці результати обговорено в контексті наявної літератури.

5.1. Валідність SPS-моделі та поведінковий фенотип ПТСР

Модель single prolonged stress добре валідована для індукції тривожно-подібного фенотипу з надійними змінами індексів EPM і DLB за варіабельних ефектів в OFT [28, 85, 87, 105]. Наші неліковані ПТСР-тварини відтворили цей профіль: посилене завмирання та зменшене дослідження відкритих/освітлених просторів у EPM і DLB за відсутності значущих загальнолокомоторних змін в OFT (Розділ 3). Це підтверджує коректність відтворення моделі й створює надійний базис для оцінки ефектів гіпоксичних втручань.

На цьому тлі моделі гіпоксії поводитися принципово по-різному. CoCl_2 не покращував ПТСР-пов'язану поведінку в EPM чи OFT і навіть погіршував показники DLB через зменшення входів у світлу зону. Bar давав парціальний ефект: не покращував EPM чи OFT, але різко збільшував перебування у світлій зоні DLB навіть у нестресованих контролів - патерн, який радше узгоджується із сенсомоторними побічними ефектами перебування в камері, ніж зі справжнім анксиолізисом, з огляду на відому чутливість DLB до локомоторного та

дослідницького стану [20]. Слід зазначити, що загальну локомоторну активність в OFT для груп Var окремо не кількісно оцінювали, тож локомоторний внесок у збільшене перебування у світлій зоні DLB формально виключити не можна, що є обмеженням цієї інтерпретації. Натомість лише ІНТ знижувала завмирання в ЕРМ та OFT у ПТСР-тварин до рівнів, невідрізнюваних від контролю, і посилювала дослідження відкритих рукавів.

Такий патерн - виражений анксіоліз під дією ІНТ і слабші або несприятливі ефекти CoCl_2 та Var - узгоджується з уявленням про інтервальне гіпоксичне кондиціювання як стрес-протекторне втручання, ефективність якого залежить від циклічної структури, дози та інтенсивності гіпоксичного стимулу [25, 107, 138], а також із класичною концепцією загального адаптаційного синдрому Сельє, за якою сприятливий результат потребує патерну стимулу, що активує адаптивні, а не суто стресорні відповіді [134].

Варто наголосити на концептуальному значенні розбіжності між тестами. Те, що ЕРМ і DLB виявляють фенотип ПТСР, а OFT - ні, не є суперечністю, а відображає різну чутливість парадигм: ЕРМ і DLB цілеспрямовано протиставляють дослідницьку мотивацію аверсії до відкритих/освітлених просторів і тому чутливіші до тривожного компонента, тоді як OFT значною мірою індексує загальну локомоцію. Така дисоціація узгоджується з відомою варіабельністю ефектів SPS в OFT [87] і застерігає від інтерпретації будь-яких змін у DLB виключно як анксіолітичних без контролю локомоції - міркування, що є критичним для оцінки гіпобаричної гіпоксії.

Порівняння наших поведінкових результатів із даними інших дослідницьких груп, які використовували протокол тривалого однократного стресу (single prolonged stress, SPS), підтверджує високу відтворюваність моделі. Збільшення часу завмирання в піднесеному хрестоподібному лабіринті (elevated plus maze, ЕРМ) у 2,5 раза, зменшення входів у відкриті рукави та зниження кількості входів у світлу зону тесту «темно-світла камера» (dark-light box, DLB) відповідають патернам, описаним у численних публікаціях із використанням моделі тривалого однократного стресу на щурах-самцях різних ліній. Відсутність значущих змін у

тесті «відкрите поле» (open field test, OFT) також узгоджується з літературою, де цей тест демонструє найменшу чутливість до посттравматичного стресового розладу (ПТСР)-подібних змін серед стандартної батареї тестів тривожності.

Важливим аспектом інтерпретації є темпоральний фактор. Поведінкове тестування проводили на 7-му добу після моделі тривалого однократного стресу (single prolonged stress, SPS), що відповідає періоду стабілізації посттравматичного стресового розладу (ПТСР)-подібного фенотипу. Дослідження, що проводили тестування в ранніші терміни (1-3 доби після стресу), часто фіксували менш виражені або нестабільні зміни, тоді як тестування на 7-14 добу дає найбільш відтворюваний фенотип. Це відповідає клінічному спостереженню, згідно з яким діагноз посттравматичного стресового розладу ставиться не раніше ніж через місяць після травматичної події, коли симптоми консолідуються та стають стійкими.

Стан-залежність ефекту інтервального гіпоксичного тренування (ІНТ) - анксиолітичний у травмованих тварин і помірно анксиогенний або нейтральний у нестресованих - є одним із найважливіших результатів цього дослідження з точки зору потенційного клінічного застосування. У фармакології поняття «стан-залежності» (state-dependency) означає, що ефект втручання визначається початковим станом організму. Цей принцип добре відомий для анксиолітичних препаратів класу бензодіазепінів, які чинять більш виражений ефект у тривожних пацієнтів порівняно зі здоровими добровольцями. Однак для нефармакологічних втручань, таких як інтервальне гіпоксичне тренування, стан-залежність документована значно менше, і наші дані є одними з перших, що демонструють цей феномен у контексті моделювання посттравматичного стресового розладу.

5.2. Регіон-специфічна активація HIF при ПТСР

Молекулярні дані виявили регіон-специфічний патерн базальної активації HIF у нелікованих ПТСР-тварин: HIF-1 α , HIF-2 α та HIF-3 α мали тенденцію до підвищення відносно контролю в гіпокампі, але не в мПФК, що свідчить про

більшу чутливість гіпокампа до гіпоксія-залежного компонента посттравматичної адаптації. Найвиразнішою базальною знахідкою було значуще підвищення гіпокампальних HIF-1 α та HIF-2 α (обидві ізоформи зростали приблизно вдвічі відносно контролю), тоді як у мПФК значущих змін не спостерігали. Оскільки абсолютні рівні відносної експресії різних генів не є прямо зіставними, подальшу інтерпретацію ми зосереджуємо на функціональній ролі кожної ізоформи, а не на порівнянні їхніх «сирих» значень.

Ми інтерпретуємо це як свідчення того, що хронічний травматичний стрес індукує гіпокампальний псевдогіпоксичний стан - можливо, через катехоламін-зумовлену мітохондріальну дисфункцію [154], нейрозапалення або окисний стрес, - який переважно активує HIF-2 α . Хоча HIF-1 α вивчено в контексті стресу значно ширше [24, 171], HIF-2 α має відмінні функції в еритропоезі, антиоксидантному захисті та судинному ремоделюванні [121, 131, 152], і його стійке підвищення в нелікованому ПТСР радше узгоджується з дезадаптивною, ніж із протекторною сигналізацією. Усі три втручання знижували гіпокампальний HIF-2 α відносно нелікованого ПТСР, причому найглибшу супресію спостерігали під дією ІНТ і CoCl_2 , тоді як тварини Bar зберігали суттєво вищий залишковий HIF-2 α - що вказує: саме модальність гіпоксії, а не лише її наявність, формує поствтручальний рівень HIF-2 α .

Значуще підвищення HIF-2 α у гіпокампі нелікованих ПТСР-тварин заслуговує на окрему увагу з огляду на функціональні відмінності ізоформ. HIF-2 α (EPAS1) має критичне значення для катехоламінового гомеостазу [154] та регулює еритропоез, антиоксидантний захист і судинне ремоделювання [121, 131, 152]. Його стійке підвищення радше свідчить про тривалий, дезадаптивний характер гіпоксія-подібної сигналізації, ніж про коротку адаптивну відповідь, типову для HIF-1 α . Це узгоджується з уявленням про катехоламін-зумовлену мітохондріальну дисфункцію як можливий тригер псевдогіпоксичного стану в травмованому гіпокампі.

Регіональна специфічність (гіпокамп проти мПФК) має й анатомо-функціональне підґрунтя. Гіпокамп багатий на глюкокортикоїдні рецептори,

характеризується високою метаболічною активністю та вираженою пластичністю, що робить його особливо чутливим до стрес-індукованого окисного й метаболічного навантаження. Це пояснює, чому саме тут гіпоксія-чутлива транскрипційна програма активується першою, і підтримує інтерпретацію гіпокампа як основної мішені досліджуваних втручань.

Концепція «псевдогіпоксичного стану», запропонована для інтерпретації підвищення факторів, що індукуються гіпоксією (HIF), у гіпокампі при посттравматичному стресовому розладі (ПТСР), заслуговує на детальне обговорення. У класичному розумінні фактори, що індукуються гіпоксією, активуються внаслідок зниження парціального тиску кисню в тканині. Однак численні дослідження останніх двох десятиліть показали, що стабілізація альфа-субодиниць факторів, що індукуються гіпоксією, може відбуватися за нормоксичних умов внаслідок інших стимулів: нейрозапалення через активацію ядерного фактора каппа-Бі (NF- κ B), окисного стресу через продукцію активних форм кисню мітохондріями, метаболічних порушень через зміни концентрації метаболітів циклу трикарбонових кислот. Усі ці механізми документовані при хронічному стресі та в моделях посттравматичного стресового розладу, що робить гіпотезу псевдогіпоксичного стану біологічно обґрунтованою.

Механізм, що лежить в основі регіон-специфічної активації факторів, що індукуються гіпоксією (HIF), може включати кілька не взаємовиключних компонентів. По-перше, гіпокамп характеризується високою щільністю глюкокортикоїдних рецепторів, що робить його особливо чутливим до стрес-індукованого підвищення кортикостерону (основного глюкокортикоїду у гризунів). Хронічна експозиція до підвищених рівнів глюкокортикоїдів індукує мітохондріальну дисфункцію та підвищену продукцію активних форм кисню в нейронах гіпокампа, що може стабілізувати фактори, що індукуються гіпоксією, через інгібування пролілгідроксилаз. По-друге, гіпокамп має виражену васкуляризацію та високу метаболічну активність, що робить його вразливим до навіть незначних порушень мікроциркуляції, які можуть виникати внаслідок стрес-індукованих змін тонуусу судин.

По-третє, нейрозапалення, що супроводжує хронічний стрес, може активувати транскрипцію гена фактора, що індукується гіпоксією 1-го типу (HIF1A), через ядерний фактор каппа-Бі (NF-κB)-залежний механізм. Промотор гена HIF1A містить функціональні сайти зв'язування ядерного фактора каппа-Бі, і прозапальні цитокіни (зокрема фактор некрозу пухлин альфа, TNF-α, та інтерлейкін-1бета, IL-1β) здатні підвищувати транскрипцію фактора, що індукується гіпоксією 1-го типу, за нормоксичних умов. Враховуючи, що нейрозапалення в гіпокампі є добре документованим наслідком моделі тривалого однократного стресу (single prolonged stress, SPS), цей механізм може суттєво сприяти спостережуваному підвищенню матричної рибонуклеїнової кислоти (мРНК) факторів, що індукуються гіпоксією.

Підвищення рівня фактора, що індукується гіпоксією 2-го типу (HIF-2α, або EPAS1), у гіпокампі нелікованих тварин із посттравматичним стресовим розладом (ПТСР) є особливо значущим результатом, оскільки ця ізоформа відіграє специфічну роль у катехоламіновому гомеостазі та нейропротекції. Фактор, що індукується гіпоксією 2-го типу, є критичним регулятором ферменту тирозингідроксилази - швидкість-лімітуючого ферменту синтезу катехоламінів (дофаміну, норадреналіну, адреналіну). Підвищення його експресії в гіпокампі при посттравматичному стресовому розладі може відображати компенсаторну відповідь на стрес-індуковане виснаження катехоламінових запасів або, навпаки, сприяти надмірній катехоламінієрگیчній сигналізації, що є характерною ознакою посттравматичного стресового розладу.

5.3. Ефекти різних видів гіпоксії

HIF-1α пригнічувався всіма видами гіпоксії в обох ділянках. Хоча ІНТ давала найглибшу загальну супресію ізоформ HIF, значущу PTSD-селективну відмінність для HIF-1α зафіксовано лише за гіпобаричної гіпоксії й лише в гіпокампі. Те, що гіпоксичний стимул знижує мРНК HIF-1α, може видатися контрінтуїтивним, проте мРНК HIF-1α не регулюється киснем безпосередньо на транскрипційному рівні

[62], а хронічна чи кондиціонувальна гіпоксична експозиція здатна пригнічувати HIF-1 α через негативний зворотний зв'язок за участі HIF-3 α та інших регуляторів [46]. Упродовж 14-денного протоколу виявлена «супресія» відображає адаптивну установчу точку: за ІНТ і Bar білок HIF-1 α транзиторно стабілізується, а система знижує власний пул транскрипту за зворотним зв'язком; за CoCl₂ стійко стабілізований білок HIF-1 α запускає інгібування транскрипції HIF1A [40, 146]. Тому низький сигнал мРНК HIF1A за CoCl₂ не означає малої функціональної відповіді HIF і навіть може свідчити про протилежне.

Із сукупних даних постають дві осі варіації. Перша - глибина абсолютної супресії ізоформ HIF і PAI-1, найбільша за ІНТ, що узгоджується з активним залученням петлі негативного зворотного зв'язку HIF за умов повторюваної циклічної оксигенації. Друга - PTSD-селективність ефектів, яка практично відсутня за CoCl₂, найширша за Bar (HIF-1 α у гіпокампі, HIF-2 α , HIF-3 α і PACAP в обох ділянках) і обмежена переважно HIF-3 α за ІНТ. Показово, що ці дві осі не збігаються: вид із найглибшою абсолютною супресією (ІНТ) не є видом із найширшою молекулярною PTSD-селективністю (Bar). Поведінкові дані додають третю розбіжність - послідовне поведінкове покращення забезпечив лише ІНТ. Це підтримує інтерпретацію, що ефект гіпоксичного кондиціювання залежить не від самої активації чи глибини супресії HIF, а від дози, інтенсивності та часової структури стимулу [25, 107, 137].

Контрінтуїтивне зниження мРНК HIF-1 α під дією гіпоксичних впливів має чітке молекулярне пояснення. Транскрипція HIF1A не регулюється киснем безпосередньо [62], а підлягає негативному зворотному зв'язку за участі HIF-3 α та інших регуляторів [46, 91]. За стійкої стабілізації білка - чи то фармакологічної (CoCl₂), чи то внаслідок повторюваної гіпоксії - система знижує власний транскрипт, тож рівень мРНК відображає установчу точку петлі зворотного зв'язку, а не функціональну активність HIF [40, 146]. Це принципово для коректної інтерпретації qPCR-даних і застерігає від ототожнення низького транскрипту з малою відповіддю HIF.

Принцип «дозозалежності» гіпоксії є ключовим для розуміння різних ефектів трьох досліджуваних видів. Інтервальне гіпоксичне тренування (ІНТ) є класичним прикладом адаптивного гіпоксичного кондиціювання: циклічне чергування помірної гіпоксії (12% кисню) та нормоксії протягом 14 днів індукує каскад адаптивних механізмів, включаючи підвищення антиоксидантного захисту, стабілізацію мітохондріальної функції та модуляцію нейротрофічних факторів. Гіпобарична гіпоксія (Bar), хоча і забезпечує подібний рівень зниження парціального тиску кисню, діє безперервно протягом двогодинного сеансу, що може активувати дещо інший набір адаптивних програм. Хімічна гіпоксія, спричинена хлоридом кобальту (CoCl_2), фундаментально відрізняється від обох інгаляційних моделей: вона стабілізує фактори, що індукуються гіпоксією, фармакологічно, міняючи фізіологічний кисневий сенсинг, і може індукувати додаткові ефекти, пов'язані з токсичністю іонів кобальту.

Дві осі варіації, що постають із сукупних молекулярних даних, мають важливе теоретичне значення. Перша вісь - глибина абсолютної супресії транскриптів - відображає загальну інтенсивність активації петлі негативного зворотного зв'язку в системі факторів, що індукуються гіпоксією. Інтервальне гіпоксичне тренування (ІНТ) забезпечує найглибшу супресію, ймовірно, завдяки циклічному характеру стимуляції, що підтримує активність цієї петлі протягом тривалого часу. Друга вісь - стан-залежна, що індукується посттравматичним стресовим розладом (ПТСР), селективність - відображає здатність втручання диференціально впливати на травмований і нетравмований мозок. Ця селективність найбільш виражена для фактора, що індукується гіпоксією 3-го типу (HIF-3 α), під дією інтервального гіпоксичного тренування та гіпобаричної гіпоксії (Bar), і практично відсутня для інгібітора активатора плазміногену 1-го типу (PAI-1).

Відсутність стан-залежної селективності для інгібітора активатора плазміногену 1-го типу (PAI-1) при одночасній наявності такої селективності для факторів, що індукуються гіпоксією 3-го типу (HIF-3 α), вказує на те, що ці молекули регулюються різними механізмами в контексті гіпоксичного втручання. Інгібітор активатора плазміногену 1-го типу (PAI-1) є серпіновим протеазним

інгібітором, регуляція якого залежить від багатьох сигнальних шляхів, включаючи трансформуючий фактор росту бета (TGF- β), тромбін та запальні медіатори. Гіпоксія пригнічує його транскрипцію, ймовірно, через непрямі механізми, які не є специфічними для попереднього стресового стану організму. Натомість фактор, що індукується гіпоксією 3-го типу (HIF-3 α), є прямою мішенню транскрипційної програми факторів, що індукуються гіпоксією (зокрема, промотор гена HIF3A містить елементи відповіді на гіпоксію, HRE), і його стан-залежна регуляція може відображати різний базовий рівень активності системи факторів, що індукуються гіпоксією, у травмованому та нетравмованому мозку.

Важливим доповненням до порівняльного аналізу різних гіпоксичних протоколів є нещодавнє дослідження Serebrovska та співавторів (2025), у якому було застосовано інтервальне гіпоксично-гіпероксичне тренування (intermittent hypoxia-hyperoxia training, ІННТ) на щурячій моделі хвороби Альцгеймера. На відміну від використаного в нашій роботі інтервального гіпоксичного тренування (ІНТ), де гіпоксичні фази чергуються з нормоксією, протокол ІННТ включає фази гіпероксії (35-40% кисню) після кожної гіпоксичної фази. Serebrovska et al. [141] продемонстрували, що ІННТ значно покращує просторове навчання та пам'ять у щурів із індукованою хворобою Альцгеймера, причому цей ефект був пов'язаний зі зниженням нейрозапалення в гіпокампі. Порівняння наших результатів із цими даними дозволяє припустити, що додавання гіпероксичної фази може потенційно посилювати нейропротекторний ефект інтервальної гіпоксії, оскільки гіпероксія сприяє посиленню антиоксидантних механізмів та прискорює відновлення після гіпоксичного епізоду. Цей аспект є особливо релевантним для нашого дослідження, оскільки як посттравматичний стресовий розлад (ПТСР), так і хвороба Альцгеймера характеризуються нейрозапаленням та порушенням синаптичної пластичності в гіпокампі, що вказує на можливість спільних молекулярних механізмів терапевтичної дії інтервальних гіпоксичних впливів.

