

РЕЦЕНЗІЯ

Кандидата медичних наук
НАГІБІНА Василя Сергійовича
на дисертаційну роботу аспіранта
Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України

ПОРХАЛО Дениса Федоровича

«Залежні від гіпоксії зміни експресії ізоформ фактору, що індукується гіпоксією, у гіпокампі та медіальній префронтальній корі при моделюванні посттравматичного стресового розладу»,
що подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії
за спеціальністю 091 «Біологія»
до спеціалізованої вченої ради ID 16997
Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця.

Актуальність теми

З початком повномасштабного військового вторгнення в Україну кількість людей, які зазнали психотравмувальних подій, різко зросла. Це стосується не лише військовослужбовців і ветеранів, які безпосередньо брали участь у бойових діях, а й цивільного населення, що постраждало від обстрілів, окупації, вимушеного переміщення, втрати близьких та інших наслідків війни. Повні епідеміологічні дані щодо поширеності посттравматичного стресового розладу (ПТСР) в Україні залишаються обмеженими, однак міжнародні оцінки свідчать про суттєве зростання тягаря психічних розладів у популяціях, що переживають тривалі збройні конфлікти. З огляду на значну кількість внутрішньо переміщених осіб та українців, які перебувають за кордоном, проблема має не лише національне, а й ширше європейське значення. (<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11523818/>).

Отже, актуальність обраної теми не викликає сумнівів. ПТСР суттєво погіршує якість життя, асоціюється з підвищеним ризиком залежностей від психоактивних речовин, суїцидальної поведінки, соматичної коморбідності та передчасної смертності. Особливо важливим є те, що розлад часто уражає людей молодого та працездатного віку, що, окрім медичних і соціальних наслідків, спричиняє значні економічні втрати.

Окремої актуальності роботі надає дослідження взаємозв'язків між HIF, PACAP та PAI-1. HIF-залежні механізми відображають клітинну відповідь на зміни кисневого та метаболічного гомеостазу; PACAP є важливим регулятором

нейроендокринної стрес-відповіді, тривожності та нейропластичності; PAI-1 через систему tPA/плазміну може впливати на дозрівання BDNF та, відповідно, на синаптичну пластичність. Тому аналіз осі HIF–PASAP–PAI-1 у структурах мозку, критично залучених до формування страху, пам'яті та стрес-адаптації, є патогенетично обґрунтованим і становить інтерес для пошуку нових підходів до корекції ПТСР.

Обмежена ефективність наявних методів лікування та їх переважно симптоматична спрямованість мотивують пошук патогенетично обґрунтованих підходів, що впливають на молекулярні механізми ПТСР. У цьому контексті значний інтерес становлять нефармакологічні стратегії, зокрема контрольовані гіпоксичні впливи. У даному дослідженні порівняно ефекти двох фізіологічних режимів гіпоксії - гіпобаричної гіпоксії та інтервального гіпоксичного тренування - і гіпоксія-міметичного впливу хлориду кобальту. CoCl_2 пригнічує активність пролілгідроксилаз, які за нормоксії гідроксилують HIF- α і сприяють його подальшій деградації. Таким чином, не спричиняючи безпосереднього зниження доступності кисню, хлорид кобальту стабілізує HIF та відтворює окремі компоненти клітинної відповіді на гіпоксію. У дисертації для цієї моделі використано поширений у закордонній літературі термін «хімічна гіпоксія», однак, на мою думку, точнішим є визначення «гіпоксія-міметичний вплив».

Зв'язок роботи з державними науковими програмами, темами, планами.

Дисертаційну роботу виконано в межах відомчої теми НДР відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України № 0118U007348, № 0124U001685 «Молекулярно-генетичні механізми нейродегенеративних змін мозку мишей із залученням прозапальних цитокінів при моделюванні посттравматичного стресового розладу».

Повнота виконання

За темою дисертації опубліковано чотири наукові праці: три статті та тези однієї стендової доповіді. Статті опубліковані в рецензованих наукових виданнях, індексованих у базі Scopus; результати роботи також апробовано на

міжнародній науковій конференції. Публікації відображають основні результати дисертаційного дослідження та свідчать про належний рівень їх апробації.

Наукова новизна

Наукова новизна роботи полягає насамперед у тому, що гіпоксія-чутливі молекулярні механізми та різні режими гіпоксичних впливів досі значно рідше досліджувалися в контексті ПТСР, ніж класичні нейроендокринні та нейромедіаторні механізми стресу.

Уперше показано регіон-специфічне підвищення експресії HIF-1 α та HIF-2 α у гіпокампі при SPS-індукованому ПТСР-подібному стані за відсутності значущих змін у медіальній префронтальній корі. Отримані дані свідчать про неоднорідність залучення гіпоксія-чутливих сигнальних механізмів у різних структурах мозку при посттравматичній адаптації.

Важливою складовою новизни є пряме порівняння в межах одного експериментального дизайну інтервального гіпоксичного тренування, гіпобаричної гіпоксії та впливу CoCl₂. Показано, що характер поведінкових і молекулярних змін залежить від модальності гіпоксичного або гіпоксія-міметичного впливу. Найбільш сприятливий профіль продемонструвало м'яке інтервальне гіпоксичне тренування, яке супроводжувалося покращенням низки поведінкових показників та нормалізацією експресії HIF-1 α , HIF-3 α і PAI-1 у тварин після SPS. Також виявлено регіон-специфічні особливості відповіді PACAP і HIF-2 α за умов гіпобаричної гіпоксії.

