

ВІДГУК ОФІЦІЙНОЇ ОПОНЕНТКИ

докторки медичних наук, професорки, завідувача кафедри патологічної фізіології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України

Денефіль Ольги Володимирівни

на дисертаційну роботу

Порхало Дениса Федоровича

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

подану до спеціалізованої вченої ради ID PhD 16997 Інституту фізіології ім.

О. О. Богомольця НАН України

для розгляду та проведення разового захисту дисертації

на здобуття наукового ступеня доктора філософії

у галузі знань «09 Біологія» за спеціальністю «091 Біологія»

Актуальність обраної теми

Сучасні проблеми лікування посттравматичного стресового розладу (ПТСР) полягають у довготривалому вживанні селективних інгібіторів зворотного захоплення серотоніну чи серотоніну і норадреналіну, високому відсотку фармакорезистентності до них. В умовах екстремального воєнного стресу в Україні ПТСР виходить за межі суто психологічної чи психотерапевтичної патології і про нього можна думати як про системну метаболічну катастрофу у ЦНС. Такі підходи до розуміння механізмів розвитку ПТСР вимагають вивчення його патогенезу через призму клітинного дихання, мітохондріального геномного стресу та сигналіngu кисневої недостатності.

Ключовою невирішеною ланкою при розгляді молекулярних механізмів розвитку ПТСР є детальне вивчення питання гіпоксії. З одного боку, хронічний психоемоційний стрес запускає ендогенну гіпоксію, яка через мітохондріальну дисфункцію, окисний вибух та виснаження нейропластичності деструктивно впливає на мозок. З іншого боку, екзогенні контрольовані гіпоксичні впливи здатні чинити потужний саногенетичний ефект, виступати чинником прекондиціювання та стимуляції нейрогенезу.

Недокінця дослідженими залишаються питання патогенезу ПТСР, які пояснили б межу між деструктивним та адаптивним процесами при гіпоксії. Центром цієї регуляторної системи є транскрипційні фактори родини HIF, але внесок їхніх окремих ізоформ, а саме HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , у регуляції відповіді на стрес, все ще залишається нез'ясованим. Залишається невивченим на сьогодні інтегративний зв'язок між гіпоксичним сигналіngом та осьовими

регуляторами нейротрофічного забезпечення мозку – поліпептидом гіпофіза, що активує аденілатциклазу (РАСАР) та інгібітором активатора плазміногену 1 (РАІ-1), які безпосередньо керують процесами дозрівання та функціональної активності нейротрофічного фактора мозку (BDNF).

Зіставлення патологічного та саногенетичного гіпоксичного каскадів у межах єдиного експериментального дослідження дозволить розкрити невідомі досі молекулярні чекпоінти нейрорезистентності, що відкриває шляхи для створення патогенетично обґрунтованої системи таргетної фармакологічної корекції та нефармакологічного інтервального нормобаричного / гіпобаричного тренування при ПТСР.

Зазначені проблеми й зумовили вибір теми дисертаційного дослідження, його концептуальну структуру та напрям пошуку.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретичне та практичне значення

Автором дисертаційного дослідження було отримано цілий ряд нових даних щодо мітохондріальних механізмів посттравматичної адаптації на транскрипційному рівні при SPS-індукований ПТСР. Уперше показано, що при SPS-індукованому ПТСР підвищення експресії HIF-1 α та HIF-2 α має регіон-специфічний характер і охоплює гіпокамп, але не медіальну префронтальну кору. Такий регіон-специфічний відгук дає підстави розглядати гіпокамп як основну ділянку транскрипційної гіпоксія-залежної адаптації до стресу.

Уперше одночасно порівняно три моделі гіпоксії (ІНТ, Ваг, CoCl₂) на єдиній групі тварин. Це дозволило обґрунтувати, що поведінкова та молекулярна специфіка відповіді організму формується під впливом модальності, інтенсивності та часової структури стимулу, а не виключно наявністю гіпоксичного чинника.