5.4. Роль окремих молекул: HIF-3 α , PACAP і PAI-1

HIF-3 α продемонстрував один із найпослідовніших PTSD-селективних ефектів серед усіх маркерів. Значущу відмінність у межах втручання ПТСР vs Контроль давали і ІНТ, і Ваг в обох ділянках (мПФК і гіпокамп) - але ніколи CoCl₂. Оскільки HIF-3 α частково є негативним регулятором HIF-1 α і HIF-2 α [91], його переважна супресія у травмованих тварин за ІНТ і Ваг може відображати змінену зворотну регуляцію системи HIF після циклічної та тривалої гіпоксичної експозиції відповідно. Відсутність цього ефекту за CoCl₂ може свідчити, що системні та вентиляційні компоненти, рекрутовані інгаляційними впливами, впливають на динаміку HIF-3 α у ПТСР-мозку інакше, ніж пряме інгібування PHD [118, 119, 120].

PACAP пригнічувався всіма трьома втручаннями в обох ділянках з одним помітним винятком: тварини Контроль+Ваг зберігали виразно підвищений PACAP, особливо в гіпокампі, тоді як ПТСР+Ваг показували супресію до рівня інших лікованих груп. Цієї дисоціації не спостерігали для ІНТ чи CoCl₂, які пригнічували PACAP рівномірно незалежно від статусу травми. PACAP - нейропептид, причетний до стресу, страху й травми [58, 122, 125, 147, 157], і травма-залежна нездатність зберегти Ваг-індуковане підвищення PACAP у гіпокампі вказує, що попередній ПТСР перебудовує гіпокампальну нейропептидну відповідь на гіпобаричну гіпоксію. Негативна кореляція між гіпокампальним PACAP і локомоторною активністю на груповому рівні узгоджується з ширшою літературою, що пов'язує стійке підвищення PACAP із пасивними, страх-зумовленими поведінковими станами.

PAI-1 послідовно й значуще пригнічувався всіма трьома втручаннями в обох ділянках без PTSD-селективної різниці у межах втручання. Напрямо цього ефекту узгоджується з нейропротекторною інтерпретацією, оскільки знижений PAI-1 має сприяти tPA-опосередкованому розщепленню proBDNF і нижчележачій сигналізації BDNF [115]. Проте ця рівномірна супресія не супроводжувалася поведінковим покращенням у тварин CoCl₂ чи Ваг, що свідчить: саме лише зниження PAI-1 не є детермінантою поведінкового відновлення в цій моделі, а його

функціональні наслідки залежать від ширшого молекулярного контексту, сформованого кожним втручанням.

Динаміка PAI-1 показує, що один молекулярний маркер сам по собі не визначає поведінкового результату: усі три впливи однаково знижували цей транскрипт, але поведінка покращилася лише після ІНТ. Напрям зміни PAI-1 відповідає пронейротрофічній інтерпретації [115], проте кінцевий результат залежить від решти молекулярного контексту - співвідношення ізоформ HIF, стану PACAP-системи та ланки BDNF-TrkB, яку в цій роботі не вимірювали.

Сукупність даних щодо PACAP (рівномірна супресія за ІНТ і CoCl_2 проти травма-залежної дисоціації за Bar) добре вписується в уявлення про PACAP як майстер-регулятор нейроендокринних стрес-контурів і клітинної стрес-відповіді [58, 147]. Із клінічного погляду, причетність системи PACAP-PAC1 до ПТСР [122, 125] робить виявлену регіон- і травма-залежну модуляцію PACAP гіпоксією особливо цікавою для подальшого дослідження як потенційного механізму стан-залежної дії ІНТ.

Роль поліпептиду, що активує аденілатциклазу гіпофіза (PACAP), як молекулярного інтегратора стрес-відповіді та гіпоксичного сигналіngu потребує окремого аналізу. Поліпептид, що активує аденілатциклазу гіпофіза (PACAP), є плейотропним нейропептидом, що регулює нейроендокринні функції, нейропротекцію, нейрозапалення та синаптичну пластичність через декілька рецепторних систем (PAC1, VPAC1, VPAC2). У контексті посттравматичного стресового розладу (ПТСР) поліпептид, що активує аденілатциклазу гіпофіза, привертає особливу увагу завдяки його ролі у формуванні та консолідації пам'яті страху. Генетичні дослідження на людях показали, що поліморфізм у локусі рецептора PAC1 (ген ADCYAP1R1) асоціюється з підвищеним ризиком розвитку посттравматичного стресового розладу, особливо у жінок, що підкреслює клінічну релевантність цієї системи.

Дисоціація ефекту гіпобаричної гіпоксії (Bar) на поліпептид, що активує аденілатциклазу гіпофіза (PACAP), між контрольними та травмованими тваринами є одним із найінтригуючих результатів дослідження. Тварини Контроль +

гіпобарична гіпоксія зберігали підвищений рівень поліпептиду, що активує аденілатциклазу гіпофіза (PACAP), тоді як тварини посттравматичний стресовий розлад (ПТСР) + гіпобарична гіпоксія демонстрували його супресію. Ця дисоціація вказує на те, що попередній травматичний стрес докорінно змінює реакцію нейропептидної системи на гіпобаричний гіпоксичний вплив. Одним з можливих пояснень є те, що стрес-індукована сенситизація поліпептиду, що активує аденілатциклазу гіпофіза (PACAP)-рецепторних шляхів у травмованому мозку посилює негативний зворотний зв'язок на рівні транскрипції гена ADCYAP1 (що кодує поліпептид, що активує аденілатциклазу гіпофіза) при подальшому гіпоксичному стимулі.

Інгібітор активатора плазміногену 1-го типу (PAI-1) займає центральне місце в запропонованій молекулярній моделі через його роль у регуляції дозрівання нейротрофічного фактора мозку (brain-derived neurotrophic factor, BDNF). Послідовна та глибока супресія інгібітора активатора плазміногену 1-го типу (PAI-1) під дією усіх трьох гіпоксичних впливів у обох ділянках мозку свідчить про те, що гіпоксичні втручання потенційно можуть полегшувати протеолітичне дозрівання нейротрофічного фактора мозку (BDNF) через зниження блокади тканинного активатора плазміногену (tPA). Однак той факт, що поведінка покращилася лише після інтервального гіпоксичного тренування (ІНТ), а не після хлориду кобальту (CoCl_2) або гіпобаричної гіпоксії (Bar), демонструє, що зниження інгібітора активатора плазміногену 1-го типу (PAI-1) є необхідною, але не достатньою умовою для покращення посттравматичного стресового розладу (ПТСР)-подібної поведінки. Мабуть, потрібна одночасна модуляція кількох молекулярних вузлів - факторів, що індукуються гіпоксією (HIF), поліпептиду, що активує аденілатциклазу гіпофіза (PACAP), та інгібітора активатора плазміногену 1-го типу (PAI-1) - у специфічному напрямку та з певною глибиною, щоб досягти поведінкового ефекту.

5.5. Молекулярно-поведінкові зв'язки

Щоб перевірити, чи пов'язані молекулярні зміни з поведінковими, ми зіставили групові середні експресії генів із груповими середніми поведінкових показників (кореляція Спірмена по семи групах). Виявилося, що найсильніші зв'язки стосуються лише двох поведінкових параметрів. Перший - час, проведений у центрі «відкритого поля»: чим сильніше гіпоксія пригнічувала HIF-2 α і HIF-3 α у корі та гіпокампі, тим менше часу тварини проводили в центрі арени. Другий - кількість входів у світлу зону «темно-світлої камери»: чим нижчими були гіпокампальні HIF-1 α і PACAP, тим частіше тварини заходили в освітлений відсік. Коефіцієнти кореляції для різних генів щодо одного й того самого показника виявилися майже однаковими. Це означає, що йдеться не про вплив кожного гена окремо, а про спільну «вісь» гіпоксичної супресії: усі досліджувані транскрипти змінюються узгоджено, тому статистично їх важко розрізнити. Ці результати варто розглядати як такі, що формують гіпотези, а не доводять їх: кожна кореляція побудована лише на семи групових середніх і чутлива до окремих груп із крайніми значеннями. Для механістичних висновків потрібне повторення аналізу на рівні окремих тварин у більшій вибірці.

Виявлені кореляції між рівнем супресії транскриптів факторів, що індукуються гіпоксією (HIF), у медіальній префронтальній корі (мПФК) та часом у центрі тесту «відкрите поле» (open field test, OFT) мають цікаву інтерпретацію з точки зору нейробіології тривожності. Час у центрі арени в тесті «відкрите поле» є індикатором балансу між дослідницькою мотивацією та тривожністю, і його позитивна кореляція з рівнем кортикального фактора, що індукується гіпоксією 2-го типу (HIF-2 α), та фактора, що індукується гіпоксією 3-го типу (HIF-3 α), свідчить про те, що групи з глибшою супресією цих транскриптів у медіальній префронтальній корі проводять менше часу в центрі. Оскільки медіальна префронтальна кора забезпечує низхідний контроль над мигдалиною та іншими

структурами, що генерують реакції страху, зміни в гіпоксія-чутливій транскрипційній програмі кори можуть впливати на ефективність цього контролю.

Негативна кореляція між гіпокампульними рівнями фактора, що індукується гіпоксією 1-го типу (HIF-1 α), та поліпептиду, що активує аденілатциклазу гіпофіза (PACAP), з кількістю входів у світлу зону тесту «темно-світла камера» (dark-light box, DLB) доповнює картину: групи з нижчими рівнями цих транскриптів у гіпокампі демонстрували більшу готовність досліджувати освітлений простір. Ця кореляція є біологічно правдоподібною, оскільки гіпокамп забезпечує контекстуальне оброблення інформації про середовище, і зміни в його молекулярному профілі можуть впливати на оцінку безпечності контексту та, відповідно, на прийняття рішень про дослідження потенційно загрозливого простору.

5.6. Інтегративна молекулярна модель взаємодії гіпоксії та посттравматичного стресового розладу

Сукупність отриманих даних дозволяє запропонувати інтегративну модель, що пояснює різну ефективність трьох видів гіпоксії в модуляції посттравматичного стресового розладу (ПТСР)-подібного фенотипу. Центральним елементом цієї моделі є уявлення про те, що посттравматичний стресовий розлад супроводжується формуванням псевдогіпоксичного стану в гіпокампі, який характеризується підвищенням експресії фактора, що індукується гіпоксією 1-го типу (HIF-1 α), та фактора, що індукується гіпоксією 2-го типу (HIF-2 α), за відсутності реального дефіциту кисню. Цей стан підтримується стрес-індукованим нейрозапаленням, окисним стресом і мітохондріальною дисфункцією, які інгібують активність пролілгідроксилаз і стабілізують альфа-субодиниці факторів, що індукуються гіпоксією.

Інтервальне гіпоксичне тренування (ІНТ) може «перезавантажувати» цю дисрегульовану систему через механізм адаптивного кондиціонування. Циклічне чергування помірної гіпоксії та нормоксії протягом 14 днів активує фізіологічну

петлю негативного зворотного зв'язку: первинна стабілізація факторів, що індукуються гіпоксією, під час гіпоксичних фаз індукує підвищення експресії пролілгідроксилаз (зокрема PHD2 і PHD3) та потенційно інгібуючих сплайс-варіантів фактора, що індукується гіпоксією 3-го типу (HIF-3 α), що забезпечує посилений кліренс факторів, що індукуються гіпоксією, під час нормоксичних фаз. Кумулятивний результат 14 днів такого тренування - зниження базового рівня транскриптів факторів, що індукуються гіпоксією, що і фіксується в нашому кількісному аналізі полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (RT-qPCR).

Хімічна гіпоксія, спричинена хлоридом кобальту (CoCl₂), не здатна запустити цей адаптивний каскад, оскільки вона стабілізує фактори, що індукуються гіпоксією, фармакологічно, минаючи кисневий сенсинг, і не створює циклічної стимуляції, необхідної для активації петлі негативного зворотного зв'язку. Крім того, хлорид кобальту має додаткові токсичні ефекти, не пов'язані з системою факторів, що індукуються гіпоксією: генерація активних форм кисню через реакцію Фентона, пряме пошкодження мітохондрій та індукція запальних каскадів. Ці ефекти можуть посилювати вже наявний стрес-індукований псевдогіпоксичний стан замість його корекції, що пояснює відсутність поведінкового покращення або навіть погіршення деяких показників у групах із хлоридом кобальту (CoCl₂).

Гіпобарична гіпоксія (Bar) займає проміжне положення: вона активує фізіологічний кисневий сенсинг, але безперервний характер експозиції не забезпечує такої ж ефективної активації петлі негативного зворотного зв'язку, як циклічне інтервальне гіпоксичне тренування. Крім того, додатковий фактор зниженого атмосферного тиску може чинити самостійні нейрофізіологічні ефекти, зокрема через активацію хеморецепторів каротидного тіла та зміни церебральної гемодинаміки. Ці особливості можуть пояснювати часткову ефективність гіпобаричної гіпоксії (Bar) у деяких поведінкових тестах (зокрема, в тесті «темно-світла камера», dark-light box, DLB), але відсутність стійкого ефекту, порівнянного з інтервальним гіпоксичним тренуванням (ІНТ).

Запропонована модель передбачає, що ключовим фактором терапевтичної ефективності є не абсолютна глибина активації системи факторів, що індукуються

гіпоксією, а спосіб цієї активації - циклічний проти безперервного, фізіологічний проти фармакологічного. Ця теза узгоджується з концепцією «гормезису» - адаптивної відповіді організму на помірний стрес, яка реалізується найбільш ефективно при циклічному впливі, що дає організму час для відновлення та консолідації адаптивних механізмів між стимулами.

Додатковим аргументом на користь запропонованої інтегративної моделі є результати дослідження Serebrovska et al. [141], які показали, що інтервальне гіпоксично-гіпероксичне тренування (ІННТ) знижує рівні прозапальних маркерів у гіпокампі щурів із моделлю хвороби Альцгеймера. Ці дані підтримують нашу гіпотезу про те, що нейрозапалення є ключовим компонентом псевдогіпоксичного стану, який формується в гіпокампі при нейропсихіатричних та нейродегенеративних захворюваннях. Якщо інтервальна гіпоксія (у формі ІНТ або ІННТ) здатна нормалізувати нейрозапальний профіль як при посттравматичному стресовому розладі (ПТСР), так і при хворобі Альцгеймера, це вказує на існування спільного молекулярного вузла, через який циклічна гіпоксія реалізує свій терапевтичний потенціал. Таким вузлом, вірогідно, є взаємодія між системою факторів, що індукуються гіпоксією (HIF), та ядерним фактором каппа-Бі (NF-κB)-залежним запальним каскадом, оскільки обидва сигнальні шляхи регулюються пролілгідроксилазами, активність яких модулюється циклічною гіпоксією.

5.7. Обмеження дослідження

Попри комплексний дизайн, дослідження має ряд обмежень, які слід враховувати при інтерпретації результатів. По-перше, молекулярний аналіз обмежений рівнем матричної рибонуклеїнової кислоти (мРНК) і не включає оцінку білкових рівнів факторів, що індукуються гіпоксією (HIF), поліпептиду, що активує аденілатциклазу гіпофіза (PACAP), та інгібітора активатора плазміногену 1-го типу (PAI-1). Оскільки регуляція системи факторів, що індукуються гіпоксією, відбувається переважно на посттрансляційному рівні (стабільність білка, а не транскрипція), рівні матричної рибонуклеїнової кислоти не завжди відображають

функціональну активність системи. Зокрема, зниження рівня матричної рибонуклеїнової кислоти фактора, що індукується гіпоксією 1-го типу (HIF-1 α), під дією гіпоксичних втручань може супроводжуватися підвищенням рівня білка HIF-1 α за рахунок його стабілізації, що створює парадоксальну ситуацію: зниження транскрипту при підвищенні функціональної активності.

По-друге, використання лише самців обмежує генералізацію результатів на обидві статі. Клінічні дані свідчать про значні статеві відмінності як у ризику розвитку посттравматичного стресового розладу (ПТСР), так і в його молекулярних механізмах. Зокрема, поліморфізм гена рецептора поліпептиду, що активує аденілатциклазу гіпофіза (PAC1, ген ADCYAP1R1), асоціюється з ризиком посттравматичного стресового розладу переважно у жінок, що вказує на естроген-залежну модуляцію цього сигнального шляху. Крім того, естрогенові рецептори можуть взаємодіяти з промоторами генів факторів, що індукуються гіпоксією, модулюючи їхню транскрипцію. Тому результати цього дослідження безпосередньо застосовні лише до самців, і екстраполяція на самиць потребує окремої експериментальної перевірки.

По-третє, дослідження проведено в єдиній часовій точці (7 діб після моделі тривалого однократного стресу, single prolonged stress, SPS), що не дозволяє оцінити динаміку молекулярних змін у часі. Фактори, що індукуються гіпоксією, характеризуються складною часовою динамікою: фактор, що індукується гіпоксією 1-го типу (HIF-1 α), домінує в гострій фазі відповіді (хвилини-години), тоді як фактор, що індукується гіпоксією 2-го типу (HIF-2 α), - у хронічній (дні-тижні). Дослідження з декількома часовими точками (наприклад, 1, 3, 7, 14 і 28 діб після стресу) могло б виявити динамічні зміни в активації різних ізоформ та їхню кореляцію з розвитком і стабілізацією поведінкового фенотипу.

По-четверте, кореляційний аналіз проведено на рівні групових середніх ($n = 7$ точок), що обмежує його статистичну потужність і не дозволяє робити висновки на рівні індивідуальних тварин. Аналіз на індивідуальному рівні потребував би значно більших розмірів вибірок для кожної групи. По-п'яте, дослідження не включало прямого вимірювання нейротрофічного фактора мозку (brain-derived

neurotrophic factor, BDNF) або активності тканинного активатора плазміногену (tPA), які є кінцевими ефекторами запропонованої молекулярної моделі. Включення цих маркерів могло б забезпечити повнішу картину молекулярного каскаду, через який гіпоксичні втручання впливають на поведінку.

По-шосте, вибір β -актину (Actb) як єдиного референсного гена, хоча і обґрунтований стабільністю його експресії в досліджуваних умовах, є обмеженням. Сучасні рекомендації пропонують використання двох або більше референсних генів із валідацією їхньої стабільності за допомогою спеціалізованих алгоритмів (geNorm, NormFinder). Нарешті, слід зауважити, що модель тривалого однократного стресу (single prolonged stress, SPS), як і будь-яка тваринна модель психічного розладу, має обмежену конструктну валідність: вона відтворює окремі аспекти посттравматичного стресового розладу (ПТСР) (тривожність, порушення згасання страху), але не може моделювати повний спектр клінічних симптомів, включаючи повторне переживання травми, когнітивні порушення та дисоціативні симптоми.