Ступінь обґрунтування висновків

Мета та завдання дисертації логічно пов'язані з отриманими результатами та висновками. Експериментальний дизайн включає достатню кількість контрольних груп, рандомізацію тварин та засліплення операторів під час поведінкового і молекулярного аналізу. Поєднання поведінкових тестів із RT-qPCR у двох функціонально важливих структурах мозку дозволяє зіставити фенотипові та молекулярні зміни. Позитивною рисою роботи є також відкритість первинних даних і програмного коду аналізу.

Застосовані статистичні методи загалом відповідають характеру отриманих даних: залежно від розподілу використовували однофакторний ANOVA або критерій Краскела–Волліса з подальшими попарними порівняннями за t-

критерієм Стюдента/Уелча або U-критерієм Манна–Вітні, а для множинних порівнянь експресії генів застосовували FDR-корекцію Бенджаміні–Хохберга. Висновки дисертації впливають із представлених результатів.

Теоретичне та практичне значення

Теоретичне значення роботи полягає в уточненні ролі гіпоксія-чутливих сигнальних механізмів у патогенезі ПТСР-подібного стану та демонстрації їх регіональної специфічності в гіпокампі й медіальній префронтальній корі. Результати розширюють уявлення про взаємодію HIF-залежних механізмів із RASAP та PAI-1 і вказують на залежність молекулярної відповіді від типу гіпоксичного впливу.

Практичне значення полягає у визначенні інтервального гіпоксичного тренування як перспективного нефармакологічного підходу для подальших доклінічних досліджень травма-асоційованих станів. Отримані дані також обґрунтовують подальше вивчення HIF-1 α /HIF-2 α та пов'язаних із ними сигнальних шляхів як потенційних молекулярних маркерів посттравматичної адаптації. Водночас перенесення цих результатів у клінічну практику потребує окремих досліджень безпеки, дозозалежності та ефективності.

Структура і обсяг дисертації

Дисертаційна робота викладена на 173 сторінках і складається зі вступу, п'яти розділів (огляд літератури; матеріали і методи; молекулярно-поведінковий фенотип ПТСР; вплив різних варіантів гіпоксії на поведінкові та молекулярні маркери ПТСР; узагальнене обговорення), висновків, списку використаних джерел і додатків. Роботу ілюстровано рисунками та таблицями; додатки містять програмний код, зведені кількісні дані й результати статистичного аналізу. Список літератури є сучасним і відповідає темі роботи. Структура дисертації логічна, а послідовність викладення матеріалу — коректна.

Запитання та зауваження

1. У дисертації вплив CoCl_2 визначено як «хімічну гіпоксію». Водночас хлорид кобальту не знижує безпосередньо доступність кисню, а переважно відтворює окремі компоненти гіпоксичної сигнальної відповіді через стабілізацію HIF. Чи не вважає здобувач точнішим термін «гіпоксія-міметичний вплив», особливо при прямому порівнянні з нормобаричною та гіпобаричною гіпоксією?

2. У роботі експресію HIF-1 α , HIF-2 α і HIF-3 α визначали методом RT-qPCR. Оскільки ключова регуляція HIF відбувається на посттрансляційному рівні, було б бажано додатково підтвердити функціональну активацію цього шляху на рівні білка або його ядерної локалізації (Western blot, імуногістохімія) чи за експресією валідованих генів-мішеней HIF, наприклад GLUT1/Slc2a1 або гліколітичних ферментів для HIF-1 та еритропоєтину або інших HIF-2-залежних мішеней. Які підходи здобувач вважає найбільш доцільними для такого підтвердження?

3. Експериментальний дизайн фактично включає два фактори: наявність/відсутність SPS та тип втручання. При цьому в роботі використовували однофакторний ANOVA або критерій Краскела–Волліса з подальшими попарними порівняннями. Чи не було б доцільно для формального підтвердження саме «ПТСР-селективного» ефекту застосувати двофакторну модель з оцінкою взаємодії SPS та intervention?

4. Перед статистичним аналізом викиди автоматично виключали за критерієм $1,5 \times \text{IQR}$, причому серед можливих причин зазначено не лише технічні артефакти, а й нетипову поведінку окремих тварин. Оскільки така поведінка може відображати реальну біологічну варіабельність, чи проводився аналіз чутливості з включенням усіх спостережень і чи зберігалися при цьому основні висновки?

5. Молекулярно-поведінкові кореляції розраховували за груповими середніми значеннями ($n = 6$ групових середніх). Такий підхід є придатним для генерації гіпотез, але не дозволяє безпосередньо судити про зв'язок експресії генів із поведінкою на рівні окремої тварини. Чи аналізувалися або чи планується аналізувати парні індивідуальні дані для тварин, у яких були доступні і поведінкові, і молекулярні показники?

Висновок

Зазначені зауваження не зменшують загальної позитивної оцінки дисертаційної роботи та значною мірою мають характер питань для наукової дискусії й визначення напрямів подальших досліджень.

На підставі викладеного вважаю, що дисертаційна робота Д. Ф. Порхала є завершеною самостійною кваліфікаційною науковою працею, у якій отримано нові науково обґрунтовані результати, що мають теоретичне та практичне значення, і може бути рекомендована до захисту.

Дисертаційна робота за актуальністю, науковою новизною, методичним рівнем, теоретичним і практичним значенням та обсягом виконаних досліджень відповідає чинним вимогам до дисертацій на здобуття ступеня доктора філософії, зокрема Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук, затвердженому постановою Кабінету Міністрів України від 23 березня 2016 р. № 261, Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради, затвердженому постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44, а також Вимогам до оформлення дисертації, затвердженим наказом Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 р. № 40. Автор дисертації заслуговує на присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Рецензент:

Василь Нагібін, к.м.н.,

Відділ загальної та молекулярної патофізіології

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України

nagibin@biph.kiev.ua

