

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

доктора біологічних наук, професора кафедри біохімії та біотехнології
Карпатського національного університету ім. Василя Стефаника

Лушчака Володимира Івановича

на дисертаційну роботу

Порхала Дениса Федоровича

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

яка подана на спеціалізовану вчену раду PhD 16997 Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність проблематики дисертаційного дослідження

Посттравматичний стресовий розлад (ПТСР) належить до найпоширеніших психічних розладів і створює багато як медичних, так і соціально-економічних проблем. Це особливо виражене в місцях, де проходять бойові дії, зокрема в Україні. У цих умовах сильно зростає роль діагностики, профілактики та корекції ПТСР. Хоча на тепер розроблено багато перевірених підходів лікування цього стану, переважна більшість пацієнтів резистентні до терапії. Це й зумовлює нагальну потребу в розробці нових патогенетично та біохімічно обґрунтованих підходів боротьби з ПТСР.

Добре відомо, що хронічний психоемоційний стрес супроводжується тканинною гіпоксією, дисфункцією мітохондрій та оксидативним стресом, при яких можуть активуватися транскрипційні фактори родини HIF (Hypoxia-inducible factor), тобто фактори, які індукуються гіпоксією. Саме тому все більше й більше уваги приділяється саме вивченню ролі залежних від гіпоксії сигнальних шляхів. У біології добре відомо, що підвищення толерантності організму до одного типу стресу часто забезпечує підвищення толерантності до іншого типу стресу. Це явище отримало назву «перехресної адаптації» до дії стресу. Оскільки гіпоксія теж є досить сильним стресовим чинником, який можна до певної міри контролювати, вона може розглядатися як перспективний нефармакологічний засіб підвищення стійкості організму до дії екстремальних чинників. Саме розуміння біологічної основи дії різних стресів дало можливість авторови дисертації разом з керівником сформулювати ідею роботи, яка базується на систематичному порівнянні дії різних видів гіпоксії у контексті ПТСР. Однозначно, саме це визначає високу актуальність дисертаційного дослідження Дениса Порхала.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретична та практична значимість

Наукова новизна роботи полягає у тому, що в ній вперше:

1. Показано, що так званий SPS-індукований ПТСР, тобто ПТСР, який індукується single prolonged stress (SPS), тобто одноразовим тривалим стресом, супроводжується «регіон-специфічним підвищенням експресії генів» HIF-1 α та HIF-2 α у гіпокампі при відсутності достовірних змін параметру медіальній префронтальній корі (мПФК).
2. В межах єдиної роботи на одній когорті тварин проведено порівняльне дослідження трьох моделей гіпоксії – інтервального гіпоксичного тренування (ІНТ), гіпобаричної (Bar) та хімічної (CoCl) гіпоксії, що дало можливість оцінити залежності від дози та модальності їхньої дії;
3. Виявлений ПТСР-селективний анксиолітичний ефект інтервального гіпоксичного тренування виявився найефективнішим з трьох випробуваних гіпоксичних стресів і найкраще нормалізує «експресію» HIF-1 α , HIF-3 α і PAI-1 у травмованих тварин;
4. Виявлена унікальна специфічну для регіону дисоціація відповіді RASAP і HIF-2 α за умов гіпобаричної гіпоксії.

Теоретичне та практичне значення:

Отримані автором дані поглиблюють фундаментальні уявлення про молекулярні механізми розвитку та динаміки ПТСР у моделі гризунів. Завдяки використанню сучасних методів дослідження, вдалось обґрунтувати доцільність подальшої розробки інтервального гіпоксичного тренування (ІНТ) як кандидата нефармакологічного методу корекції асоційованих з травмами патологічних станів. Гіпокампальні ізоформи HIF-1 α та HIF-2 α запропоновано розглядати як потенційні молекулярні маркери ПТСР. Звичайно, в моделях на тваринах.

Практичне значення дисертаційного дослідження полягає у фундаментальному обґрунтуванні терапевтичного потенціалу м'якого інтервального гіпоксичного тренування (ІНТ) як високоефективного нефармакологічного методу корекції та модуляції асоційованих з травмами психоемоційних станів. Автор переконливо довів, що характер поведінкових і молекулярних наслідків ПТСР визначається саме модальністю гіпоксичного стимулу, що дозволяє рекомендувати параметри системи HIF (зокрема ізоформи HIF-1 α , HIF-3 α) та білку-мішені PAI-1 у гіпокампі як об'єктивні молекулярні маркери для оцінки успішності посттравматичної адаптації та прогнозування ефективності антистресової терапії. Звичайно, у модельних експериментах на тваринах. Для людей найкраще розвивати неінвазивні методи діагностики.