5.8. Перспективи подальших досліджень та клінічне значення

Результати дослідження відкривають кілька перспективних напрямків для подальших робіт. Першочерговим є підтвердження молекулярних знахідок на білковому рівні за допомогою вестерн-блотингу або імуногістохімії. Особливо важливим є визначення рівнів білка фактора, що індукується гіпоксією 1-го типу (HIF-1 α), та фактора, що індукується гіпоксією 2-го типу (HIF-2 α), у гіпокампі, оскільки, як зазначено вище, рівні матричної рибонуклеїнової кислоти (мРНК) не завжди відображають рівні відповідних білків у системі факторів, що індукуються гіпоксією. Імуногістохімічний аналіз із клітинною роздільністю дозволив би визначити, у яких саме типах клітин (нейронах, астроцитах, мікроглії) відбувається активація гіпоксія-чутливої програми при посттравматичному стресовому розладі (ПТСР) та після гіпоксичних втручань.

Другим важливим напрямком є розширення панелі молекулярних мішеней. Включення нейротрофічного фактора мозку (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), його попередника (proBDNF), тканинного активатора плазміногену (tPA) та плазміногену дозволило б перевірити запропоновану модель повного каскаду від факторів, що індукуються гіпоксією (HIF), через поліпептид, що активує аденілатциклазу гіпофіза (PACAP), та інгібітор активатора плазміногену 1-го типу (PAI-1) до дозрівання нейротрофічного фактора мозку (BDNF). Крім того, доцільно включити маркери нейрозапалення (інтерлейкін-1 β , IL-1 β ; інтерлейкін-6, IL-6; фактор некрозу пухлин альфа, TNF- α), окисного стресу (супероксиддисмутаза, каталаза) та апоптозу (каспаза-3, Bcl-2) для характеристики ширшого молекулярного контексту ефектів гіпоксії.

Третій напрямок стосується оптимізації протоколу інтервального гіпоксичного тренування (ІНТ). У нашому дослідженні використано один конкретний протокол (12% кисню, 4 цикли по 15 хвилин, 14 днів), але параметричний простір інтервального гіпоксичного тренування є значно ширшим. Варіювання концентрації кисню (від 16% до 8%), тривалості та кількості циклів, загальної тривалості курсу та часу початку лікування відносно травматичної події дозволило б визначити оптимальний «терапевтичний протокол» і краще зрозуміти дозозалежність ефекту. Особливо важливим є визначення мінімально ефективної дози, оскільки це має пряме значення для потенційного клінічного застосування.

У контексті оптимізації протоколу особливу увагу заслуговує модифікація інтервального гіпоксичного тренування (ІНТ) шляхом додавання гіпероксичних фаз, тобто перехід до інтервального гіпоксично-гіпероксичного тренування (ІННТ). Як було показано Serebrovska et al. [141], ІННТ забезпечує виражений нейропротекторний ефект на моделі хвороби Альцгеймера у щурів, покращуючи когнітивні функції та знижуючи нейрозапалення в гіпокампі. Враховуючи, що в нашому дослідженні інтервальне гіпоксичне тренування (ІНТ) продемонструвало найбільшу ефективність серед трьох видів гіпоксії, додавання гіпероксичної фази потенційно може посилити цей ефект за рахунок додаткової стимуляції антиоксидантних систем та більш ефективного відновлення між гіпоксичними

епізодами. Порівняльне дослідження ІНТ та ІННТ на моделі тривалого однократного стресу (single prolonged stress, SPS) із паралельним аналізом експресії факторів, що індукуються гіпоксією (HIF), поліпептиду, що активує аденілатциклазу гіпофіза (PACAP), та інгібітора активатора плазміногену 1-го типу (PAI-1) є логічним наступним кроком, який дозволив би визначити оптимальну стратегію гіпоксичного кондиціювання для корекції посттравматичного стресового розладу (ПТСР)-подібного фенотипу.

Четвертий напрямок передбачає дослідження статевих відмінностей. Включення самиць із урахуванням фази естрального циклу дозволило б оцінити, чи є ефект інтервального гіпоксичного тренування (ІНТ) стать-залежним, що має критичне значення для трансляційного потенціалу, зважаючи на більшу поширеність посттравматичного стресового розладу (ПТСР) серед жінок. Крім того, дослідження впливу гіпоксичних втручань на експресію рецепторів поліпептиду, що активує аденілатциклазу гіпофіза (PAC1, VPAC1, VPAC2), могло б пояснити механізми статевих відмінностей у чутливості до посттравматичного стресового розладу.

П'ятий, трансляційний напрямок стосується переходу від тваринних моделей до клінічних досліджень. Інтервальне гіпоксичне тренування (ІНТ) вже застосовується в клінічній практиці для реабілітації пацієнтів з кардіоваскулярними захворюваннями, хронічними обструктивними захворюваннями легень та наслідками COVID-19. Безпечність і переносимість цього методу для цих категорій пацієнтів добре документовані. Тому проведення пілотного клінічного дослідження ефективності інтервального гіпоксичного тренування у пацієнтів із посттравматичним стресовим розладом (ПТСР) є реалістичною перспективою, яка може бути реалізована з використанням наявного обладнання та протоколів. Такі дослідження мають особливу актуальність для України, де великий контингент осіб із бойовим посттравматичним стресовим розладом потребує доступних і ефективних методів реабілітації.

Нарешті, шостий напрямок стосується вивчення епігенетичних механізмів. Фактори, що індукуються гіпоксією, регулюють активність численних

епігенетичних модифікаторів, включаючи деметилази гістонів та метилтрансферази дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК). Дослідження змін у патернах метилування дезоксирибонуклеїнової кислоти та модифікаціях хроматину в промоторних ділянках генів-мішеней після інтервального гіпоксичного тренування (ІНТ) могло б пояснити механізми довготривалої стійкості ефекту та відкрити нові діагностичні та терапевтичні підходи.

ВИСНОВКИ

У дисертації розв'язано актуальне наукове завдання - встановлено роль факторів, що індукуються гіпоксією, поліпептиду, що активує аденілатциклазу гіпофіза та інгібітора активатора плазміногену 1-го типу у молекулярному патогенезі посттравматичного стресового розладу і вперше в межах єдиного експерименту оцінено ефекти трьох видів гіпоксії на поведінкові та молекулярні маркери розладу на моделі одноразового пролонгованого стресу (single prolonged stress). За результатами роботи сформульовано такі висновки:

1. Протокол одноразового пролонгованого стресу (single prolonged stress) відтворив стійкий тривожно-подібний фенотип: у піднесеному хрестоподібному лабіринті час завмирання зріс у 2,5 раза ($p = 0,0001$), у темно-світлій камері входи у світлу зону знизились на 44 % ($p = 0,009$); значущих змін у тесті «відкрите поле» не виявлено - фенотип валідовано двома незалежними тестами тривожності.
2. Молекулярний фенотип посттравматичного стресового розладу має регіон-специфічний характер: у гіпокампі (але не в медіальній префронтальній корі) виявлено вибіркове підвищення експресії фактора, що індукується гіпоксією, ізоформи 1α (HIF- 1α) у 2,1 раза ($p = 0,028$) та ізоформи 2α (HIF- 2α) у 2,2 раза ($p = 0,036$), що може вказувати на гіпокамп як основну ділянку посттравматичного порушення гіпоксія-залежної транскрипційної програми.
3. Поведінкові наслідки гіпоксії залежать від її виду, а не від наявності гіпоксичного стимулу як такого: серед трьох порівняних впливів лише інтервальне гіпоксичне тренування (ІНТ) забезпечувало послідовний PTSD-специфічний анксиолітичний ефект - зменшення часу завмирання в 4,0 раза у піднесеному хрестоподібному лабіринті ($p < 0,01$) та в 4,0 раза у тесті «відкрите поле» ($p < 0,001$). Хімічна гіпоксія, спричинена хлоридом кобальту (CoCl_2), діяла переважно анксиогенно, гіпобарична гіпоксія - з

парціальним ефектом - покращення лише в DLB без значущих змін в EPM та OFT.

4. Інтервальне гіпоксичне тренування (ИТ) забезпечувало найглибшу абсолютну супресію експресії HIF-1 α , HIF-3 α та інгібітора активатора плазміногену 1-го типу (PAI-1) у травмованих тварин в обох ділянках мозку, а її PTSD-селективний ефект був значущим для HIF-3 α (зниження у 4,7 раза в медіальній префронтальній корі та у 4,2 раза в гіпокампі порівняно з відповідними контрольними групами; $q < 0,001$ і $q = 0,003$). Гіпобарична гіпоксія дала найширшу PTSD-селективну молекулярну сигнатуру та унікальну регіон-специфічну дисоціацію відповіді поліпептиду, що активує аденілатциклазу гіпофіза (PACAP) і HIF-2 α : тварини Контроль+Bar зберігали підвищену експресію цих генів (гіпокампальний PACAP $0,079 \pm 0,083$ - у 3,2 раза вище за Контроль+CoCl₂; $q = 0,030$), тоді як ПТСР+Bar демонстрували значущу супресію (PACAP у 4,4 раза, HIF-2 α у 3,1 раза нижче за Контроль+Bar; $q = 0,007$ і $q = 0,039$). Хімічна гіпоксія (CoCl₂) спричиняла рівномірну PTSD-незалежну супресію експресії всіх досліджуваних маркерів без PTSD-селективності.
5. Кореляційний аналіз на груповому рівні пов'язує глибшу гіпоксичну супресію транскриптів зі зниженням тривожно-подібної поведінки: час у центрі тесту «відкрите поле» позитивно корелював із HIF-2 α і HIF-3 α у медіальній префронтальній корі ($\rho = 0,893$, $p = 0,007$ і $\rho = 0,821$, $p = 0,023$) та в гіпокампі ($\rho = 0,821$, $p = 0,023$ і $\rho = 0,857$, $p = 0,014$), а входи у світлу зону темно-світлої камери - негативно з гіпокампальними HIF-1 α ($\rho = -0,929$; $p = 0,003$) і PACAP ($\rho = -0,821$; $p = 0,023$), вказуючи на спільну вісь гіпоксичної супресії, пов'язану зі зниженням тривожності. Сукупно одержані дані визначають інтервальне гіпоксичне тренування як найперспективніший кандидатний нефармакологічний підхід для корекції поведінкового фенотипу експериментального посттравматичного стресового розладу та обґрунтовують доцільність її подальшої розробки

за умови оптимізації інтенсивності, модальності та дозування гіпоксичного стимулу. Слід зазначити, що молекулярні висновки цієї роботи ґрунтуються виключно на даних експресії мРНК (RT-qPCR); рівні відповідних білків, їхня посттрансляційна модифікація та функціональна активність не вимірювалися, тому всі інтерпретації щодо білкових продуктів і сигнальних шляхів залишаються припущеннями, які потребують верифікації на протеомному рівні.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. D.D. Adingupu, A. Soroush, A. Hansen, R. Twomey, J.F. Dunn, Brain hypoxia, neurocognitive impairment, and quality of life in people post-COVID-19, *J Neurol* 270 (2023) 3303-3314. <https://doi.org/10.1007/s00415-023-11767-2>.
2. S.H. Ahmed, A. Zakai, M. Zahid, M.Y. Jawad, R. Fu, M. Chaiton, Prevalence of post-traumatic stress disorder and depressive symptoms among civilians residing in armed conflict-affected regions: a systematic review and meta-analysis, *Gen Psych* 37 (2024) e101438. <https://doi.org/10.1136/gpsych-2023-101438>.
3. G.I. Al Jowf, Z.T. Ahmed, N. An, R.A. Reijnders, E. Ambrosino, B.P.F. Rutten, L. De Nijs, L.M.T. Eijssen, A Public Health Perspective of Post-Traumatic Stress Disorder, *IJERPH* 19 (2022) 6474. <https://doi.org/10.3390/ijerph19116474>.
4. M. Alexandra Kredlow, R.J. Fenster, E.S. Laurent, K.J. Ressler, E.A. Phelps, Prefrontal cortex, amygdala, and threat processing: implications for PTSD, *Neuropsychopharmacol* 47 (2022) 247-259. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01155-7>.
5. R. Andero, Stress-induced changes in the molecular processes underlying fear memories: implications for PTSD and relevant animal models, *Mol Psychiatry* 30 (2025) 2219-2227. <https://doi.org/10.1038/s41380-025-02910-8>.
6. F. Angelucci, K. Veverova, A. Katonová, M. Vyhnalek, J. Hort, Serum PAI-1/BDNF Ratio Is Increased in Alzheimer's Disease and Correlates with Disease Severity, *ACS Omega* 8 (2023) 36025-36031. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c04076>.
7. W.A. Awuah, F.T. Adebuseye, J.K. Tan, T. Ferreira, T. Abdul-Rahman, The silent war: PTSD in Ukraine: insights from other war-affected nations for treating intergenerational PTSD, *International Journal of Surgery* 109 (2023) 3698-3699. <https://doi.org/10.1097/JS9.0000000000000597>.
8. M.Z. Bakleh, A. Al Haj Zen, The Distinct Role of HIF-1 α and HIF-2 α in Hypoxia and Angiogenesis, *Cells* 14 (2025) 673. <https://doi.org/10.3390/cells14090673>.

9. J.C. Bartsch, M. Von Cramon, D. Gruber, U. Heinemann, J. Behr, Stress-Induced Enhanced Long-Term Potentiation and Reduced Threshold for N-Methyl-D-Aspartate Receptor- and β -Adrenergic Receptor-Mediated Synaptic Plasticity in Rodent Ventral Subiculum, *Front Mol Neurosci* 14 (2021) 658465. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.658465>.
10. M. Basheeruddin, S. Qausain, Hypoxia-Inducible Factor 1-Alpha (HIF-1 α): An Essential Regulator in Cellular Metabolic Control, *Cureus* (2024). <https://doi.org/10.7759/cureus.63852>.
11. P.S. Baxter, M. Martel, A. McMahon, P.C. Kind, G.E. Hardingham, Pituitary adenylate cyclase-activating peptide induces long-lasting neuroprotection through the induction of activity-dependent signaling via the cyclic AMP response element-binding protein-regulated transcription co-activator 1, *Journal of Neurochemistry* 118 (2011) 365-378. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07330.x>.
12. A. Becke, P. Müller, M. Dordevic, V. Lessmann, T. Brigadski, N.G. Müller, Daily intermittent normobaric hypoxia over 2 weeks reduces BDNF plasma levels in young adults - a randomized controlled feasibility study, *Front Physiol* 9 (2018) 1337. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01337>.
13. U.S. Bedi, R. Arora, Cardiovascular manifestations of posttraumatic stress disorder, *J Natl Med Assoc* 99 (2007) 642-649.
14. B.S. Bhutta, F. Alghoula, I. Berim, Hypoxia and Hypoxemia, in: StatPearls, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2024.
15. Z. Birhan, Y. Deressa, M. Shegaw, S. Asnakew, T. Mekonen, Posttraumatic stress disorder in a war-affected area of Northeast Ethiopia: a cross-sectional study, *BMC Psychiatry* 23 (2023) 627. <https://doi.org/10.1186/s12888-023-05116-w>.
16. J.I. Bisson, S. Cosgrove, C. Lewis, N.P. Roberts, Post-traumatic stress disorder, *BMJ* (2015) h6161. <https://doi.org/10.1136/bmj.h6161>.
17. O.V. Bogdanova, O. Abdullah, S. Kanekar, V.B. Bogdanov, A.P. Prescott, P.F. Renshaw, Neurochemical alterations in frontal cortex of the rat after one week of

- hypobaric hypoxia, *Behav Brain Res* 263 (2014) 203-209. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.01.027>.
18. C. Bouarab, V. Roullot-Lacarrière, M. Vallée, A. Le Roux, C. Guette, M. Mennesson, A. Marighetto, A. Desmedt, P.V. Piazza, J.M. Revest, PAI-1 protein is a key molecular effector in the transition from normal to PTSD-like fear memory, *Mol Psychiatry* 26 (2021) 4968-4981. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01024-1>.
 19. A. Boulares, A. Pichon, C. Faucher, N.L. Bragazzi, O. Dupuy, Effects of intermittent hypoxia protocols on cognitive performance and brain health in older adults across cognitive states: a systematic literature review, *J Alzheimers Dis* 101 (2024) 13-30. <https://doi.org/10.3233/JAD-240711>.
 20. M. Bourin, M. Hascoët, The mouse light/dark box test, *Eur J Pharmacol* 463 (2003) 55-65. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01274-3](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01274-3).
 21. J.D. Bremner, Neuroimaging in Posttraumatic Stress Disorder and Other Stress-Related Disorders, *Neuroimaging Clinics of North America* 17 (2007) 523-538. <https://doi.org/10.1016/j.nic.2007.07.003>.
 22. E.J. Bromet, L. Atwoli, N. Kawakami, F. Navarro-Mateu, P. Piotrowski, A.J. King, S. Aguilar-Gaxiola, J. Alonso, B. Bunting, K. Demyttenaere, S. Florescu, G. De Girolamo, S. Gluzman, J.M. Haro, P. De Jonge, E.G. Karam, S. Lee, V. Kovess-Masfety, M.E. Medina-Mora, Z. Mneimneh, B.-E. Pennell, J. Posada-Villa, D. Salmerón, T. Takeshima, R.C. Kessler, Post-traumatic stress disorder associated with natural and human-made disasters in the World Mental Health Surveys, *Psychol Med* 47 (2017) 227-241. <https://doi.org/10.1017/S0033291716002026>.
 23. A. Brunet, E. Monson, A. Liu, D. Fikretoglu, Trauma Exposure and Posttraumatic Stress Disorder in the Canadian Military, *Can J Psychiatry* 60 (2015) 488-496. <https://doi.org/10.1177/070674371506001104>.
 24. J. Bartscher, R.T. Mallet, G.P. Millet, M. Bartscher, Hypoxia and brain aging: neurodegeneration or neuroprotection?, *Ageing Res Rev* 68 (2021) 101343. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101343>.