Уперше показано, що інтервальні гіпоксичні тренування демонструють PTSD-селективний анксиолітичний ефект, забезпечуючи найглибшу нормалізацію експресії HIF-1 α , HIF-3 α та РАІ-1 у тварин з ПТСР. Водночас виявлено унікальне явище: за умов гіпобаричної гіпоксії спостерігається регіон-специфічна дисоціація у відповіді систем РАСАР та HIF-2 α .

Одержані нові дані мають як практичне, так і теоретичне значення в клінічній медицині, зокрема психіатрії, неврології, військовій медицині, внутрішній медицині, а також у наукових та освітніх закладах біологічного та медичного профілів. Практична цінність наукової роботи полягає у клініко-експериментальному обґрунтуванні немедикаментозних методів відновлення. Результати відкривають нові молекулярні мішені (фактори HIF-1 α /HIF-2 α у гіпокампі) для розробки таргетних медикаментозних засобів. Окрім цього, дані мають важливе прикладне значення для подальших лабораторних експериментів у галузі дослідження стресу та ПТСР і можуть інтегруватися в освітні програми вищих навчальних закладів медичного та біологічного профілів.

Обґрунтованість та достовірність отриманих наукових результатів

Наведені в дисертаційній роботі Порхала Д.Ф. наукові положення, висновки та практичні рекомендації є достовірними та обґрунтованими. Вони забезпечені достатньою кількістю ($n=105$) експериментальних тварин – 3-місячних аутбредних альбіносних щурів-самців (*Rattus norvegicus*), базуються на адекватному методологічному підході з використанням сучасних інформативних лабораторних та інструментальних методів дослідження (індукція ПТСР за протоколом SPS, поведінкові методи з автоматизованим відеотрекінгом, виділення тотальної РНК, синтез кДНК, кількісна ПЛР у реальному часі з обчисленням відносної експресії).

Усі експериментальні дослідження здійснювалися з дотриманням етичних та законодавчих вимог при виконанні наукових робіт з використанням експериментальних тварин, що підтверджено висновком комітету з біомедичної етики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця.

Висновки відображають результати власних досліджень, зумовлюють наукову новизну, теоретичну і практичну значимість дисертаційної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана в межах відомчих тем НДР відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Значення довгих некодуючих РНК в механізмах розвитку експериментальної та клінічної патології» (2019-2023 рр., номер держреєстрації 0118U007348) і «Молекулярно-генетичні механізми нейродегенеративних змін мозку мишей із залученням прозапальних цитокінів при моделюванні посттравматичного стресового розладу» (2024-2028 рр., номер держреєстрації 0124U001685), співвиконавцем яких був здобувач.

Оцінка змісту, оформлення та обсягу дисертації

Робота викладена на 183 сторінках друкованого тексту (основний текст займає 124 сторінки) та складається з анотації українською та англійською мовами, списку публікацій за темою дисертації, змісту, переліку умовних позначень, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, двох розділів результатів власних досліджень, узагальненого обговорення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел із 173 найменувань (із них усі джерела латиницею), додатків.

У вступі автор подає обґрунтування вибору теми дослідження, зазначає наявний зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами, мету, завдання, методи дослідження, наукову новизну одержаних результатів, їх практичне значення, зазначає особистий внесок, апробацію матеріалів дисертації, публікації, а також структуру та обсяг дисертаційної роботи.

Огляд літератури «Сучасні уявлення про молекулярні механізми посттравматичного стресового розладу та його зв'язок з гіпоксією» складається з восьми підрозділів, у яких подано епідеміологію та причини

посттравматичного стресового розладу (1.1), наведено медичні та фізіологічні особливості мозку при ПТСР (1.2), показано зв'язок між ПТСР і біологічною адаптацією до стресу (1.3), описано молекулярні детермінанти розвитку ПТСР (1.4), проаналізовано фактори, що індукуються гіпоксією: молекулярна організація, регуляція та ізоформи (1.5), викладено поняття гіпоксії як модулятора стрес-залежної патології (1.6), проведено аналіз експериментальних моделей ПТСР і поведінкових парадигм (1.7), представлено інтегративну модель та обґрунтування напряму дослідження (1.8). У кінці кожного підрозділу логічно наведено питання, які плануються розглянути у дисертаційній роботі. Розділ містить 4 рисунки.