Саме контрольовані гіпоксичні процедури можуть розглядатися як перспективний нефармакологічний засіб підвищення стійкості організму до дії екстремальних чинників, зокрема психічних травм.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків

Дисертаційне дослідження Дениса Порхала характеризується високим методичним і методологічним рівнем. В роботі застосований адекватний комплекс сучасних дослідницьких підходів: експериментальне моделювання ПТСР (протокол SPS), набір поведінкових тестів з автоматизованим відеотрекінгом AnyMaze («відкрите поле», «піднесений хрестоподібний лабіринт», «темно-світла камера»), а також молекулярно-біологічні методи, зокрема для оцінки рівня транскриптів специфічних генів-мішенів на рівні іРНК використали RT-qPCR, або кількісну полімеразну реакцію в реальному часі.

Отримані дані проаналізовані з використанням відповідних матстатистичних методів (перевірка нормальності розподілу, ANOVA/Kruskal-Wallis, процедура Бенджаміні-Хохберга для контролю FDR, рангова кореляція Спірмена). Як на мене, то результати подані логічно і послідовно, а висновки та наукові положення належно обґрунтовані, достовірні й повністю впливають з проведеного обсягу експериментів. Робота з тваринами проведена з дотриманням відповідних норм біоетики.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана у відділі загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України в межах планових науково-дослідних тем (державні реєстраційні номери: № 0124U001685 та № 0118U007348).

Структура, обсяг та повнота викладення матеріалів дисертаційної роботи

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

Основні результати дисертації повністю оприлюднені у двох наукових статтях, які вийшли у двох престижних міжнародних фахових виданнях, які індексуються в базі даних Scopus, а саме в журналах **Brain and Behavior** та **Frontiers in Neuroscience**, Q2, а також апробовані на міжнародному науковому конгресі.

Питання, дискусійні положення та зауваження до дисертаційної роботи

Дисертаційна робота Дениса Порхала загалом викликає позитивне враження. Вона написана доброю українською мовою, хоча лінгвістичні нововведення від «фахівців», як то «уперше» – як на мене, природніше «вперше», дещо псує сприйняття тексту. Це якась штучна, а не жива природна народна українська мова. Автор добре володіє українською мовою, адже навіть у назві він вжив слово «фактору» замість тої форми, яка успішно насаджується русифікаторами «фактора».

При прочитанні роботи у мене виникли певні запитання та дискусійні зауваження:

Загальні питання:

1. Хоча назва роботи трохи задовга, зате вона чітко висвітлює суть роботи!
2. Варто було б провести ширшу апробацію результатів – одної конференції, як на мене, малувато.
3. Вступ загалом добрий, але варто було дати покликання на літературу – виглядало б переконливіше.
4. Варто зазначити зашироке, як на мене, використання кальок з англійської мови, наприклад, single prolonged stress (SPS) – краще «одноразовий тривалий стрес» (ОТС), діоксигеназ – краще диоксигеназ та ін.
5. Загалом – кореляційний аналіз не є прямим доказом залучення молекулярних механізмів.
6. Основний недолік використання хлориду кобальту для моделювання гіпоксії полягає в штучності цієї моделі, адже він стабілізує HIF- α в умовах нормоксії шляхом інгибування пролілгідроксилаз, оминаючи первинні реакції мітохондрій та ін. на реальний дефіцит кисню. Окрім того, індуковані йонами кобальту неспецифічна цитотоксичність та оксидативний стрес можуть викривляти фізіологічні механізми адаптації, що потребує обов'язкової перевірки отриманих даних у фізичній гіпоксичній камері, що реально й робили автори.

Конкретні моменти:

1. У роботі аналіз експресії факторів HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , PACAP та PAI-1 проводився виключно на рівні іРНК методом RT-qPCR. Точно висловлюючись, таким підходом можна оцінити лише один етап експресії генів – визначити відносний стаціонарний рівень специфічної іРНК. Далі, оскільки фактори родини HIF піддаються суттєвій посттрансляційній регуляції (зокрема деградації за нормальних умов), чи планується у подальшому перевірка виявлених змін на білковому рівні (наприклад, методом Western blot або імуногістохімії)? На майбутнє, ймовірно, варто було б визначати вміст PACAP та нейротрофічного фактору BDNF, бажано незрілої і зрілої форм.