25. J. Burtscher, T. Citherlet, A. Camacho-Cardenosa, M. Camacho-Cardenosa, A. Raberin, B. Krumm, et al., Mechanisms underlying the health benefits of intermittent hypoxia conditioning, *J Physiol* 602 (2024) 5757-5783. <https://doi.org/10.1113/JP285230>.
26. S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, et al., The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clin Chem* 55 (2009) 611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
27. U.J. Butt, A.A. Steixner-Kumar, C. Depp, T. Sun, I. Hassouna, L. Wüstefeld, S. Arinrad, M.R. Zillmann, N. Schopf, L. Fernandez Garcia-Agudo, L. Mohrmann, U. Bode, A. Ronnenberg, M. Hindermann, S. Goebbels, S. Bonn, D.M. Katschinski, K.W. Miskowiak, K.-A. Nave, H. Ehrenreich, Hippocampal neurons respond to brain activity with functional hypoxia, *Mol Psychiatry* 26 (2021) 1790-1807. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00988-w>.
28. L.E. Chaby, K. Karavidha, M.J. Lisieski, S.A. Perrine, I. Liberzon, Cognitive flexibility training improves extinction retention memory and enhances cortical dopamine with and without traumatic stress exposure, *Front Behav Neurosci* 13 (2019) 24. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00024>.
29. F. Charlson, M. van Ommeren, A. Flaxman, J. Cornett, H. Whiteford, S. Saxena, New WHO prevalence estimates of mental disorders in conflict settings: a systematic review and meta-analysis, *Lancet* 394 (2019) 240-248. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30934-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30934-1).
30. S. Chen, H. Jiang, Y. Liu, Z. Hou, Y. Yue, Y. Zhang, F. Zhao, Z. Xu, Y. Li, X. Mou, L. Li, T. Wang, J. Zhao, C. Han, Y. Sui, M. Wang, Z. Yang, Y. Lu, Y. Zhu, J. Li, X. Shen, F. Sun, Q. Chen, H. Chen, Y. Yuan, Combined serum levels of multiple proteins in tPA-BDNF pathway may aid the diagnosis of five mental disorders, *Sci Rep* 7 (2017) 6871. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06832-6>.
31. X.H. Chen, D.T. Chen, X.M. Huang, Y.H. Chen, J.H. Pan, X.C. Zheng, et al., Dexmedetomidine protects against chemical hypoxia-induced neurotoxicity in

- differentiated PC12 cells via inhibition of NADPH oxidase 2-mediated oxidative stress, *Neurotox Res* 35 (2019) 139-149. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9938-7>.
32. K.A. Chivers-Wilson, Sexual assault and posttraumatic stress disorder: A review of the biological, psychological and sociological factors and treatments, *MJM* 9 (2020). <https://doi.org/10.26443/mjm.v9i2.663>.
 33. H. Choudhry, A.L. Harris, Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology, *Cell Metabolism* 27 (2018) 281-298. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.005>.
 34. D.J. Christoffel, S.A. Golden, S.J. Russo, Structural and synaptic plasticity in stress-related disorders, *Reviews in the Neurosciences* 22 (2011). <https://doi.org/10.1515/RNS.2011.044>.
 35. M.N. Christoffersen, A.A.E. Thorup, Post-traumatic Stress Disorder in School-age Children: A Nationwide Prospective Birth Cohort Study, *Journ Child Adol Trauma* 17 (2024) 139-157. <https://doi.org/10.1007/s40653-024-00611-y>.
 36. M. Colborne, Ukraine struggles with rise in PTSD, *CMAJ* 187 (2015) 1275-1275. <https://doi.org/10.1503/cmaj.109-5160>.
 37. P. Colucci, E. Marchetta, G.F. Mancini, P. Alva, F. Chiarotti, M.T. Hasan, P. Campolongo, Predicting susceptibility and resilience in an animal model of post-traumatic stress disorder (PTSD), *Transl Psychiatry* 10 (2020) 243. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-00929-9>.
 38. C.D. Conrad, Chronic Stress-induced Hippocampal Vulnerability: The Glucocorticoid Vulnerability Hypothesis, *Rev. Neurosci.* 19 (2008). <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2008.19.6.395>.
 39. J. Cui, X. Wang, J. Yu, B. Zhang, Y. Shi, K.-F. So, L. Zhang, J. Wei, Neuropeptide-mediated activation of astrocytes improves stress resilience in mice by modulating cortical neural synapses, *Acta Pharmacol Sin* 46 (2025) 867-879. <https://doi.org/10.1038/s41401-024-01420-7>.

40. Y. Dai, W. Li, M. Zhong, J. Chen, Y. Liu, Q. Cheng, et al., Preconditioning and post-treatment with cobalt chloride in rat model of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy, *Brain Dev* 36 (2014) 228-240. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2013.04.007>.
41. V. Damgaard, J. Mariegaard, J.M. Lindhardsen, H. Ehrenreich, K.W. Miskowiak, Neuroprotective Effects of Moderate Hypoxia: A Systematic Review, *Brain Sciences* 13 (2023) 1648. <https://doi.org/10.3390/brainsci13121648>.
42. B.G. Dias, K.J. Ressler, PACAP and the PAC1 Receptor in Post-Traumatic Stress Disorder, *Neuropsychopharmacol* 38 (2013) 245-246. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.147>.
43. K. Doeniyas-Barak, I. Kutz, E. Lang, R. Merzbach, R. Lev Wiesel, R. Boussi-Gross, S. Efrati, The use of hyperbaric oxygen for veterans with PTSD: basic physiology and current available clinical data, *Front Neurosci* 17 (2023) 1259473. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1259473>.
44. K. Doeniyas-Barak, I. Kutz, E. Lang, A. Assouline, A. Hadanny, K.C. Aberg, et al., Hyperbaric oxygen therapy for veterans with combat-associated posttraumatic stress disorder: a randomized, sham-controlled clinical trial, *J Clin Psychiatry* 85 (2024) 24m15464. <https://doi.org/10.4088/JCP.24m15464>.
45. T. Drevytska, B. Gavenauskas, S. Drozdovska, V. Nosar, V. Dosenko, I. Mankovska, HIF-3 α mRNA expression changes in different tissues and their role in adaptation to intermittent hypoxia and physical exercise, *Pathophysiology* 19 (2012) 205-214. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2012.06.002>.
46. C. Duan, Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes, *Am J Physiol Cell Physiol* 310 (2015) C260-C269. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00315.2015>.
47. E.R. Dworkin, A.E. Jaffe, M. Bedard-Gilligan, S. Fitzpatrick, PTSD in the Year Following Sexual Assault: A Meta-Analysis of Prospective Studies, *Trauma, Violence, & Abuse* 24 (2023) 497-514. <https://doi.org/10.1177/15248380211032213>.

48. A.G. D'Amico, G. Maugeri, D.M. Rasà, R. Reitano, S. Saccone, C. Federico, G. Magro, V. D'Agata, Modulatory role of PACAP and VIP on HIFs expression in lung adenocarcinoma, *Peptides* 146 (2021) 170672. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170672>.
49. L.E. Eiden, B. Samal, M.J. Gerdin, T. Mustafa, D. Vaudry, N. Stroth, Discovery of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide-Regulated Genes through Microarray Analyses in Cell Culture and In Vivo, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1144 (2008) 6-20. <https://doi.org/10.1196/annals.1418.019>.
50. N. Ghaffarzagdegan, A. Ebrahimvandi, M.S. Jalali, A Dynamic Model of Post-Traumatic Stress Disorder for Military Personnel and Veterans, *PLoS ONE* 11 (2016) e0161405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161405>.
51. C. Gillikin, L. Habib, M. Evces, B. Bradley, K.J. Ressler, J. Sanders, Trauma exposure and PTSD symptoms associate with violence in inner city civilians, *Journal of Psychiatric Research* 83 (2016) 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.07.027>.
52. M.R. Gilmartin, N.C. Ferrara, Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in learning and memory, *Front Cell Neurosci* 15 (2021) 663418. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.663418>.
53. N.A. Gingles, H. Bai, L.A. Miles, R.J. Parmer, Peptidergic regulation of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression in vivo, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 11 (2013) 1707-1715. <https://doi.org/10.1111/jth.12333>.
54. F.J. Gonzalez, C. Xie, C. Jiang, The role of hypoxia-inducible factors in metabolic diseases, *Nat Rev Endocrinol* 15 (2019) 21-32. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0096-z>.
55. S.J. Granger, V. May, S.E. Hammack, E. Akman, S.A. Jobson, E.A. Olson, C.D. Pernia, N.P. Daskalakis, C. Ravichandran, W.A. Carlezon, K.J. Ressler, S.L. Rauch, I.M. Rosso, Circulating PACAP levels are associated with altered imaging measures of entorhinal cortex neurite density in posttraumatic stress disorder, *European Journal*

of Psychotraumatology 15 (2024) 2335793.
<https://doi.org/10.1080/20008066.2024.2335793>.

56. J. Guina, R. Nahhas, A. Goldberg, S. Farnsworth, PTSD Symptom Severities, Interpersonal Traumas, and Benzodiazepines Are Associated with Substance-Related Problems in Trauma Patients, *JCM* 5 (2016) 70. <https://doi.org/10.3390/jcm5080070>.
57. B.J. Hall, J.D. Elhai, A. Grubaugh, P. Tuerk, K. Magruder, Examining the factor structure of PTSD between male and female veterans in primary care, *Journal of Anxiety Disorders* 26 (2012) 409-415. <https://doi.org/10.1016/j.janxdis.2011.12.015>.
58. H. Hashimoto, N. Shintani, M. Tanida, A. Hayata, R. Hashimoto, A. Baba, PACAP is implicated in the stress axes, *Curr Pharm Des* 17 (2011) 985-989. <https://doi.org/10.2174/138161211795589382>.
59. L.M. Hathaway, A. Boals, J.B. Banks, PTSD symptoms and dominant emotional response to a traumatic event: an examination of DSM-IV Criterion A2, *Anxiety, Stress & Coping* 23 (2010) 119-126. <https://doi.org/10.1080/10615800902818771>.
60. C.A. Hinojosa, A. Liew, X. An, J.S. Stevens, A. Basu, S.J.H. Van Rooij, S.L. House, F.L. Beaudoin, D. Zeng, T.C. Neylan, G.D. Clifford, T. Jovanovic, S.D. Linnstaedt, L.T. Germine, S.L. Rauch, J.P. Haran, A.B. Storrow, C. Lewandowski, P.I. Musey, P.L. Hendry, S. Sheikh, C.W. Jones, B.E. Patches, M.C. Kurz, R.A. Swor, L.A. Hudak, J.L. Pascual, M.J. Seamon, E.M. Datner, A.M. Chang, C. Pearson, D.A. Peak, R.C. Merchant, R.M. Domeier, N.K. Rathlev, P. Sergot, L.D. Sanchez, S.E. Bruce, M.W. Miller, R.H. Pietrzak, J. Joormann, D.A. Pizzagalli, J.F. Sheridan, S.E. Harte, J.M. Elliott, R.C. Kessler, K.C. Koenen, S.A. McLean, K.J. Ressler, N. Fani, Associations of alcohol and cannabis use with change in posttraumatic stress disorder and depression symptoms over time in recently trauma-exposed individuals, *Psychol Med* 54 (2024) 338-349. <https://doi.org/10.1017/S0033291723001642>.
61. G. Horvath, D. Reglodi, E. Fabian, B. Opper, Effects of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide on Cell Death, *IJMS* 23 (2022) 4953. <https://doi.org/10.3390/ijms23094953>.

62. L.E. Huang, H.F. Bunn, Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance, *J Biol Chem* 278 (2003) 19575-19578. <https://doi.org/10.1074/jbc.R200030200>.
63. F.A. Huppert, Memory impairment associated with chronic hypoxia., *Thorax* 37 (1982) 858-860. <https://doi.org/10.1136/thx.37.11.858>.
64. A. Iemolo, A. Ferragud, P. Cottone, V. Sabino, Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide in the Central Amygdala Causes Anorexia and Body Weight Loss via the Melanocortin and the TrkB Systems, *Neuropsychopharmacol* 40 (2015) 1846-1855. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.34>.
65. P. Jaakkola, D.R. Mole, Y.-M. Tian, M.I. Wilson, J. Gielbert, S.J. Gaskell, A. Von Kriegsheim, H.F. Hebestreit, M. Mukherji, C.J. Schofield, P.H. Maxwell, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe, Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation, *Science* 292 (2001) 468-472. <https://doi.org/10.1126/science.1059796>.
66. R.J. Johnson, O. Antonaccio, E. Botchkovar, S.E. Hobfoll, War trauma and PTSD in Ukraine's civilian population: comparing urban-dwelling to internally displaced persons, *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* 57 (2022) 1807-1816. <https://doi.org/10.1007/s00127-021-02176-9>.
67. K. Jomova, M. Valko, Advances in metal-induced oxidative stress and human disease, *Toxicology* 283 (2011) 65-87. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001>.
68. E. Jones, Historical approaches to post-combat disorders, *Phil Trans R Soc B* 361 (2006) 533-542. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1814>.
69. S.A. Joshi, R.L. Aupperle, S.S. Khalsa, Interoception in Fear Learning and Posttraumatic Stress Disorder, *FOC* 21 (2023) 266-277. <https://doi.org/10.1176/appi.focus.20230007>.
70. T. Juhász, C. Matta, É. Katona, C. Somogyi, R. Takács, P. Gergely, L. Csernoch, G. Panyi, G. Tóth, D. Reglődi, A. Tamás, R. Zákány, Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) Signalling Exerts Chondrogenesis Promoting and

- Protecting Effects: Implication of Calcineurin as a Downstream Target, *PLoS ONE* 9 (2014) e91541. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091541>.
71. W.G. Kaelin, P.J. Ratcliffe, Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway, *Molecular Cell* 30 (2008) 393-402. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.009>.
 72. S. Kanekar, O.V. Bogdanova, P.R. Olson, Y.-H. Sung, K.E. D'Anci, P.F. Renshaw, Hypobaric hypoxia induces depression-like behavior in female Sprague-Dawley rats, but not in males, *High Alt Med Biol* 16 (2015) 52-60. <https://doi.org/10.1089/ham.2014.1070>.
 73. S.J. Kang, J.-H. Kim, D.-I. Kim, B.Z. Roberts, S. Han, A pontomesencephalic PACAPergic pathway underlying panic-like behavioral and somatic symptoms in mice, *Nat Neurosci* 27 (2024) 90-101. <https://doi.org/10.1038/s41593-023-01504-3>.
 74. J.S. Kapel, R. Stokholm, B. Elmengaard, Z. Nochi, R.J. Olsen, C.B. Foldager, Individualized Algorithm-Based Intermittent Hypoxia Improves Quality of Life in Patients Suffering from Long-Term Sequelae After COVID-19 Infection, *JCM* 14 (2025) 1590. <https://doi.org/10.3390/jcm14051590>.
 75. E. Karanikas, N.P. Daskalakis, A. Agorastos, Oxidative Dysregulation in Early Life Stress and Posttraumatic Stress Disorder: A Comprehensive Review, *Brain Sci* 11 (2021) 723. <https://doi.org/10.3390/brainsci11060723>.
 76. T. Karatzias, Z. Chouliara, K. Power, K. Brown, M. Begum, T. McGoldrick, R. MacLean, Life satisfaction in people with post-traumatic stress disorder, *Journal of Mental Health* 22 (2013) 501-508. <https://doi.org/10.3109/09638237.2013.819418>.
 77. B.M. Kious, D.G. Kondo, P.F. Renshaw, Living high and feeling low: altitude, suicide, and depression, *Harv Rev Psychiatry* 26 (2018) 43-56. <https://doi.org/10.1097/HRP.0000000000000158>.
 78. B.M. Kious, A. Bakian, J. Zhao, B. Mickey, C. Guille, P.F. Renshaw, S. Sen, Altitude and risk of depression and anxiety: findings from the intern health study, *Int Rev Psychiatry* 31 (2019) 637-645. <https://doi.org/10.1080/09540261.2019.1586324>.

79. M. Kiuchi, T. Uno, T. Hasegawa, K. Koyama, M. Horiuchi, Influence of short-term hypoxic exposure on spatial learning and memory function and brain-derived neurotrophic factor in rats-A practical implication to human's lost way, *Front Behav Neurosci* 18 (2024) 1330596. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2024.1330596>.
80. L. Kong, R. Albano, A. Madayag, N. Raddatz, J.R. Mantsch, S. Choi, D. Lobner, D.A. Baker, Pituitary Adenylate cyclase-activating polypeptide orchestrates neuronal regulation of the astrocytic glutamate-releasing mechanism system xc⁻, *Journal of Neurochemistry* 137 (2016) 384-393. <https://doi.org/10.1111/jnc.13566>.
81. H. Kumar, D.-K. Choi, Hypoxia Inducible Factor Pathway and Physiological Adaptation: A Cell Survival Pathway?, *Mediators Inflamm* 2015 (2015) 584758. <https://doi.org/10.1155/2015/584758>.
82. D. Lando, D.J. Peet, D.A. Whelan, J.J. Gorman, M.L. Whitelaw, Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: a hypoxic switch, *Science* 295 (2002) 858-861. <https://doi.org/10.1126/science.1068592>.
83. S. Lawrence, R.H. Scofield, Post traumatic stress disorder associated hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and physical illness, *Brain, Behavior, & Immunity - Health* 41 (2024) 100849. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2024.100849>.
84. A. Lazarov, B. Suarez-Jimenez, A. Tamman, L. Falzon, X. Zhu, D.E. Edmondson, Y. Neria, Attention to threat in posttraumatic stress disorder as indexed by eye-tracking indices: a systematic review, *Psychol Med* 49 (2019) 705-726. <https://doi.org/10.1017/S0033291718002313>.
85. I. Liberzon, M. Krstov, E.A. Young, Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback, *Psychoneuroendocrinology* 22 (1997) 443-453. [https://doi.org/10.1016/s0306-4530\(97\)00044-9](https://doi.org/10.1016/s0306-4530(97)00044-9).
86. I. Liberzon, J.L. Abelson, Context Processing and the Neurobiology of Post-Traumatic Stress Disorder, *Neuron* 92 (2016) 14-30. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.039>.

87. M.J. Lisieski, A.L. Eagle, A.C. Conti, I. Liberzon, S.A. Perrine, Single-prolonged stress: a review of two decades of progress in a rodent model of post-traumatic stress disorder, *Front Psychiatry* 9 (2018) 196. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00196>.
88. S. Liu, X. Xie, D. Zhao, N. Jin, Y. Hu, W. Wang, X. Luo, G. Li, Z. Yang, Alcohol use disorder disrupts BDNF maturation via the PAI-1 pathway which could be reversible with abstinence, *Sci Rep* 14 (2024) 22150. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-73347-2>.
89. K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, *Methods* 25 (2001) 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
90. P.D. Loprinzi, A. Matalgah, L. Crawford, J.J. Yu, Z. Kong, B. Wang, S. Liu, L. Zou, Effects of Acute Normobaric Hypoxia on Memory Interference, *Brain Sciences* 9 (2019) 323. <https://doi.org/10.3390/brainsci9110323>.
91. Y. Makino, R. Cao, K. Svensson, G. Bertilsson, M. Asman, H. Tanaka, et al., Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression, *Nature* 414 (2001) 550-554. <https://doi.org/10.1038/35107085>.
92. M.A.S. Martín-Aragón Baudel, M.T. Rae, M.G. Darlison, A.V. Poole, J.A. Fraser, Preferential activation of HIF-2 α adaptive signalling in neuronal-like cells in response to acute hypoxia, *PLOS ONE* 12 (2017) e0185664. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185664>.
93. M. Mennesson, J.-M. Revest, Glucocorticoid-Responsive Tissue Plasminogen Activator (tPA) and Its Inhibitor Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1): Relevance in Stress-Related Psychiatric Disorders, *Int J Mol Sci* 24 (2023) 4496. <https://doi.org/10.3390/ijms24054496>.
94. A. Merelli, J.C.G. Rodríguez, J. Folch, M.R. Regueiro, A. Camins, A. Lazarowski, Understanding the Role of Hypoxia Inducible Factor During Neurodegeneration for New Therapeutics Opportunities, *Curr Neuropharmacol* 16 (2018) 1484-1498. <https://doi.org/10.2174/1570159X16666180110130253>.

