

Голові разової спеціалізованої
вченої ради ДФ 20.051.188
Карпатського національного
університету імені Василя Стефаника,
доктору біологічних наук,
професору Семчишин Галині Миколаївні

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук, професора, професора кафедри біохімії та фізіології Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара МОН України Ушакової Галини Олександрівни на дисертаційну роботу Балацького Віталія Андрійовича «Взаємозв'язок між оксидативним стресом і запаленням у мишачій моделі посттравматичного стресового розладу», подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія.

Актуальність обраної теми. Дисертація присвячена дослідженню поведінкових та молекулярно-біохімічних змін у лабораторних тварин за умов моделей посттравматичного стресового розладу (ПТСР). ПТСР в Україні – це не лише клінічна проблема, а масштабний соціально-медичний феномен, що стрімко зростає, є надзвичайно актуальним науковим і клінічним напрямом, особливо після початку повномасштабної війни у 2022 році. Наукові публікації прямо підкреслюють, що ПТСР став «ключовим викликом психічному здоров'ю населення» за сучасних умов, оскільки значно зросла кількість травматичних подій (бойові дії, окупація, втрати, переміщення), одночасно розширилась популяція ризику (військові, цивільні, діти, ВПО), існує потреба у нових методах діагностики, профілактики та терапії. Експериментальні дослідження є критично необхідними, вони дозволяють адаптувати лікування до умов війни; забезпечують доказову базу для державної політики; допомагають зменшити довгострокові наслідки для суспільства.

Експериментальні дослідження, презентовані в даній дисертації, спрямовані на вирішення як теоретичних, так й практичних питань: пошуку ключових біохімічних маркерів, що віддзеркалюють стан посттравматичних розладів, за рахунок комплексного дослідження поведінкових, біохімічних та молекулярно-біологічних змін, які виникають у мишей під впливом різних типів стресових чинників, дія яких імітує розвиток симптомів ПТСР.

Головною метою дисертаційної роботи була перевірка відомих валідних експериментальних моделей посттравматичного стресового розладу (ПТСР) у

мишей і комплексна оцінка зумовлених ними поведінкових, запальних, оксидативних, імунних і метаболічних змін, а також з'ясування механізмів перебігу цього розладу.

Завдання роботи:

1. Перевірити експериментальні моделі ПТСР у мишей шляхом дії соціальної ізоляції, знерухомлення, електричної стимуляції стопи та звуків хижака. Порівняти поведінкові характеристики у мишей до і після дії стресових чинників за допомогою валідованих поведінкових тестів (відкритого поля, піднесеного плюс лабіринту, тесту на завмирання та тест на уподобання споживання сахарози, тест закопування кульок, тест спрощеного Т-лабіринту).

2. Визначити рівень біохімічних маркерів запалення (ІЛ-1 β , ІЛ-6), основних метаболітів плазми крові (глюкози, загального білку та холестерину) та показників оксидативного стресу (рівень пероксидів ліпідів, активність антиоксидантних ферментів) у корі головного мозку мишей.

3. Визначити зміни рівнів транскриптів генів, які пов'язані з запаленням, оксидативним стресом та метаболічною адаптацією методом ПЛР у реальному часі у тканинах головного мозку мишей з симптомами ПТСР.

4. Оцінити взаємозв'язок між поведінковими та метаболічними змінами. Об'єкт дослідження – лабораторні миші (*Mus musculus*), які зазнавали експериментального травматичного стресу. Предмет дослідження – поведінкові реакції, рівень експресії генів і біохімічні показники, пов'язані з запальною відповіддю та оксидативним стресом, у мозку мишей після дії стресових чинників.

Зв'язок теми дисертації роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано впродовж 2022-2025 років на кафедрі біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника, вона є частиною наукової тематики кафедри «Пошук маркерів посттравматичного стресового розладу на основі показників оксидативного стресу та запалення» (№ держреєстрації – 0123U101790).

Наукова новизна одержаних результатів.

Дисертантом вперше встановлено, що як гострі (обмеження руху, звук хижака (нявкання кота), удари електричним струмом в стопу (футшок)), так і хронічні (соціальна ізоляція) травматичні фактори викликають довготривалі зміни в імунній та метаболічній реакції самців мишей. Поведінкові зміни у мишей за таких видів індукції стресу не були довготривалими, на відміну від біохімічних. Показано, що специфічні типи стресу модулюють експресію ключових генів стресової (SGK1, PPARGC1A, FKBP5) та імунної (CCL2, CYP1A1, ІЛ-1 β) відповіді в корі головного мозку. Вперше виявлено, що стрес від звуку хижака достовірно підвищує кількість лейкоцитів, а соціальна ізоляція – рівень прозапальних маркерів навіть через п'ять місяців після впливу. Запропонована параоксоназа як потенційний маркер ПТСР, було показано що

активність цього ферменту була нижчою за індукції стресу. Вперше продемонстровано, що вплив одноразового тривалого стресу призводить до змін, які залежать від віку та статі: молоді самці після експозиції демонструють підвищену тривожність, а старі миші обох статей – погіршення пам'яті. Вперше виявлено, що можливість уникнення стимуляції стоп електричним струмом послаблює деякі негативні фізіологічні та метаболічні наслідки, незважаючи на збереження тривожних поведінкових реакцій.

Практичне значення одержаних результатів.