У розділі 2 «Матеріали і методи дослідження» детально описані методики моделювання у експериментальних тварин ПТСР, гіпоксичних втручань, поведінкових тестів, молекулярно-біологічних методів дослідження, статистичного аналізу отриманих даних. Зазначено про схвалення етичної відповідності дослідження Комітетом з біоетики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України. Розділ містить 1 таблицю і 1 рисунок.

Розділ 3 «Молекулярно-поведінковий фенотип ПТСР» складається з 2-ох підрозділів. У першому з них наведені результати поведінкового тестування, а в другому – молекулярного аналізу у гіпокампа і медіальної префронтальної кори при SPS у порівнянні з контролем. Розділ містить 5 таблиць і 3 рисунки.

Розділ 4 «Вплив різних видів гіпоксії на поведінкові та молекулярні маркери ПТСР» складається з 3-ьох підрозділів. У першому з них наведені результати поведінкового тестування, зокрема у тестах «відкрите поле» і піднесений хрестоподібний лабіринт, а в другому – молекулярного аналізу у гіпокампі і медіальній префронтальній корі при впливі трьох моделей гіпоксії (хімічної CoCl_2 , інтервальної нормобаричної ІНТ та гіпобаричної Bar). Розділ містить 3 таблиці і 8 рисунків.

Розділ 5 У розділі «Узагальнене обговорення», який складається з 8 підрозділів, дисертант логічно пояснює виявлені факти і положення, порівнює власні отримані результати з даними літератури, підводить підсумок дослідження.

Робота завершується 5 висновками, які відображають результати досліджень, є логічними і чіткими, відповідають поставленим завданням.

Є список літератури і додатки.

Повнота оприлюднення публікації результатів дисертації

За темою дисертації опубліковано 3 праці, з яких 2 статті у наукометричних базах Scopus та Web of Science віднесені до Q₂, та 1 тез доповіді у матеріалах міжнародного конгресу в Республіці Польща (стендова доповідь).

Особистий внесок здобувача

Спільно з науковим керівником визначені ключові напрямки, мета і завдання дослідження, дизайн, обрані методи дослідження, сформульовані висновки і практичні рекомендації. Здобувач самостійно проаналізував сучасну наукову літературу, приймав участь у плануванні та особисто виконав моделювання ПТСР і поведінкове тестування, молекулярно-біологічні дослідження, здійснив первинну обробку результатів досліджень, сформував електронну базу даних, статистично опрацював результати, підготував матеріали публікацій. Разом із співавторами написав та оформив наукові публікації. Запозичень ідей співавторів не було.

Перевірка на наявність текстових запозичень та порушень академічної доброчесності

У ході проведення досліджень та при перевірці матеріалів дисертації Порхала Д.Ф. уповноваженим органом Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України не було виявлено ознак академічного плагіату, фабрикації та фальсифікації. Текст представлених матеріалів дисертації є оригінальним на 99,8% та не містить порушень академічної доброчесності, про що видана довідка встановленого зразка.

Відповідність дисертації спеціальності та профілю спецради

Дисертація відповідає паспорту спеціальності «Біологія» і профілю одноразової спеціалізованої вченої ради.

Зауваження та питання

Дисертаційна робота Порхала Д.Ф. за змістом та оформленням відповідає існуючим вимогам. Однак у тексті дисертації є незначна кількість опісок друку, доцільно було б зазначати (наприклад, рис. 1.1-1.3), хто автор схеми чи з якого джерела вона запозичена, перелік літературних джерел має незначні недоліки оформлення.

При ознайомленні з роботою виникли деякі запитання та зауваження, які носять переважно методичний та дискусійний характер, а саме:

1. Чому використали утримання усіх тварин в умовах 12-годинного циклу світло/темрява і чи такий режим використовували протягом експерименту чи тільки на віварії? Як впливало штучне освітлення на тварин в умовах Вашого експерименту і чи це відобразилося на тваринах з ПТСР, мається на увазі, що гармонізація роботи ендокринної системи зменшила можливість моделювання ПТСР?