95. Z. Miao, Y. Wang, Z. Sun, The Relationships Between Stress, Mental Disorders, and Epigenetic Regulation of BDNF, *IJMS* 21 (2020) 1375. <https://doi.org/10.3390/ijms21041375>.
96. C.R. Miller, J.E. McDonald, P.P. Grau, C.T. Wetterneck, Quality of Life in Posttraumatic Stress Disorder: The Role of Posttraumatic Anhedonia and Depressive Symptoms in a Treatment-Seeking Community Sample, *Trauma Care* 4 (2024) 87-97. <https://doi.org/10.3390/traumacare4010008>.
97. M. Mirabile, I. Gnatt, J.L. Sharp, J.L. Mackelprang, Shame and Emotion Dysregulation as Pathways to Posttraumatic Stress Symptoms Among Women With a History of Interpersonal Trauma, *J Interpers Violence* 39 (2024) 1853-1876. <https://doi.org/10.1177/08862605231211924>.
98. H. Mojtabavi, A. Saghazadeh, L. Van Den Heuvel, J. Bucker, N. Rezaei, Peripheral blood levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with post-traumatic stress disorder (PTSD): A systematic review and meta-analysis, *PLoS ONE* 15 (2020) e0241928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241928>.
99. R.A. Morey, J.E. Dunsmoor, C.C. Haswell, V.M. Brown, A. Vora, J. Weiner, D. Stjepanovic, H.R. Wagner, VA Mid-Atlantic MIRECC Workgroup, M. Brancu, C.E. Marx, J.C. Naylor, E. Van Voorhees, K.H. Taber, J.C. Beckham, P.S. Calhoun, J.A. Fairbank, S.T. Szabo, K.S. LaBar, Fear learning circuitry is biased toward generalization of fear associations in posttraumatic stress disorder, *Transl Psychiatry* 5 (2015) e700-e700. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.196>.
100. M.C. Morris, B.E. Compas, J. Garber, Relations among posttraumatic stress disorder, comorbid major depression, and HPA function: A systematic review and meta-analysis, *Clinical Psychology Review* 32 (2012) 301-315. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2012.02.002>.
101. S. Muhie, A. Gautam, N. Chakraborty, A. Hoke, J. Meyerhoff, R. Hammamieh, M. Jett, Molecular indicators of stress-induced neuroinflammation in a mouse model simulating features of post-traumatic stress disorder, *Transl Psychiatry* 7 (2017) e1135-e1135. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.91>.

102. J. Muñoz-Sánchez, M.E. Chánez-Cárdenas, The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model, *J Appl Toxicol* 39 (2019) 556-570. <https://doi.org/10.1002/jat.3749>.
103. S. Murakami, H. Imbe, Y. Morikawa, C. Kubo, E. Senba, Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly, *Neuroscience Research* 53 (2005) 129-139. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2005.06.008>.
104. S.J. Murphy, E.K. Malcolmson, K. McEwan, P.J. McGrath, Posttraumatic stress disorder interventions for children aged zero to six years: a scoping review, *European Journal of Psychotraumatology* 16 (2025) 2553429. <https://doi.org/10.1080/20008066.2025.2553429>.
105. R.J. Nahvi, C. Nwokafor, L.I. Serova, E.L. Sabban, Single prolonged stress as a prospective model for posttraumatic stress disorder in females, *Front Behav Neurosci* 13 (2019) 17. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00017>.
106. R. Naim, R. Abend, I. Wald, S. Eldar, O. Levi, E. Fruchter, K. Ginat, P. Halpern, M.L. Sipos, A.B. Adler, P.D. Bliese, P.J. Quartana, D.S. Pine, Y. Bar-Haim, Threat-Related Attention Bias Variability and Posttraumatic Stress, *AJP* 172 (2015) 1242-1250. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2015.14121579>.
107. A. Navarrete-Opazo, G.S. Mitchell, Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 307 (2014) R1181-R1197. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00208.2014>.
108. Y. Neria, A. Nandi, S. Galea, Post-traumatic stress disorder following disasters: a systematic review, *Psychol Med* 38 (2008) 467-480. <https://doi.org/10.1017/S0033291707001353>.
109. J.A. Neubauer, Invited review: physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia, *J Appl Physiol* 90 (2001) 1593-1599. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.4.1593>.

110. A. Neumeister, The Role of BDNF-TrkB Signaling in the Pathogenesis of PTSD, *J Depress Anxiety* (2013). <https://doi.org/10.4172/2167-1044.S4-006>.
111. E.L. Nicholson, M. Garry, L.J. Ney, K.C.M. Hsu, D.V. Zuj, K.L. Felmingham, The impact of the BDNF Val66Met genotype on intrusive memories following trauma exposure and in PTSD is moderated by sex and timing of trauma exposure, *Sci Rep* 15 (2025) 30863. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-13812-8>.
112. R.D.V. Nixon, P.A. Resick, M.G. Griffin, Panic following trauma: the etiology of acute posttraumatic arousal, *Journal of Anxiety Disorders* 18 (2004) 193-210. [https://doi.org/10.1016/S0887-6185\(02\)00290-6](https://doi.org/10.1016/S0887-6185(02)00290-6).
113. M. Olf, Sex and gender differences in post-traumatic stress disorder: an update, *European Journal of Psychotraumatology* 8 (2017) 1351204. <https://doi.org/10.1080/20008198.2017.1351204>.
114. P.T. Pang, H.K. Teng, E. Zaitsev, N.T. Woo, K. Sakata, S. Zhen, et al., Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity, *Science* 306 (2004) 487-491. <https://doi.org/10.1126/science.1100135>.
115. H. Party, C. Dujarrier, M. Hébert, S. Lenoir, S. Martinez De Lizarrondo, R. Delépée, C. Fauchon, M.-C. Bouton, P. Obiang, O. Godefroy, E. Save, L. Lecardeur, J. Chabry, D. Vivien, V. Agin, Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) deficiency predisposes to depression and resistance to treatments, *Acta Neuropathol Commun* 7 (2019) 153. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0807-2>.
116. L.C. Peter-Hagene, S.E. Ullman, Sexual assault-characteristics effects on PTSD and psychosocial mediators: A cluster-analysis approach to sexual assault types., *Psychological Trauma: Theory, Research, Practice, and Policy* 7 (2015) 162-170. <https://doi.org/10.1037/a0037304>.
117. J. Porhomayon, S. Kolesnikov, N. D Nader, The Impact of Stress Hormones on Post-traumatic Stress Disorders Symptoms and Memory in Cardiac Surgery Patients, *Journal of Cardiovascular and Thoracic Research*; ISSN 2008-5117 (2014). <https://doi.org/10.5681/JCVTR.2014.018>.

118. A.G. Portnychenko, M.I. Vasilenko, O.O. Moibenko, Hypoxic preconditioning prevents induction and activation of 5-lipoxygenase during ischemia and reperfusion of rat heart, *Int J Physiol Pathophysiol* 4 (2013) 91-101. <https://doi.org/10.1615/IntJPhysPathophys.v4.i2.20>.
119. N.R. Prabhakar, Carotid body chemoreflex: a driver of autonomic abnormalities in sleep apnoea, *Exp Physiol* 101 (2016) 975-985. <https://doi.org/10.1113/EP085624>.
120. N.R. Prabhakar, Y.J. Peng, J. Nanduri, Hypoxia-inducible factors and obstructive sleep apnea, *J Clin Invest* 130 (2020) 5042-5051. <https://doi.org/10.1172/JCI137560>.
121. E.B. Rankin, M.P. Biju, Q. Liu, T.L. Unger, J. Rha, R.S. Johnson, et al., Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo, *J Clin Invest* 117 (2007) 1068-1077. <https://doi.org/10.1172/JCI30117>.
122. K.J. Ressler, K.B. Mercer, B. Bradley, T. Jovanovic, A. Mahan, K. Kerley, S.D. Norrholm, V. Kilaru, A.K. Smith, A.J. Myers, M. Ramirez, A. Engel, S.E. Hammack, D. Toufexis, K.M. Braas, E.B. Binder, V. May, Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor, *Nature* 470 (2011) 492-497. <https://doi.org/10.1038/nature09856>.
123. L.K. Richardson, B.C. Frueh, R. Acierno, Prevalence Estimates of Combat-Related Post-Traumatic Stress Disorder: Critical Review, *Aust N Z J Psychiatry* 44 (2010) 4-19. <https://doi.org/10.3109/00048670903393597>.
124. D. Richter, K. Berger, Post-traumatic stress disorder following patient assaults among staff members of mental health hospitals: a prospective longitudinal study, *BMC Psychiatry* 6 (2006) 15. <https://doi.org/10.1186/1471-244X-6-15>.
125. M.E. Riser, S.D. Norrholm, Pituitary adenylate cyclase activating peptide and posttraumatic stress disorder: from bench to bedside, *Front Psychiatry* 13 (2022) 861606. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.861606>.
126. J. Rius, M. Guma, C. Schachtrup, K. Akassoglou, A.S. Zinkernagel, V. Nizet, R.S. Johnson, G.G. Haddad, M. Karin, NF- κ B links innate immunity to the hypoxic

- response through transcriptional regulation of HIF-1 α , *Nature* 453 (2008) 807-811. <https://doi.org/10.1038/nature06905>.
127. B.W. Row, R. Liu, W. Xu, L. Kheirandish, D. Gozal, Intermittent hypoxia is associated with oxidative stress and spatial learning deficits in the rat, *Am J Respir Crit Care Med* 167 (2003) 1548-1553. <https://doi.org/10.1164/rccm.200209-1050OC>.
 128. K. Salmon, R.A. Bryant, Posttraumatic stress disorder in children: The influence of developmental factors, *Clinical Psychology Review* 22 (2002) 163-188. [https://doi.org/10.1016/S0272-7358\(01\)00086-1](https://doi.org/10.1016/S0272-7358(01)00086-1).
 129. G. Santocildes, G. Viscor, T. Pagès, S. Ramos-Romero, J.L. Torres, J.R. Torrella, Physiological effects of intermittent passive exposure to hypobaric hypoxia and cold in rats, *Front Physiol* 12 (2021) 673095. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.673095>.
 130. G. Schirò, S. Iacono, P. Ragonese, P. Aridon, G. Salemi, C.R. Balistreri, A Brief Overview on BDNF-Trk Pathway in the Nervous System: A Potential Biomarker or Possible Target in Treatment of Multiple Sclerosis?, *Front Neurol* 13 (2022) 917527. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.917527>.
 131. M. Scortegagna, K. Ding, Y. Oktay, A. Gaur, F. Thurmond, L.J. Yan, et al., Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice, *Nat Genet* 35 (2003) 331-340. <https://doi.org/10.1038/ng1266>.
 132. M.L. Seibenhener, M.C. Wooten, Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice, *J Vis Exp.* (2015) 52434. <https://doi.org/10.3791/52434>.
 133. M.P. Seiglie, L. Lepeak, C. Velázquez-Sanchez, A. Ferragud, T. Le, P. Cottone, V. Sabino, The Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) System of the Central Amygdala Mediates the Detrimental Effects of Chronic Social Defeat Stress in Rats, *Eneuro* 9 (2022) ENEURO.0260-22.2022. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0260-22.2022>.

134. H. Selye, Stress and the general adaptation syndrome, *Br Med J* 1 (1950) 1383-1392.
<https://doi.org/10.1136/bmj.1.4667.1383>.
135. G.L. Semenza, G.L. Wang, A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation, *Mol Cell Biol* 12 (1992) 5447-5454.
<https://doi.org/10.1128/mcb.12.12.5447>.
136. G.L. Semenza, Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine, *Cell* 148 (2012) 399-408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>.
137. T.V. Serebrovskaya, V.I. Nosar, L.V. Bratus, B.L. Gavenauskas, I.M. Mankovska, Tissue oxygenation and mitochondrial respiration under different modes of intermittent hypoxia, *High Alt Med Biol* 14 (2013) 280-288.
<https://doi.org/10.1089/ham.2013.1012>.
138. T.V. Serebrovskaya, L. Xi, Intermittent hypoxia training as non-pharmacologic therapy for cardiovascular diseases: practical analysis on methods and equipment, *Exp Biol Med* (Maywood) 241 (2016) 1708-1723.
<https://doi.org/10.1177/1535370216657614>.
139. Z. Serebrovska, L. Xi, M. Fedoriuk, V. Dosenko, A. Shysh, M. Khetsuriani, D. Porkhalo, A. Savchenko, S. Goncharov, N. Utko, S. Virko, V. Kholin, E. Egorov, R. Koval, O. Maksymchuk, Intermittent hypoxia-hyperoxia training ameliorates cognitive impairment and neuroinflammation in a rat model of Alzheimer's disease, *Brain Research* 1847 (2025) 149301.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2024.149301>.
140. F.R. Sharp, M. Bernaudin, HIF1 and oxygen sensing in the brain, *Nat Rev Neurosci* 5 (2004) 437-448. <https://doi.org/10.1038/nrn1408>.
141. C. Sheth, H. Ombach, P. Olson, P.F. Renshaw, S. Kanekar, Increased anxiety and anhedonia in female rats following exposure to altitude, *High Alt Med Biol* 19 (2018) 81-90. <https://doi.org/10.1089/ham.2017.0125>.

142. S. Shioda, H. Ohtaki, T. Nakamachi, K. Dohi, J. Watanabe, S. Nakajo, S. Arata, S. Kitamura, H. Okuda, F. Takenoya, Y. Kitamura, Pleiotropic Functions of PACAP in the CNS: Neuroprotection and Neurodevelopment, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1070 (2006) 550-560. <https://doi.org/10.1196/annals.1317.080>.
143. A.L. Silverstein, W.J. Alilain, Intermittent Hypoxia Induces Greater Functional Breathing Motor Recovery as a Fixed Rather Than Varied Duration Treatment after Cervical Spinal Cord Injury in Rats, *Neurotrauma Reports* 2 (2021) 343-353. <https://doi.org/10.1089/neur.2021.0004>.
144. A. Singh, P. Shim, S. Naeem, S. Rahman, K. Lutfy, Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide modulates the stress response: the involvement of different brain areas and microglia, *Front Psychiatry* 15 (2025) 1495598. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2024.1495598>.
145. J.W. Smoller, The Genetics of Stress-Related Disorders: PTSD, Depression, and Anxiety Disorders, *Neuropsychopharmacol* 41 (2016) 297-319. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.266>.
146. D.P. Stiehl, R. Wirthner, J. Köditz, P. Spielmann, G. Camenisch, R.H. Wenger, Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels: evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system, *J Biol Chem* 281 (2006) 23482-23491. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601719200>.
147. N. Stroth, Y. Holighaus, D. Ait-Ali, L.E. Eiden, PACAP: a master regulator of neuroendocrine stress circuits and the cellular stress response, *Ann N Y Acad Sci* 1220 (2011) 49-59. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.05904.x>.
148. B. Stubbs, D. Vancampfort, N. Veronese, M. Solmi, F.P. Gaughran, P. Manu, S. Rosenbaum, M. De Hert, M. Fornaro, The prevalence and predictors of obstructive sleep apnea in major depressive disorder, bipolar disorder and schizophrenia: a systematic review and meta-analysis, *J Affect Disord* 197 (2016) 259-267. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.02.060>.

149. D. Swick, V. Ashley, The Specificity of Inhibitory Control Deficits in Post-Traumatic Stress Disorder: A Dissociation Between the Speed and Reliability of Stopping, *Journal of Anxiety Disorders* 75 (2020) 102278. <https://doi.org/10.1016/j.janxdis.2020.102278>.
150. T.T. Tamir, B. Tekeba, E.G. Mekonen, D.A. Gebrehana, A.F. Zegeye, Shadows of trauma: an umbrella review of the prevalence and risk factors of post-traumatic stress disorder in children and adolescents, *Child Adolesc Psychiatry Ment Health* 19 (2025) 48. <https://doi.org/10.1186/s13034-025-00879-4>.
151. The Lancet Regional Health - Europe, Soldiers of Ukraine, *The Lancet Regional Health - Europe* 53 (2025) 101341. <https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2025.101341>.
152. H. Tian, S.L. McKnight, D.W. Russell, Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells, *Genes Dev* 11 (1997) 72-82. <https://doi.org/10.1101/gad.11.1.72>.
153. H. Tian, R.E. Hammer, A.M. Matsumoto, D.W. Russell, S.L. McKnight, The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development, *Genes Dev* 12 (1998) 3320-3324. <https://doi.org/10.1101/gad.12.21.3320>.
154. S.C. Timmer-Murillo, A. Schramm, T.A. deRoos-Cassini, Life threat during assaultive trauma: Critical posttraumatic stress disorder risk factors for injured patients, *J Trauma Acute Care Surg* 92 (2022) 848-854. <https://doi.org/10.1097/TA.0000000000003543>.
155. A.-B. Uzun, M.G. Iliescu, L.-E. Stanciu, E.-V. Ionescu, R.A. Ungur, V.M. Ciortea, L. Irsay, I. Motoaşcă, M.N. Popescu, F.L. Popa, L. Pazara, D.-E. Tofolean, Effectiveness of Intermittent Hypoxia-Hyperoxia Therapy in Different Pathologies with Possible Metabolic Implications, *Metabolites* 13 (2023) 181. <https://doi.org/10.3390/metabo13020181>.
156. H. Van Marle, PTSD as a memory disorder, *European Journal of Psychotraumatology* 6 (2015) 27633. <https://doi.org/10.3402/ejpt.v6.27633>.

157. E.R. Velasco, A. Florido, Á. Flores, E. Senabre, A. Gomez-Gomez, A. Torres, A. Roca, S. Norrholm, E.L. Newman, P. Das, R.A. Ross, A. Lori, O.J. Pozo, K.J. Ressler, L.L. Garcia-Esteve, T. Jovanovic, R. Andero, PACAP-PAC1R modulates fear extinction via the ventromedial hypothalamus, *Nat Commun* 13 (2022) 4374. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31442-w>.
158. A. Vermehren-Schmaedick, V.K. Jenkins, S.J. Knopp, A. Balkowiec, J.M. Bissonnette, Acute intermittent hypoxia-induced expression of brain-derived neurotrophic factor is disrupted in the brainstem of methyl-CpG-binding protein 2 null mice, *Neuroscience* 206 (2012) 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.01.017>.
159. M. Vismara, N. Girone, G. Cirnigliaro, F. Fasciana, S. Vanzetto, L. Ferrara, A. Priori, C. D'Addario, C. Viganò, B. Dell'Osso, Peripheral Biomarkers in DSM-5 Anxiety Disorders: An Updated Overview, *Brain Sciences* 10 (2020) 564. <https://doi.org/10.3390/brainsci10080564>.
160. A.A. Walf, C.A. Frye, The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents, *Nat Protoc* 2 (2007) 322-328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>.
161. R.H. Wenger, D.P. Stiehl, G. Camenisch, Integration of oxygen signaling at the consensus HRE, *Sci STKE* 2005 (2005) re12. <https://doi.org/10.1126/stke.3062005re12>.
162. Z. Yang, C. Gao, Z. Li, T. Jiang, Y. Liang, T. Jiang, C. Yu, S. Yan, P. Li, L. Zhou, The changes of tPA/PAI-1 system are associated with the ratio of BDNF/proBDNF in major depressive disorder and SSRIs antidepressant treatment, *Neuroscience* 559 (2024) 220-228. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2024.09.005>.
163. Y. Yuan, G. Hilliard, T. Ferguson, D.E. Millhorn, Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- α , *J Biol Chem* 278 (2003) 15911-15916. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300463200>.