2. Чим автор може пояснити таку чітку регіональну специфічність відповіді (достовірні зміни експресії HIF-1 α /2 α у гіпокампі та відсутність динаміки в медіальній префронтальній корі у відповідь на дію індукованого SPS стресу)? З чим пов'язані такі метаболічні або рецепторні відмінності між цими ділянками мозку?
3. В експерименті застосовувалися три принципово відмінні моделі гіпоксії (ІНТ, Bar, CoCl). Як Ви вважаєте, чому саме м'яке інтервальне гіпоксичне тренування виявилось найефективнішим у нормалізації поведінки та молекулярних маркерів, і чому «хімічна» гіпоксія (CoCl) не дала позитивного анксиолітичного ефекту? Чи не варто описати такий підхід як неадекватний і неприйнятний для моделювання гіпоксії у тварин. Я не виключаю, що на рівні культури клітин, такий підхід може спрацювати.
4. У вступній частині та розділі методів зазначено про використання інструменту ШІ (Claude Sonnet 4.5) для редагування стилю та мови рукопису. Чи залучалися подібні інструменти для автоматизації біоінформативного аналізу або написання первинного коду для статистичної обробки даних?
5. Ст. 20: «ПТСР розвивається й у цивільних осіб» – тут варто було б використати дані з України - Prevalence of stress, anxiety, and symptoms of post-traumatic stress disorder among Ukrainians after the first year of Russian invasion: a nationwide cross-sectional study The Lancet Regional Health - Europe, DOI:10.1016/j.lanepe.2023.100773.
6. Ст. 26: «Накопичення активних форм кисню» – вони нестійкі і тому не можуть накопичуватися. Мова має йти про відносний стаціонарний рівень АФК.
7. Рис. 1.1. краще було дати українською навіть якщо використовували BioRender.

Питання для дискусії:

1. Тут хотілося б почути трошки більше про те, як саме інтервальне гіпоксичне тренування (ІНТ) працює за принципом гормезису. Адже, дійсно, короткочасна нестача кисню може стабілізувати фактор HIF-1 α і викликати помірний оксидативний стрес. Згенеровані під час коливань кисню активні форми кисню (АФК) діють як сигнальні молекули, які запускають ендogenous антиоксидантну систему та нормалізують рівні HIF-3 α і PAI-1. Цей механізм може корегувати спричинений ПТСР оксидативний дисбаланс у гіпокампі та мПФК, відновлюючи нейропластичність, баланс ГАМК і серотоніну, що й забезпечує виражений анксиолітичний ефект. З практичного – як саме варто проводити у людей інтервальне гіпоксичне тренування?
2. Варто додати, що “парадоксальний профіль активності ГГН-осі: пацієнти мають чутливіші глюкокортикоїдні рецептори та нижчі рівні кортизолу зі зниженою добовою секрецією” може мати епігенетичне пояснення. Так

встановлено, що формування специфічного для ПТСР нейроендокринного фенотипу – поєднання низького рівня базового кортизолу з гіперчутливістю глюкокортикоїдних рецепторів мозку – зумовлене епігенетичними механізмами, зокрема гіпометилуванням промотору гену *NR3C1* та модифікацією гену *FKBP5*, що ламає класичну систему негативного зворотного зв'язку гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникової осі.

Зазначені зауваження та запитання мають переважно дискусійний характер і не знижують загальну високу наукову цінність виконаного дослідження.

Висновок офіційного опонента

Дисертаційна робота Порхала Дениса Федоровича «Залежні від гіпоксії зміни експресії ізоформ фактору, що індукується гіпоксією, у гіпокампі та медіальній префронтальній корі при моделюванні посттравматичного стресового розладу» є завершеною, самостійно виконаною науковою працею, яка містить нові науково обґрунтовані результати в галузі біології та вирішує важливе практичне й теоретичне завдання.

Представлена дисертаційна робота повністю відповідає вимогам Порядку присудження ступеня доктора філософії (постанова Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року зі змінами), вимогам до оформлення дисертацій (наказ МОН України № 40 від 12 січня 2017 року зі змінами), а її автор, Порхало Денис Федорович, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент

професор кафедри біохімії та біотехнології
Карпатського національного
університету ім. Василя Стефаника,
доктор біологічних наук, професор



Володимир ЛУЩАК