2. Відомо, у популяції існують особини з високою, середньою, низькою стійкістю до гіпоксії, яку легко визначити за методикою проф. Березовського В.Я. (1978). На базі кафедри патологічної фізіології нашого університету під керівництвом проф. Маркової О.О. виконано науково-дослідні роботи, які стосуються значимих відмінностей регуляторних

процесів, які забезпечують різну резистентність до гіпоксії. Чи враховували Ви це у своїх експериментах? Якщо ні, то які б на Вашу думку були результати у тварин з високою, середньою, низькою резистентністю до гіпоксії щодо показників HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α ?

3. У тесті «відкрите поле» (OFT) Ви підкреслюєте, що базова рухова активність у груп Контролю та ПТСР абсолютно однакова, що трактуєте збереженням загальної локомоції. У тесті ЕРМ уже зафіксовано зниження загальної пройденої дистанції, тобто загальне пригнічення локомоції на тлі підвищеної тривожності. Чи не свідчить зменшення пройденої відстані в тесті ЕРМ про елементи загальної моторної інгібіції або моторного заторможення (завмирання) в аверсивних умовах, а не лише про вибірккову зміну дослідження відкритих рукавів?

4. У дослідях розділу 3 Ви зазначаєте відсутність значущих змін для HIF-3 α через високу варіабельність вибірки, але робите висновок про «порушення механізму негативного зворотного зв'язку». На чому саме ґрунтується це твердження, якщо статистичний нуль-гіпотетичний поріг не пройдено? Чи плануєте Ви у разі продовження дослідження даної теми збільшити обсяг вибірки для подолання дисперсії даних по цій ізоформі?

Висловлені зауваження і запитання носять дискусійний характер, вони не впливають на позитивну оцінку роботи.

У плані наукової дискусії виникли наступні запитання:

1. Ви виявили чітку регіональну дисоціацію (активацію HIF-1 α та HIF-2 α у гіпокампі за відсутності змін у медіальній префронтальній корі) на 7-й день після SPS. Чи вважаєте Ви цей ефект суто специфічним через метаболічні особливості гіпокампа, чи це може бути наслідком часового відтермінованої молекулярної реакції кори, і як би на Вашу думку змінилася картина на 14-ту чи 28-му добу після індукції ПТСР?
2. Чому, на вашу думку, саме гіпобарична гіпоксія (Bar) продемонструвала найширший та найпослідовніший PTSD-селективний профіль пригнічення генів (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , PACAP), проте лише ІНТ забезпечило реальний анксиолітичний ефект у поведінкових тестах? Чи не свідчить це про те, що виміряні транскрипційні зміни мРНК не є первинним драйвером поведінкового одужання при ПТСР?

Висновок про відповідність дисертації вимогам, які висуваються до наукового ступеня доктора філософії

Дисертаційна робота Порхала Д. Ф. «Залежні від гіпоксії зміни експресії ізоформ фактору, що індукується гіпоксією, у гіпокампі та медіальній префронтальній корі при моделюванні посттравматичного стресового розладу», подана на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія», є самостійною науковою працею, що вирішує актуальне наукове завдання – встановлення ролі 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 актуальністю, методичним рівнем виконання, новизною, теоретичним і практичним значенням отриманих результатів обґрунтованістю наукових положень і висновків, їхньою достовірністю та повнотою викладу в публікаціях дисертаційна робота відповідає вимогам Наказу МОН України № 40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» та Постанови Кабінету Міністрів України № 44 від 12.01.2022 р. «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії», а її автор – Порхало Денис Федорович – заслуговує на присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційна опонентка:

завідувач кафедри патологічної фізіології
Тернопільського національного медичного
університету імені І.Я. Гобрачевського
Міністерства охорони здоров'я України,
докторка медичних наук, професорка

Ольга ДЕНЕФІЛЬ



завіряю
Засвідчує роботу з кадрових питань
Тернопільського національного
медичного університету