164. H. Yuan, J. Liu, Y. Gu, X. Ji, G. Nan, Intermittent hypoxia conditioning as a potential prevention and treatment strategy for ischemic stroke: Current evidence and future directions, *Front Neurosci* 16 (2022) 1067411. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.1067411>.
165. L. Zasiiekina, A. Griffin, S.-J. Blakemore, I. Hlova, G. Bignardi, Prevalence of war-related posttraumatic stress disorder in adolescents: a systematic review and meta-analysis, *European Journal of Psychotraumatology* 16 (2025) 2497167. <https://doi.org/10.1080/20008066.2025.2497167>.
166. L. Zhang, X.-X. Li, X.-Z. Hu, Post-traumatic stress disorder risk and brain-derived neurotrophic factor Val66Met, *WJP* 6 (2016) 1. <https://doi.org/10.5498/wjp.v6.i1.1>.
167. Y.Q. Zhang, W.J. Zhang, J.H. Liu, W.Z. Ji, Effects of Chronic Hypoxic Environment on Cognitive Function and Neuroimaging Measures in a High-Altitude Population, *Front Aging Neurosci* 14 (2022) 788322. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.788322>.
168. Q. Zhang, W. Zhao, S. Li, Y. Ding, Y. Wang, X. Ji, Intermittent Hypoxia Conditioning: A Potential Multi-Organ Protective Therapeutic Strategy, *Int J Med Sci* 20 (2023) 1551-1561. <https://doi.org/10.7150/ijms.86622>.
169. K. Zhang, D. Ma, Y. Wu, Z. Xu, Impact of Chronic Intermittent Hypoxia on Cognitive Function and Hippocampal Neurons in Mice: A Study of Inflammatory and Oxidative Stress Pathways, *NSS Volume* 16 (2024) 2029-2043. <https://doi.org/10.2147/NSS.S489232>.
170. Q. Zhang, Q. Wang, F. Jin, D. Huang, X. Ji, Y. Wang, Intermittent hypoxia training improves cerebral blood flow without cognitive impairment, *Ann Clin Transl Neurol* 12 (2025) 86-96. <https://doi.org/10.1002/acn3.52248>.
171. X.-H. Zhu, H.-C. Yan, J. Zhang, H.-D. Qu, X.-S. Qiu, L. Chen, S.-J. Li, X. Cao, J.C. Bean, L.-H. Chen, X.-H. Qin, J.-H. Liu, X.-C. Bai, L. Mei, T.-M. Gao, Intermittent hypoxia promotes hippocampal neurogenesis and produces antidepressant-like effects in

adult rats, J Neurosci 30 (2010) 12653-12663.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6414-09.2010>.

172. J. Chen, C. Chen, N. Wang, C. Wang, Z. Gong, J. Du, H. Lai, X. Lin, W. Wang, X. Chang, M. Aschner, Z. Guo, S. Wu, H. Li, F. Zheng, Cobalt nanoparticles induce mitochondrial damage and β -amyloid toxicity via the generation of reactive oxygen species, Neurotoxicology 95 (2023) 155-163.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2023.01.010>.

173. X. Chen, H. Wang, M. Jiang, J. Zhao, W. Fan, Y. Wang, K. Peng, Cobalt induces neurodegenerative damages through impairing autophagic flux by activating hypoxia-inducible factor-1 α triggered ROS overproduction, Sci Total Environ 857 (2023) 159432.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159432>.

ДОДАТКИ

Додаток А. Програмний код аналізу даних

Повні версії скриптів обробки даних, статистичного аналізу та побудови рисунків розміщено у відкритих репозиторіях; нижче наведено структуру коду та зарезервовані місця для повних лістингів.

Репозиторій Експерименту 1 (фенотип Контроль vs ПТСР):
https://github.com/DotardOneClick/PTSD_hypoxia_markers

Репозиторій Експерименту 2 (види гіпоксії ІНТ/Bar/CoCl₂):
<https://github.com/DotardOneClick/Mode-Dependent-Hypoxic-Signalling>

A.1. Обчислення відносної експресії (метод $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$)

```
# qpcr_ddct.py - заглушка
import pandas as pd, numpy as np

REFERENCE_GENE = "Actb"

def delta_ct(ct_target, ct_reference):
    """ $\Delta Ct = Ct(\text{ген}) - Ct(\text{референс})$ ."""
    return ct_target - ct_reference

def relative_concentration(ct_target, ct_reference):
    """ $[C]_{rel} = 2^{(Ct_{ref} - Ct_{target})} \times 100$ ."""
    return np.power(2.0, ct_reference - ct_target) *
100.0

def ddct_fold_change(dct_sample, dct_control_mean):
    """ $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  відносно середнього контролю."""
    return np.power(2.0, -(dct_sample -
dct_control_mean))
```

A.2. Статистичний аналіз (нормальність, ANOVA / Kruskal-Wallis, FDR)

```
# stats_pipeline.py - заглушка
import numpy as np
from scipy import stats
from statsmodels.stats.multitest import multipletests

def remove_outliers_iqr(x, k=1.5):
```

```

q1, q3 = np.percentile(x, [25, 75]); iqr = q3 - q1
lo, hi = q1 - k*iqr, q3 + k*iqr
return x[(x >= lo) & (x <= hi)]

def group_compare(groups):
    """groups: list of 1D arrays. Повертає p та
    використаний тест."""
    normal = all(stats.shapiro(g).pvalue > 0.05 for g in
groups if len(g) >= 3)
    if normal:
        return stats.f_oneway(*groups).pvalue, "ANOVA"
    return stats.kruskal(*groups).pvalue, "Kruskal-
Wallis"

def pairwise(a, b, normal):
    if normal:
        return stats.ttest_ind(a, b,
equal_var=False).pvalue
    return stats.mannwhitneyu(a, b, alternative="two-
sided").pvalue

def fdr(pvals):
    """Корекція Бенджаміні-Хохберга (на ген)."""
    return multipletests(pvals, method="fdr_bh")[1]

```

A.3. Кореляційний аналіз (рангова кореляція Спірмена)

```

# correlations.py - заглушка
from scipy.stats import spearmanr

def spearman_group_means(expr_means, behav_means):
    """expr_means, behav_means: по одному середньому на
групу (n=6)."""
    rho, p = spearmanr(expr_means, behav_means)
    return rho, p

```

A.4. Побудова рисунків (боксплоти за групами)

```

# plotting.py - заглушка
import matplotlib.pyplot as plt, seaborn as sns

def grouped_boxplot(df, value, group_order,
control_median, ptsd_median):
    ax = sns.boxplot(data=df, x="group", y=value,

```

```

order=group_order)
    sns.stripplot(data=df, x="group", y=value,
order=group_order,
                    color="0.3", size=3, ax=ax)
    ax.axhline(control_median, ls="--")    # медіана
інтактного контролю
    ax.axhline(ptsd_median, ls=":")        # медіана
інтактного ПТСР
    return ax

```

Додаток Б. Зведені кількісні дані

Повні набори первинних даних (поведінкові показники та значення експресії генів по кожній тварині) для обох етапів дослідження депоновано у відкритому репозиторії Zenodo: Експеримент 1 (Контроль vs ПТСР) - DOI 10.5281/zenodo.19283737 (<https://zenodo.org/records/19283737>); Експеримент 2 (види гіпоксії) - DOI 10.5281/zenodo.19570227 (<https://zenodo.org/records/19570227>). Нижче наведено зведені таблиці ключових кількісних результатів Експерименту 2 (значення відносної експресії [C]rel подано як $M \pm SD$).

Повні поексемплярні таблиці первинних даних (значення для кожної тварини за всіма поведінковими параметрами та генами) наведено у відкритих репозиторіях Zenodo та GitHub (див. посилання вище); за потреби їх друковану версію може бути додано нижче.

Додаток Д. Повні результати попарних порівнянь, контролю якості та кореляцій

Таблиця Д.1 (S1). Тест «відкрите поле» (OFT) - усі значущі попарні порівняння груп. Робочий процес: тест Шапіро-Вілکا на нормальність → однофакторний ANOVA або Kruskal-Wallis, далі апостеріорний t-критерій або MWU.

Параметр	Порівняння	Заг. тест	p (заг.)	Апост. тест	p (апост.)	Знач.	Група 1: M±SD (n)	Група 2: M±SD (n)
Дистанція (м)	Контроль+ІНТ проти Контроль	ANOV A	<0.001	t-критерій	<0.001	***	17.909 ± 3.471 (21)	11.359 ± 1.582 (10)
Дистанція (м)	ПТСР+ІНТ проти Контроль+ІНТ	ANOV A	<0.001	t-критерій	0.001	**	11.359 ± 1.582 (10)	20.157 ± 7.146 (10)
Дистанція (м)	ПТСР+Ваг проти Контроль	ANOV A	<0.001	t-критерій	0.047	*	17.909 ± 3.471 (21)	15.569 ± 1.009 (10)
Швидкість (м/с)	Контроль+ІНТ проти Контроль	ANOV A	0.003	t-критерій	<0.001	***	0.028 ± 0.007 (20)	0.017 ± 0.006 (10)
Швидкість (м/с)	ПТСР+ІНТ проти Контроль+ІНТ	ANOV A	0.003	t-критерій	0.002	**	0.017 ± 0.006 (10)	0.034 ± 0.012 (10)

Параметр	Порівняння	Заг. тест	p (заг.)	Апост. тест	p (апост.)	Знач.	Група 1: M±SD (n)	Група 2: M±SD (n)
Епізоди завмирання (n)	ПТСР+CoCl ₂ проти Контроль	ANOVA	<0.001	t-критерій	0.007	**	11.524 ± 7.236 (21)	20.000 ± 8.955 (11)
Епізоди завмирання (n)	Контроль+ІНТ проти Контроль	ANOVA	<0.001	t-критерій	<0.001	***	11.524 ± 7.236 (21)	28.182 ± 9.516 (11)
Епізоди завмирання (n)	ПТСР+ІНТ проти Контроль+ІНТ	ANOVA	<0.001	t-критерій	<0.001	***	28.182 ± 9.516 (11)	11.700 ± 4.084 (10)
Епізоди завмирання (n)	ПТСР+Bar проти Контроль	ANOVA	<0.001	t-критерій	0.020	*	11.524 ± 7.236 (21)	17.250 ± 4.634 (12)
Епізоди завмирання (n)	Контроль+Bar проти Контроль	ANOVA	<0.001	t-критерій	0.029	*	11.524 ± 7.236 (21)	17.091 ± 4.847 (11)
Час завмирання (с)	ПТСР+CoCl ₂ проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	0.028	*	41.986 ± 34.089 (21)	69.073 ± 33.698 (11)
Час завмирання (с)	Контроль+ІНТ проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	<0.001	***	41.986 ± 34.089 (21)	119.900 ± 46.345 (12)
Час завмирання (с)	ПТСР+ІНТ проти Контроль+ІНТ	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	<0.001	***	119.900 ± 46.345 (12)	30.250 ± 8.636 (8)
Час завмирання (с)	ПТСР+Bar проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	0.035	*	41.986 ± 34.089 (21)	60.342 ± 16.658 (12)
Час завмирання (с)	Контроль+Bar проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	0.037	*	41.986 ± 34.089 (21)	60.673 ± 21.863 (11)
Входи в центр (n)	ПТСР+CoCl ₂ проти Контроль	ANOVA	0.006	t-критерій	0.032	*	13.545 ± 7.645 (22)	7.900 ± 2.726 (10)
Входи в центр (n)	Контроль+ІНТ проти Контроль	ANOVA	0.006	t-критерій	0.002	**	13.545 ± 7.645 (22)	5.545 ± 3.236 (11)

Параметр	Порівняння	Заг. тест	p (заг.)	Апост. тест	p (апост.)	Знач.	Група 1: M±SD (n)	Група 2: M±SD (n)
Входи в кути (n)	Контроль+CoCl ₂ проти Контроль	ANOVA	0.010	t-критерій	0.041	*	37.000 ± 20.281 (22)	51.000 ± 13.698 (12)
Входи в кути (n)	ПТСР+ІНТ проти Контроль	ANOVA	0.010	t-критерій	0.024	*	37.000 ± 20.281 (22)	55.600 ± 20.945 (10)
Входи в кути (n)	ПТСР+ІНТ проти Контроль+ІНТ	ANOVA	0.010	t-критерій	0.017	*	37.455 ± 8.982 (11)	55.600 ± 20.945 (10)
Входи в кути (n)	ПТСР+Var проти Контроль	ANOVA	0.010	t-критерій	0.020	*	37.000 ± 20.281 (22)	52.083 ± 8.328 (12)
Час у кутах (с)	ПТСР+CoCl ₂ проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	0.011	*	211.323 ± 168.908 (22)	397.560 ± 54.182 (10)
Час у кутах (с)	Контроль+CoCl ₂ проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	0.018	*	211.323 ± 168.908 (22)	373.067 ± 71.192 (12)
Час у кутах (с)	ПТСР+ІНТ проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	0.024	*	211.323 ± 168.908 (22)	388.562 ± 27.847 (8)
Час у кутах (с)	Контроль+ІНТ проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	<0.001	***	211.323 ± 168.908 (22)	446.408 ± 50.844 (12)
Час у кутах (с)	ПТСР+ІНТ проти Контроль+ІНТ	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	0.020	*	446.408 ± 50.844 (12)	388.562 ± 27.847 (8)
Час у кутах (с)	ПТСР+Var проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	0.001	***	211.323 ± 168.908 (22)	422.618 ± 48.446 (11)

Параметр	Порівняння	Заг. тест	p (заг.)	Апост. тест	p (апост.)	Знач.	Група 1: M±SD (n)	Група 2: M±SD (n)
Час у кутах (с)	Контроль+Bar проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	0.002	**	211.323 ± 168.908 (22)	410.200 ± 66.748 (12)
Час біля стінок (с)	ПТСР+ІНТ проти Контроль+ІНТ	ANOVA	0.104	t-критерій	0.008	**	138.600 ± 44.322 (12)	193.737 ± 32.695 (8)

Таблиця Д.2 (S2). Піднесений хрестоподібний лабіринт (ЕРМ) - усі значущі попарні порівняння груп. Той самий статистичний процес, що й у табл. Д.1.

Параметр	Порівняння	Заг. тест	p (заг.)	Апост. тест	p (апост.)	Знач.	Група 1: M±SD (n)	Група 2: M±SD (n)
Дистанція (м)	ПТСР+CoCl ₂ проти Контроль	ANOVA	<0.001	t-критерій	0.002	**	0.897 ± 0.322 (23)	0.533 ± 0.219 (11)
Дистанція (м)	Контроль+CoCl ₂ проти Контроль	ANOVA	<0.001	t-критерій	0.001	**	0.897 ± 0.322 (23)	0.523 ± 0.231 (12)
Дистанція (м)	ПТСР+ІНТ проти Контроль+ІНТ	ANOVA	<0.001	t-критерій	0.011	*	0.529 ± 0.233 (12)	0.773 ± 0.155 (10)
Дистанція (м)	Контроль+ІНТ проти Контроль	ANOVA	<0.001	t-критерій	0.001	**	0.897 ± 0.322 (23)	0.529 ± 0.233 (12)
Час завмирання (с)	ПТСР+CoCl ₂ проти Контроль	Kruskal-Wallis	0.001	MWU	0.004	**	12.809 ± 8.494 (23)	37.291 ± 27.672 (11)
Час завмирання (с)	ПТСР+ІНТ проти Контроль	Kruskal-Wallis	0.001	MWU	0.028	*	12.809 ± 8.494 (23)	5.360 ± 4.934 (10)
Час завмирання (с)	ПТСР+ІНТ проти Контроль+ІНТ	Kruskal-Wallis	0.001	MWU	0.008	**	21.609 ± 14.925 (11)	5.360 ± 4.934 (10)

Параметр	Порівняння	Заг. тест	p (заг.)	Апост. тест	p (апост.)	Знач.	Група 1: M±SD (n)	Група 2: M±SD (n)
Час завмирання (с)	ПТСР+Bar проти Контроль	Kruskal-Wallis	0.001	MWU	0.039	*	12.809 ± 8.494 (23)	25.875 ± 18.052 (12)
Епізоди завмирання (n)	ПТСР+CoCl ₂ проти Контроль	ANOVA	<0.001	t-критерій	<0.001	***	4.174 ± 2.902 (23)	11.636 ± 7.580 (11)
Епізоди завмирання (n)	Контроль+CoCl ₂ проти Контроль	ANOVA	<0.001	t-критерій	0.030	*	4.174 ± 2.902 (23)	7.182 ± 4.792 (11)
Епізоди завмирання (n)	ПТСР+ІНТ проти Контроль	ANOVA	<0.001	t-критерій	0.025	*	4.174 ± 2.902 (23)	1.900 ± 1.370 (10)
Епізоди завмирання (n)	Контроль+ІНТ проти Контроль	ANOVA	<0.001	t-критерій	0.040	*	4.174 ± 2.902 (23)	7.000 ± 4.775 (11)
Епізоди завмирання (n)	ПТСР+ІНТ проти Контроль+ІНТ	ANOVA	<0.001	t-критерій	0.004	**	7.000 ± 4.775 (11)	1.900 ± 1.370 (10)
Епізоди завмирання (n)	ПТСР+Bar проти Контроль	ANOVA	<0.001	t-критерій	0.002	**	4.174 ± 2.902 (23)	8.500 ± 4.462 (12)
Входи у відкриті рукави (n)	ПТСР+ІНТ проти Контроль	Kruskal-Wallis	0.001	MWU	0.010	**	5.087 ± 2.729 (23)	9.900 ± 5.216 (10)
Входи у відкриті рукави (n)	ПТСР+ІНТ проти Контроль+ІНТ	Kruskal-Wallis	0.001	MWU	0.001	**	3.545 ± 2.115 (11)	9.900 ± 5.216 (10)
Входи у відкриті рукави (n)	Контроль+Bar проти Контроль	Kruskal-Wallis	0.001	MWU	0.038	*	5.087 ± 2.729 (23)	7.333 ± 1.581 (9)
Входи у відкриті рукави (n)	ПТСР+Bar проти Контроль+Bar	Kruskal-Wallis	0.001	MWU	0.019	*	7.333 ± 1.581 (9)	5.091 ± 2.212 (11)
Час у відкритих рукавах (с)	ПТСР+ІНТ проти Контроль	Kruskal-Wallis	0.002	MWU	0.022	*	54.174 ± 42.196 (23)	97.920 ± 48.259 (10)
Час у відкритих рукавах (с)	ПТСР+ІНТ проти Контроль+ІНТ	Kruskal-Wallis	0.002	MWU	0.001	**	25.300 ± 17.428 (10)	97.920 ± 48.259 (10)

Параметр	Порівняння	Заг. тест	p (заг.)	Апост. тест	p (апост.)	Знач.	Група 1: M±SD (n)	Група 2: M±SD (n)
Нахили голови (n)	ПТСР+CoCl ₂ проти Контроль	ANOV A	<0.001	t-критерій	0.015	*	19.917 ± 9.362 (24)	12.091 ± 5.262 (11)
Нахили голови (n)	Контроль+CoCl ₂ проти Контроль	ANOV A	<0.001	t-критерій	0.005	**	19.917 ± 9.362 (24)	10.909 ± 4.763 (11)
Нахили голови (n)	Контроль+ІНТ проти Контроль	ANOV A	<0.001	t-критерій	0.003	**	19.917 ± 9.362 (24)	10.182 ± 4.446 (11)
Нахили голови (n)	ПТСР+ІНТ проти Контроль+ІНТ	ANOV A	<0.001	t-критерій	0.001	***	10.182 ± 4.446 (11)	18.000 ± 4.269 (10)
Нахили голови (n)	Контроль+Bar проти Контроль	ANOV A	<0.001	t-критерій	0.022	*	19.917 ± 9.362 (24)	13.250 ± 2.896 (12)
Входи в закриті рукави (n)	Контроль+CoCl ₂ проти Контроль	ANOV A	0.007	t-критерій	0.039	*	10.783 ± 5.300 (23)	6.917 ± 4.502 (12)
Входи в закриті рукави (n)	Контроль+ІНТ проти Контроль	ANOV A	0.007	t-критерій	0.031	*	10.783 ± 5.300 (23)	6.545 ± 4.719 (11)
Входи в закриті рукави (n)	ПТСР+ІНТ проти Контроль+ІНТ	ANOV A	0.007	t-критерій	0.002	**	6.545 ± 4.719 (11)	12.800 ± 3.011 (10)
Час у закритих рукавах (с)	ПТСР+CoCl ₂ проти Контроль	Kruskal-Wallis	0.004	MWU	0.043	*	187.483 ± 59.147 (23)	229.982 ± 68.849 (11)
Час у закритих рукавах (с)	Контроль+CoCl ₂ проти Контроль	Kruskal-Wallis	0.004	MWU	0.033	*	187.483 ± 59.147 (23)	233.180 ± 38.724 (10)
Час у закритих рукавах (с)	ПТСР+ІНТ проти Контроль+ІНТ	Kruskal-Wallis	0.004	MWU	0.008	**	226.870 ± 37.953 (10)	139.660 ± 59.900 (10)
Оберти (n)	ПТСР+CoCl ₂ проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	0.013	*	6.083 ± 1.586 (24)	4.500 ± 1.354 (10)
Оберти (n)	Контроль+CoCl ₂ проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	0.003	**	6.083 ± 1.586 (24)	4.200 ± 0.789 (10)

Параметр	Порівняння	Заг. тест	p (заг.)	Апост. тест	p (апост.)	Знач.	Група 1: M±SD (n)	Група 2: M±SD (n)
Оберти (n)	Контроль+ІНТ проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	0.015	*	6.083 ± 1.586 (24)	4.333 ± 2.015 (12)
Оберти (n)	ПТСР+ІНТ проти Контроль+ІНТ	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	0.016	*	4.333 ± 2.015 (12)	6.333 ± 0.866 (9)
Оберти (n)	ПТСР+Var проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	0.007	**	6.083 ± 1.586 (24)	4.455 ± 1.214 (11)

Таблиця Д.3 (S3). Тест «темно-світла камера» (DLB) - усі значущі попарні порівняння груп. Той самий статистичний процес, що й у табл. Д.1.

Параметр	Порівняння	Заг. тест	p (заг.)	Апост. тест	p (апост.)	Знач.	Група 1: M±SD (n)	Група 2: M±SD (n)
Входи у світлу зону (n)	ПТСР+CoCl ₂ проти Контроль	Kruskal-Wallis	0.001	MWU	0.018	*	2.333 ± 1.523 (24)	1.222 ± 0.441 (9)
Входи у світлу зону (n)	ПТСР+CoCl ₂ проти Контроль+CoCl ₂	Kruskal-Wallis	0.001	MWU	0.012	*	3.083 ± 1.975 (12)	1.222 ± 0.441 (9)
Входи у світлу зону (n)	ПТСР+ІНТ проти Контроль	Kruskal-Wallis	0.001	MWU	0.001	**	2.333 ± 1.523 (24)	4.900 ± 2.283 (10)
Час у світлій зоні (с)	ПТСР+ІНТ проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	0.031	*	34.500 ± 22.959 (22)	59.100 ± 30.120 (10)
Час у світлій зоні (с)	ПТСР+ІНТ проти Контроль+ІНТ	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	0.009	**	25.000 ± 15.937 (11)	59.100 ± 30.120 (10)
Час у світлій зоні (с)	ПТСР+Var проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	<0.001	***	34.500 ± 22.959 (22)	247.167 ± 32.431 (6)

Параметр	Порівняння	Заг. тест	p (заг.)	Апост. тест	p (апост.)	Знач.	Група 1: M±SD (n)	Група 2: M±SD (n)
Час у світлій зоні (с)	Контроль+Var проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	<0.001	***	34.500 ± 22.959 (22)	235.33 ± 38.769 (9)
Час у темній зоні (с)	ПТСР+Var проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	<0.001	***	403.62 ± 173.220 (24)	52.833 ± 32.431 (6)
Час у темній зоні (с)	Контроль+Var проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	<0.001	***	403.62 ± 173.220 (24)	59.500 ± 40.037 (10)
Цікавість (n)	ПТСР+CoCl ₂ проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	0.029	*	2.875 ± 1.702 (24)	4.455 ± 1.809 (11)
Цікавість (n)	Контроль+CoCl ₂ проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	<0.001	***	2.875 ± 1.702 (24)	6.000 ± 1.809 (12)
Цікавість (n)	ПТСР+ІНТ проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	<0.001	***	2.875 ± 1.702 (24)	6.900 ± 1.969 (10)
Цікавість (n)	Контроль+ІНТ проти Контроль	Kruskal-Wallis	<0.001	MWU	0.005	**	2.875 ± 1.702 (24)	5.300 ± 2.263 (10)

Таблиця Д.4 (S4). Результати qPCR - медіальна префронтальна кора (мПФК). Усі 25 апріорних попарних порівнянь на ген. Значення: M ± SEM (n). Значущість після FDR-корекції Бенджаміні-Хохберга.

Порівняння	HIF-1α	HIF-2α	HIF-3α	PACAP	PAI-1
ПТСР проти Контроль	1.609±0.387 (8) ns	1.139±0.407 (8) ns	7.227±4.311 (8) ns	1.781±1.192 (8) ns	1.838±0.789 (8) ns
Контроль+CoCl ₂ проти Контроль	0.129±0.045 (9) **	0.093±0.039 (8) ***	0.134±0.047 (9) ns	0.017±0.002 (8) **	0.010±0.003 (9) ***
Контроль+ІНТ проти Контроль	0.084±0.021 (8) **	0.014±0.001 (9) ***	0.052±0.007 (9) *	0.035±0.009 (9) *	0.008±0.003 (8) ***
Контроль+Var проти Контроль	0.274±0.128 (8) *	0.037±0.009 (7) ***	0.371±0.297 (8) ns	0.501±0.363 (8) ns	0.005±0.002 (7) ***

Порівняння	HIF-1 α	HIF-2 α	HIF-3 α	PACAP	PAI-1
ПТСП+CoCl ₂ проти ПТСП	0.272 $\pm$ 0.186 (9) **	0.029 $\pm$ 0.007 (9) ***	0.065 $\pm$ 0.008 (8) ***	0.146 $\pm$ 0.109 (9) *	0.004 $\pm$ 0.001 (8) ***
ПТСП+ІНТ проти ПТСП	0.178 $\pm$ 0.143 (8) **	0.013 $\pm$ 0.001 (8) ***	0.011 $\pm$ 0.002 (8) ***	0.021 $\pm$ 0.005 (8) **	0.002 $\pm$ 0.001 (8) ***
ПТСП+Var проти ПТСП	0.044 $\pm$ 0.008 (8) **	0.014 $\pm$ 0.003 (9) ***	0.009 $\pm$ 0.001 (9) ***	0.011 $\pm$ 0.002 (8) **	0.003 $\pm$ 0.001 (9) ***
ПТСП+CoCl ₂ проти Контроль	0.272 $\pm$ 0.186 (9) **	0.029 $\pm$ 0.007 (9) ***	0.065 $\pm$ 0.008 (8) *	0.146 $\pm$ 0.109 (9) *	0.004 $\pm$ 0.001 (8) ***
ПТСП+CoCl ₂ проти Контроль+CoCl ₂	0.272 $\pm$ 0.186 (9) ns	0.029 $\pm$ 0.007 (9) ns	0.065 $\pm$ 0.008 (8) ns	0.146 $\pm$ 0.109 (9) ns	0.004 $\pm$ 0.001 (8) ns
ПТСП+ІНТ проти Контроль	0.178 $\pm$ 0.143 (8) **	0.013 $\pm$ 0.001 (8) ***	0.011 $\pm$ 0.002 (8) *	0.021 $\pm$ 0.005 (8) **	0.002 $\pm$ 0.001 (8) ***
ПТСП+ІНТ проти Контроль+ІНТ	0.178 $\pm$ 0.143 (8) ns	0.013 $\pm$ 0.001 (8) ns	0.011 $\pm$ 0.002 (8) ***	0.021 $\pm$ 0.005 (8) ns	0.002 $\pm$ 0.001 (8) ns
ПТСП+Var проти Контроль	0.044 $\pm$ 0.008 (8) **	0.014 $\pm$ 0.003 (9) ***	0.009 $\pm$ 0.001 (9) *	0.011 $\pm$ 0.002 (8) **	0.003 $\pm$ 0.001 (9) ***
ПТСП+Var проти Контроль+Var	0.044 $\pm$ 0.008 (8) **	0.014 $\pm$ 0.003 (9) **	0.009 $\pm$ 0.001 (9) **	0.011 $\pm$ 0.002 (8) *	0.003 $\pm$ 0.001 (9) ns
Контроль+ІНТ проти Контроль+CoCl ₂	0.084 $\pm$ 0.021 (8) ns	0.014 $\pm$ 0.001 (9) *	0.052 $\pm$ 0.007 (9) ns	0.035 $\pm$ 0.009 (9) ns	0.008 $\pm$ 0.003 (8) ns
Контроль+Var проти Контроль+CoCl ₂	0.274 $\pm$ 0.128 (8) ns	0.037 $\pm$ 0.009 (7) ns	0.371 $\pm$ 0.297 (8) ns	0.501 $\pm$ 0.363 (8) ns	0.005 $\pm$ 0.002 (7) ns
Контроль+Var проти Контроль+ІНТ	0.274 $\pm$ 0.128 (8) ns	0.037 $\pm$ 0.009 (7) **	0.371 $\pm$ 0.297 (8) ns	0.501 $\pm$ 0.363 (8) ns	0.005 $\pm$ 0.002 (7) ns
ПТСП+ІНТ проти ПТСП+CoCl ₂	0.178 $\pm$ 0.143 (8) ns	0.013 $\pm$ 0.001 (8) *	0.011 $\pm$ 0.002 (8) ***	0.021 $\pm$ 0.005 (8) ns	0.002 $\pm$ 0.001 (8) ns
ПТСП+Var проти ПТСП+CoCl ₂	0.044 $\pm$ 0.008 (8) ns	0.014 $\pm$ 0.003 (9) *	0.009 $\pm$ 0.001 (9) ***	0.011 $\pm$ 0.002 (8) ns	0.003 $\pm$ 0.001 (9) ns
ПТСП+Var проти ПТСП+ІНТ	0.044 $\pm$ 0.008 (8) ns	0.014 $\pm$ 0.003 (9) ns	0.009 $\pm$ 0.001 (9) ns	0.011 $\pm$ 0.002 (8) ns	0.003 $\pm$ 0.001 (9) ns
ПТСП+ІНТ проти Контроль+CoCl ₂	0.178 $\pm$ 0.143 (8) ns	0.013 $\pm$ 0.001 (8) *	0.011 $\pm$ 0.002 (8) ***	0.021 $\pm$ 0.005 (8) ns	0.002 $\pm$ 0.001 (8) **

Порівняння	HIF-1 α	HIF-2 α	HIF-3 α	PACAP	PAI-1
ПТСР+Var проти Контроль+CoCl ₂	0.044 $\pm$ 0.008 (8) ns	0.014 $\pm$ 0.003 (9) *	0.009 $\pm$ 0.001 (9) **	0.011 $\pm$ 0.002 (8) ns	0.003 $\pm$ 0.001 (9) *
Контроль+ІНТ проти ПТСР+CoCl ₂	0.084 $\pm$ 0.021 (8) ns	0.014 $\pm$ 0.001 (9) **	0.052 $\pm$ 0.007 (9) ns	0.035 $\pm$ 0.009 (9) ns	0.008 $\pm$ 0.003 (8) ns
Контроль+Var проти ПТСР+CoCl ₂	0.274 $\pm$ 0.128 (8) ns	0.037 $\pm$ 0.009 (7) ns	0.371 $\pm$ 0.297 (8) ns	0.501 $\pm$ 0.363 (8) ns	0.005 $\pm$ 0.002 (7) ns
ПТСР+Var проти Контроль+ІНТ	0.044 $\pm$ 0.008 (8) ns	0.014 $\pm$ 0.003 (9) ns	0.009 $\pm$ 0.001 (9) **	0.011 $\pm$ 0.002 (8) ns	0.003 $\pm$ 0.001 (9) ns
Контроль+Var проти ПТСР+ІНТ	0.274 $\pm$ 0.128 (8) *	0.037 $\pm$ 0.009 (7) ***	0.371 $\pm$ 0.297 (8) **	0.501 $\pm$ 0.363 (8) ns	0.005 $\pm$ 0.002 (7) ns

Таблиця Д.5 (S5). Результати qPCR - гіпокамп. Усі 25 апріорних попарних порівнянь на ген. Значення: М $\pm$ SEM (n). Значущість після FDR-корекції Бенджаміні-Хохберга.

Порівняння	HIF-1 α	HIF-2 α	HIF-3 α	PACAP	PAI-1
ПТСР проти Контроль	2.783 $\pm$ 0.655 (9) *	2.048 $\pm$ 0.444 (9) ns	32.489 $\pm$ 15.796 (8) ns	3.636 $\pm$ 1.723 (9) ns	2.412 $\pm$ 0.764 (8) ns
Контроль+CoCl ₂ проти Контроль	0.086 $\pm$ 0.016 (9) **	0.036 $\pm$ 0.008 (9) **	0.270 $\pm$ 0.018 (8) ns	0.025 $\pm$ 0.006 (9) **	0.003 $\pm$ 0.001 (8) ***
Контроль+ІНТ проти Контроль	0.084 $\pm$ 0.025 (9) **	0.025 $\pm$ 0.002 (9) **	0.193 $\pm$ 0.024 (9) ns	0.035 $\pm$ 0.007 (9) **	0.003 $\pm$ 0.001 (9) ***
Контроль+Var проти Контроль	0.105 $\pm$ 0.018 (8) ***	0.047 $\pm$ 0.007 (8) ***	0.222 $\pm$ 0.094 (9) ns	0.079 $\pm$ 0.028 (9) **	0.013 $\pm$ 0.006 (9) ***
ПТСР+CoCl ₂ проти ПТСР	0.121 $\pm$ 0.044 (9) **	0.029 $\pm$ 0.003 (9) **	0.207 $\pm$ 0.024 (9) ***	0.036 $\pm$ 0.013 (9) **	0.009 $\pm$ 0.004 (9) ***
ПТСР+ІНТ проти ПТСР	0.050 $\pm$ 0.011 (8) ***	0.022 $\pm$ 0.001 (8) ***	0.046 $\pm$ 0.014 (9) ***	0.022 $\pm$ 0.005 (8) **	0.005 $\pm$ 0.002 (9) ***
ПТСР+Var проти ПТСР	0.031 $\pm$ 0.010 (9) **	0.015 $\pm$ 0.004 (9) **	0.040 $\pm$ 0.013 (9) ***	0.018 $\pm$ 0.007 (9) **	0.004 $\pm$ 0.001 (9) ***
ПТСР+CoCl ₂ проти Контроль	0.121 $\pm$ 0.044 (9) **	0.029 $\pm$ 0.003 (9) **	0.207 $\pm$ 0.024 (9) ns	0.036 $\pm$ 0.013 (9) **	0.009 $\pm$ 0.004 (9) ***
ПТСР+CoCl ₂ проти Контроль+CoCl ₂	0.121 $\pm$ 0.044 (9) ns	0.029 $\pm$ 0.003 (9) ns	0.207 $\pm$ 0.024 (9) ns	0.036 $\pm$ 0.013 (9) ns	0.009 $\pm$ 0.004 (9) ns

Порівняння	HIF-1 α	HIF-2 α	HIF-3 α	PACAP	PAI-1
ПТСР+ІНТ проти Контроль	0.050 $\pm$ 0.011 (8) ***	0.022 $\pm$ 0.001 (8) ***	0.046 $\pm$ 0.014 (9) **	0.022 $\pm$ 0.005 (8) **	0.005 $\pm$ 0.002 (9) ***
ПТСР+ІНТ проти Контроль+ІНТ	0.050 $\pm$ 0.011 (8) ns	0.022 $\pm$ 0.001 (8) ns	0.046 $\pm$ 0.014 (9) **	0.022 $\pm$ 0.005 (8) ns	0.005 $\pm$ 0.002 (9) ns
ПТСР+Var проти Контроль	0.031 $\pm$ 0.010 (9) **	0.015 $\pm$ 0.004 (9) **	0.040 $\pm$ 0.013 (9) **	0.018 $\pm$ 0.007 (9) **	0.004 $\pm$ 0.001 (9) ***
ПТСР+Var проти Контроль+Var	0.031 $\pm$ 0.010 (9) **	0.015 $\pm$ 0.004 (9) **	0.040 $\pm$ 0.013 (9) *	0.018 $\pm$ 0.007 (9) *	0.004 $\pm$ 0.001 (9) ns
Контроль+ІНТ проти Контроль+CoCl ₂	0.084 $\pm$ 0.025 (9) ns	0.025 $\pm$ 0.002 (9) ns	0.193 $\pm$ 0.024 (9) ns	0.035 $\pm$ 0.007 (9) ns	0.003 $\pm$ 0.001 (9) ns
Контроль+Var проти Контроль+CoCl ₂	0.105 $\pm$ 0.018 (8) ns	0.047 $\pm$ 0.007 (8) ns	0.222 $\pm$ 0.094 (9) ns	0.079 $\pm$ 0.028 (9) *	0.013 $\pm$ 0.006 (9) ns
Контроль+Var проти Контроль+ІНТ	0.105 $\pm$ 0.018 (8) ns	0.047 $\pm$ 0.007 (8) *	0.222 $\pm$ 0.094 (9) ns	0.079 $\pm$ 0.028 (9) ns	0.013 $\pm$ 0.006 (9) *
ПТСР+ІНТ проти ПТСР+CoCl ₂	0.050 $\pm$ 0.011 (8) ns	0.022 $\pm$ 0.001 (8) *	0.046 $\pm$ 0.014 (9) **	0.022 $\pm$ 0.005 (8) ns	0.005 $\pm$ 0.002 (9) ns
ПТСР+Var проти ПТСР+CoCl ₂	0.031 $\pm$ 0.010 (9) *	0.015 $\pm$ 0.004 (9) ns	0.040 $\pm$ 0.013 (9) **	0.018 $\pm$ 0.007 (9) ns	0.004 $\pm$ 0.001 (9) ns
ПТСР+Var проти ПТСР+ІНТ	0.031 $\pm$ 0.010 (9) ns	0.015 $\pm$ 0.004 (9) ns	0.040 $\pm$ 0.013 (9) ns	0.018 $\pm$ 0.007 (9) ns	0.004 $\pm$ 0.001 (9) ns
ПТСР+ІНТ проти Контроль+CoCl ₂	0.050 $\pm$ 0.011 (8) ns	0.022 $\pm$ 0.001 (8) ns	0.046 $\pm$ 0.014 (9) ***	0.022 $\pm$ 0.005 (8) ns	0.005 $\pm$ 0.002 (9) ns
ПТСР+Var проти Контроль+CoCl ₂	0.031 $\pm$ 0.010 (9) *	0.015 $\pm$ 0.004 (9) ns	0.040 $\pm$ 0.013 (9) ***	0.018 $\pm$ 0.007 (9) ns	0.004 $\pm$ 0.001 (9) ns
Контроль+ІНТ проти ПТСР+CoCl ₂	0.084 $\pm$ 0.025 (9) ns	0.025 $\pm$ 0.002 (9) ns	0.193 $\pm$ 0.024 (9) ns	0.035 $\pm$ 0.007 (9) ns	0.003 $\pm$ 0.001 (9) ns
Контроль+Var проти ПТСР+CoCl ₂	0.105 $\pm$ 0.018 (8) ns	0.047 $\pm$ 0.007 (8) ns	0.222 $\pm$ 0.094 (9) ns	0.079 $\pm$ 0.028 (9) ns	0.013 $\pm$ 0.006 (9) ns
ПТСР+Var проти Контроль+ІНТ	0.031 $\pm$ 0.010 (9) ns	0.015 $\pm$ 0.004 (9) ns	0.040 $\pm$ 0.013 (9) **	0.018 $\pm$ 0.007 (9) ns	0.004 $\pm$ 0.001 (9) ns

Порівняння	HIF-1 α	HIF-2 α	HIF-3 α	PACAP	PAI-1
Контроль+Var проти ПТСР+ІНТ	0.105 $\pm$ 0.018 (8) *	0.047 $\pm$ 0.007 (8) **	0.222 $\pm$ 0.094 (9) ns	0.079 $\pm$ 0.028 (9) *	0.013 $\pm$ 0.006 (9) ns

Таблиця Д.6 (S6). Сирі значення Ct для PAI-1 по всіх групах із відповідними значеннями NTC. Індивідуальні значення Ct за групами із середнім $\pm$ SEM.

Ділянка	Група	n	Середній Ct $\pm$ SEM	Діапазон (min-max)	Індивідуальні значення Ct
мПФК	Контроль	7	30.56 $\pm$ 0.32	29.17 - 31.45	31.18, 30.57, 31.45, 29.42, 29.17, 31.06, 31.07
	ПТСР	8	30.30 $\pm$ 0.51	27.53 - 32.76	31.10, 31.12, 30.26, 32.76, 30.59, 29.22, 29.78, 27.53
	Контроль+CoCl ₂	9	29.51 $\pm$ 0.28	28.28 - 30.81	30.29, 28.95, 30.10, 28.60, 29.99, 28.28, 28.66, 30.81, 29.92
	ПТСР+CoCl ₂	8	30.76 $\pm$ 0.26	29.14 - 31.68	30.65, 29.14, 31.00, 31.68, 31.57, 30.47, 30.60, 30.99
	Контроль+ІНТ	9	29.78 $\pm$ 0.36	28.05 - 31.12	28.05, 29.66, 30.05, 28.34, 30.84, 31.12, 30.58, 28.81, 30.59
	ПТСР+ІНТ	9	29.61 $\pm$ 0.40	27.19 - 31.04	30.40, 29.44, 29.66, 31.04, 27.19, 29.65, 28.02, 30.80, 30.31
	Контроль+Var	9	29.00 $\pm$ 0.38	27.86 - 31.96	31.96, 28.23, 29.59, 28.83, 28.74, 27.86, 28.79, 28.38, 28.65

Ділянка	Група	n	Середній Ct ± SEM	Діапазон (min-max)	Індивідуальні значення Ct
	ПТСР+Bar	9	29.62 ± 0.19	28.51 - 30.20	29.95, 29.11, 30.06, 28.51, 30.05, 30.14, 30.20, 29.55, 29.04
Гіпокамп	Контроль	6	29.85 ± 0.48	27.97 - 31.55	30.43, 30.05, 28.75, 30.35, 31.55, 27.97
	ПТСР	6	29.56 ± 0.78	26.77 - 31.77	31.54, 31.77, 27.56, 30.66, 29.04, 26.77
	Контроль+CoCl ₂	8	30.98 ± 0.20	29.96 - 31.67	31.22, 31.01, 30.95, 29.96, 31.28, 31.67, 31.47, 30.24
	ПТСР+CoCl ₂	8	30.72 ± 0.60	28.04 - 33.49	28.04, 33.49, 29.86, 31.14, 31.51, 31.07, 32.04, 28.61
	Контроль+ІНТ	8	30.94 ± 0.30	28.92 - 31.76	31.35, 31.29, 31.55, 30.46, 31.28, 31.76, 28.92, 30.94
	ПТСР+ІНТ	7	29.72 ± 0.32	28.04 - 30.78	30.78, 29.38, 29.97, 28.04, 29.30, 30.28, 30.32
	Контроль+Bar	7	29.37 ± 0.35	27.93 - 30.48	29.48, 30.33, 27.93, 30.48, 29.21, 28.17, 30.00
	ПТСР+Bar	8	29.77 ± 0.35	28.02 - 31.78	29.94, 31.78, 29.72, 30.13, 29.98, 28.02, 29.61, 28.97
NTC	без матриці (QC плати)	1	38.06	-	чисто - розділення >7 циклів від найнижчого Ct зразка
NTC	без матриці (QC плати)	1	28.36	-	пізній неспецифічний сигнал, контроль QC плати

Таблиця Д.7 (S7). Викиди ΔC_t , вилучені критерієм Граббса ($\alpha = 0,05$, ітеративно) для кожної підмножини «тканина $\times$ ген $\times$ група» перед розрахунком $\Delta\Delta C_t/[C]_{rel}$.

Тканина	Ген	Група + втручання	Видалене ΔC_t	p до видалення
Гіпокамп	HIF-1 α	Контроль+Var	5.1506	9
Гіпокамп	HIF-2 α	Контроль+Var	2.0915	9
мПФК	HIF-1 α	Контроль+Var	-8.4013	9
мПФК	HIF-2 α	Контроль+Var	-11.0471	9
мПФК	HIF-2 α	Контроль+Var	1.6803	9
мПФК	HIF-3 α	Контроль+Var	-7.9779	9
мПФК	PASAP	Контроль+Var	-8.7660	9
мПФК	PAI-1	Контроль+Var	-4.0186	9
мПФК	PAI-1	Контроль+Var	5.8994	9
Гіпокамп	HIF-3 α	Контроль+CoCl ₂	10.0794	9
Гіпокамп	PAI-1	Контроль+CoCl ₂	5.0967	9
мПФК	PASAP	Контроль+CoCl ₂	7.1392	9
мПФК	HIF-1 α	Контроль+ІНТ	16.2392	9
Гіпокамп	PAI-1	Контроль	-2.0798	9
мПФК	HIF-1 α	Контроль	-3.7042	9
мПФК	HIF-2 α	Контроль	-7.4952	9
мПФК	PAI-1	Контроль	-4.0266	9
мПФК	HIF-3 α	ПТСР+CoCl ₂	6.6980	9
мПФК	PAI-1	ПТСР+CoCl ₂	5.8394	9
Гіпокамп	HIF-1 α	ПТСР+ІНТ	13.6044	9
Гіпокамп	HIF-2 α	ПТСР+ІНТ	5.2435	9
Гіпокамп	PASAP	ПТСР+ІНТ	15.9987	9
мПФК	HIF-2 α	ПТСР+ІНТ	5.4910	9
мПФК	HIF-3 α	ПТСР+ІНТ	5.1668	9
мПФК	PASAP	ПТСР+ІНТ	3.6779	9
мПФК	PAI-1	ПТСР+ІНТ	-1.9818	9
Гіпокамп	PAI-1	ПТСР	-4.9122	9

Таблиця Д.8 (S8). Рангові кореляції Спірмена - експресія генів проти поведінкових параметрів (усі порівняння). Групові середні [C]rel (n = 7 груп) корельовано з груповими середніми поведінкових параметрів.

Тканина	Ген	Поведінковий параметр	n	r	p	Знач.
Гіпокамп	HIF-1 α	Час у центрі OF (с)	7	0.7143	0.0713	ns
Гіпокамп	HIF-1 α	Час у кутах OF (с)	7	-0.5357	0.2152	ns
Гіпокамп	HIF-1 α	Епізоди завмирання EPM (n)	7	-0.0357	0.9394	ns
Гіпокамп	HIF-1 α	Час завмирання OF (с)	7	0.0714	0.8790	ns
Гіпокамп	HIF-1 α	Входи у світлу зону DLB (n)	7	-0.9286	0.0025	**
Гіпокамп	HIF-1 α	Час у відкр. рукавах EPM (с)	7	-0.2500	0.5887	ns
Гіпокамп	HIF-1 α	Нахили голови EPM (n)	7	0.1071	0.8192	ns
Гіпокамп	HIF-1 α	Час у світлій зоні DLB (с)	7	-0.5714	0.1802	ns
Гіпокамп	HIF-2 α	Час у центрі OF (с)	7	0.8214	0.0234	*
Гіпокамп	HIF-2 α	Час у кутах OF (с)	7	-0.5714	0.1802	ns
Гіпокамп	HIF-2 α	Епізоди завмирання EPM (n)	7	-0.2500	0.5887	ns
Гіпокамп	HIF-2 α	Час завмирання OF (с)	7	-0.0714	0.8790	ns
Гіпокамп	HIF-2 α	Входи у світлу зону DLB (n)	7	-0.7500	0.0522	ns
Гіпокамп	HIF-2 α	Час у відкр. рукавах EPM (с)	7	-0.0714	0.8790	ns

Тканина	Ген	Поведінковий параметр	n	r	p	Знач.
Гіпокамп	HIF-2 α	Нахили голови EPM (n)	7	0.1071	0.8192	ns
Гіпокамп	HIF-2 α	Час у світлій зоні DLB (с)	7	-0.2857	0.5345	ns
Гіпокамп	HIF-3 α	Час у центрі OF (с)	7	0.8571	0.0137	*
Гіпокамп	HIF-3 α	Час у кутах OF (с)	7	-0.6786	0.0938	ns
Гіпокамп	HIF-3 α	Епізоди завмирання EPM (n)	7	-0.1786	0.7017	ns
Гіпокамп	HIF-3 α	Час завмирання OF (с)	7	-0.1429	0.7599	ns
Гіпокамп	HIF-3 α	Входи у світлу зону DLB (n)	7	-0.7143	0.0713	ns
Гіпокамп	HIF-3 α	Час у відкр. рукавах EPM (с)	7	-0.1071	0.8192	ns
Гіпокамп	HIF-3 α	Нахили голови EPM (n)	7	0.0357	0.9394	ns
Гіпокамп	HIF-3 α	Час у світлій зоні DLB (с)	7	-0.3571	0.4316	ns
Гіпокамп	PACAP	Час у центрі OF (с)	7	0.5714	0.1802	ns
Гіпокамп	PACAP	Час у кутах OF (с)	7	-0.3214	0.4821	ns
Гіпокамп	PACAP	Епізоди завмирання EPM (n)	7	-0.2143	0.6445	ns
Гіпокамп	PACAP	Час завмирання OF (с)	7	0.1786	0.7017	ns
Гіпокамп	PACAP	Входи у світлу зону DLB (n)	7	-0.8214	0.0234	*
Гіпокамп	PACAP	Час у відкр. рукавах EPM (с)	7	-0.1786	0.7017	ns

Тканина	Ген	Поведінковий параметр	n	r	p	Знач.
Гіпокамп	PACAP	Нахили голови ЕРМ (n)	7	0.1071	0.8192	ns
Гіпокамп	PACAP	Час у світлій зоні DLB (с)	7	-0.4643	0.2939	ns
Гіпокамп	PAI-1	Час у центрі OF (с)	7	0.6071	0.1482	ns
Гіпокамп	PAI-1	Час у кутах OF (с)	7	-0.5000	0.2532	ns
Гіпокамп	PAI-1	Епізоди завмирання ЕРМ (n)	7	-0.3214	0.4821	ns
Гіпокамп	PAI-1	Час завмирання OF (с)	7	-0.3214	0.4821	ns
Гіпокамп	PAI-1	Входи у світлу зону DLB (n)	7	-0.5714	0.1802	ns
Гіпокамп	PAI-1	Час у відкр. рукавах ЕРМ (с)	7	0.3571	0.4316	ns
Гіпокамп	PAI-1	Нахили голови ЕРМ (n)	7	0.7143	0.0713	ns
Гіпокамп	PAI-1	Час у світлій зоні DLB (с)	7	0.0357	0.9394	ns
мПФК	HIF-1 α	Час у центрі OF (с)	7	0.6429	0.1194	ns
мПФК	HIF-1 α	Час у кутах OF (с)	7	-0.6071	0.1482	ns
мПФК	HIF-1 α	Епізоди завмирання ЕРМ (n)	7	-0.4286	0.3374	ns
мПФК	HIF-1 α	Час завмирання OF (с)	7	-0.2500	0.5887	ns
мПФК	HIF-1 α	Входи у світлу зону DLB (n)	7	-0.6786	0.0938	ns
мПФК	HIF-1 α	Час у відкр. рукавах ЕРМ (с)	7	0.1786	0.7017	ns

Тканина	Ген	Поведінковий параметр	n	r	p	Знач.
мПФК	HIF-1 α	Нахили голови ЕРМ (n)	7	0.4643	0.2939	ns
мПФК	HIF-1 α	Час у світлій зоні DLB (с)	7	-0.2500	0.5887	ns
мПФК	HIF-2 α	Час у центрі OF (с)	7	0.8929	0.0068	**
мПФК	HIF-2 α	Час у кутах OF (с)	7	-0.5714	0.1802	ns
мПФК	HIF-2 α	Епізоди завмирання ЕРМ (n)	7	0.0000	1.0000	ns
мПФК	HIF-2 α	Час завмирання OF (с)	7	-0.0357	0.9394	ns
мПФК	HIF-2 α	Входи у світлу зону DLB (n)	7	-0.7500	0.0522	ns
мПФК	HIF-2 α	Час у відкр. рукавах ЕРМ (с)	7	-0.1786	0.7017	ns
мПФК	HIF-2 α	Нахили голови ЕРМ (n)	7	0.0000	1.0000	ns
мПФК	HIF-2 α	Час у світлій зоні DLB (с)	7	-0.2857	0.5345	ns
мПФК	HIF-3 α	Час у центрі OF (с)	7	0.8214	0.0234	*
мПФК	HIF-3 α	Час у кутах OF (с)	7	-0.5714	0.1802	ns
мПФК	HIF-3 α	Епізоди завмирання ЕРМ (n)	7	-0.2500	0.5887	ns
мПФК	HIF-3 α	Час завмирання OF (с)	7	-0.0714	0.8790	ns
мПФК	HIF-3 α	Входи у світлу зону DLB (n)	7	-0.7500	0.0522	ns
мПФК	HIF-3 α	Час у відкр. рукавах ЕРМ (с)	7	-0.0714	0.8790	ns

Тканина	Ген	Поведінковий параметр	n	r	p	Знач.
мПФК	HIF-3α	Нахили голови ЕРМ (n)	7	0.1071	0.8192	ns
мПФК	HIF-3α	Час у світлій зоні DLB (с)	7	-0.2857	0.5345	ns
мПФК	PACAP	Час у центрі OF (с)	7	0.4286	0.3374	ns
мПФК	PACAP	Час у кутах OF (с)	7	-0.2857	0.5345	ns
мПФК	PACAP	Епізоди завмирання ЕРМ (n)	7	-0.3571	0.4316	ns
мПФК	PACAP	Час завмирання OF (с)	7	0.1071	0.8192	ns
мПФК	PACAP	Входи у світлу зону DLB (n)	7	-0.7143	0.0713	ns
мПФК	PACAP	Час у відкр. рукавах ЕРМ (с)	7	-0.0357	0.9394	ns
мПФК	PACAP	Нахили голови ЕРМ (n)	7	0.2500	0.5887	ns
мПФК	PACAP	Час у світлій зоні DLB (с)	7	-0.4286	0.3374	ns
мПФК	PAI-1	Час у центрі OF (с)	7	0.6429	0.1194	ns
мПФК	PAI-1	Час у кутах OF (с)	7	-0.3929	0.3833	ns
мПФК	PAI-1	Епізоди завмирання ЕРМ (n)	7	-0.0714	0.8790	ns
мПФК	PAI-1	Час завмирання OF (с)	7	0.0714	0.8790	ns
мПФК	PAI-1	Входи у світлу зону DLB (n)	7	-0.5357	0.2152	ns
мПФК	PAI-1	Час у відкр. рукавах ЕРМ (с)	7	-0.2143	0.6445	ns

Тканина	Ген	Поведінковий параметр	n	r	p	Знач.
мПФК	PAI-1	Нахили голови ЕРМ (n)	7	-0.1786	0.7017	ns
мПФК	PAI-1	Час у світлій зоні DLB (с)	7	-0.3929	0.3833	ns