Отримані результати мають практичне значення для фундаментальної та прикладної нейробиології, психіатрії й фармакології. Комплексна оцінка поведінкових реакцій у поєднанні з біохімічними та молекулярно-біологічними маркерами запалення й оксидативного стресу дозволяє сформувати мультифакторну характеристику ПТСР-подібного стану у мишей. Це відкриває можливості для апробації нових фармакологічних і нефармакологічних засобів корекції постстресових розладів, включно зі спрямованими на модуляцію редокс-гомеостазу, запальної відповіді та нейропластичності. Також важливо зазначити що визначення активності параоксонази та мієлопероксидази у крові потенційно можуть бути запроваджені як додаткові маркери посттравматичного стресового розладу, що беззаперечно може мати певне медичне значення. Окрім того, дані цієї роботи можуть бути використані при розробці експериментальних протоколів для вивчення нейропротекторної дії перспективних сполук, дієтичних добавок або адаптогенів, а також при викладанні курсів нейрофізіології, біохімії мозку, психофармакології та патологічної фізіології. Результати цього дослідження були введені у курси занять з психофармакології та молекулярної нейробиології.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, які викладені у дисертаційній роботі.

Викладені у дисертації наукові положення та узагальнені на їх підставі висновки зроблені на основі отриманих власних експериментальних даних у відповідності з первинною документацією. Рівень обґрунтованості результатів проведених досліджень достатньо високий, використані сучасні фізіологічні, біохімічні, молекулярні методи досліджень, результати статистично опрацьовані. Кількість варіантів у когортах відповідає критеріям варіаційної статистики, що дозволило зробити обґрунтовані висновки. Робота виконана на високому методичному рівні із застосуванням сучасних методів досліджень, які є адекватними до поставленої мети та визначених завдань. Усі висновки відповідають змісту роботи.

Аналіз дисертаційної роботи. Дисертація складається з традиційних розділів: вступу, 6 розділів, висновків, списку використаних джерел. Робота викладена на 191 сторінці, містить 27 рисунків і 6 таблиць.

Загальна характеристика роботи. Дисертація містить усі розділи, передбачені вимогами до оформлення дисертації згідно з Наказом МОН України «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» № 40 від 12.01.2017 року (зі змінами), а також у відповідності з Постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року (зі змінами).

У *анотації* детально викладені основні результати власних експериментальних наукових досліджень, які отримані при виконанні дисертаційної роботи, а також подано список власних публікацій.

У *вступі* наведено актуальність обраної теми, мету, завдання роботи, наукову новизну, практичне значення одержаних результатів, особистий внесок здобувача у виконанні дисертаційної роботи, відображена апробація результатів роботи, основні положення дисертації та методи, які застосовані для вирішення поставлених завдань.

Розділ 1. Огляд літератури включає 6 підрозділів, що викладенні з 26 по 59 сторінках, де дисертант наводить і узагальнює дані іноземної та вітчизняної літератури за тематикою дисертаційної роботи, а саме:

- 1.1. Вступ до проблеми посттравматичного стресового розладу
- 1.2. Тваринні моделі ПТСР
- 1.3. Типи стресорів і їхній вплив на психоемоційний стан
- 1.4. Взаємозв'язок між ПТСР та запаленням
- 1.5. ПТСР та оксидативний стрес
- 1.6. Метаболічні порушення на фоні ПТСР

Розділ 2 «Матеріали і методи дослідження» характеризує дизайн досліджень, об'єкти, матеріали, обладнання та методи досліджень. Дослідження проведені на достатній кількості експериментального матеріалу (модельні експерименти на мишах). Використані методи досліджень проводились на сучасному обладнанні, мають високий науковий та методичний рівень, відповідають меті та завданням роботи. Застосовані методи:

- фізіологічні (гематологічні методи, оцінка поведінки мишей у тесті відкритого поля, піднесеного плюс лабіринту, тест на перевагу сахарози, спрощений Т-лабіринт),
- біохімічні (визначення вмісту 22 метаболітів – глюкози, триацилгліцеролів і загального білку), активностей антиоксидантних і пов'язаних з ними ферментів (супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, глутатіон-S-трансферази, глюкозо-6- фосфатдегідрогенази, НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктази 1), маркерів оксидативного стресу (рівнів пероксидів ліпідів),
- молекулярно-біологічні методи (оцінка транскрипції генів методом кількісної ПЛР, гель-електрофорез білків),
- методи математичної статистики.

Дисертаційна робота проведена з дотриманням вимог норм біоетики, біологічної безпеки та правил роботи з експериментальними тваринами.

У *розділі 3 «Результати досліджень»* дисертант детально представив та проаналізував власно отримані експериментальні дані «Довготривалі ефекти фізичних, соціальних та психологічних стресових факторів». Презентовані

результати тестів відкритого поля проведених на мишах, які піддавались впливу різних стресорів, визначено вплив стресу соціальної ізоляції, звуків хижака та знерухомлення на імунологічні, гематологічні та біохімічні показники крові мишей, експериментально доведено вплив стресу на активність антиоксидантних ферментів, та рівні мРНК генів, пов'язаних із сигналами стресу та запаленням у корі головного мозку.

У розділі 4 «Вікові та статеві особливості впливу одноразового тривалого стресу на поведінкові, гематологічні та біохімічні параметри у мишей C57BL/6J» визначено вплив одноразового тривалого стресу на поведінкові реакції та пам'ять у мишей різного віку та статі та залежність гематологічних показників мишей від статі та віку за умов впливу даного типу стресу. Встановлено, що одноразовий тривалий стрес викликає незначні зміни в параметрах оксидативного стресу в корі головного мозку та проміжному мозку мишей.

У розділі 5 презентовані власні результати дослідження «Впливу стресу стимуляцією електричним струмом, якого можна уникнути, на поведінкові та метаболічні показники мишей».

У розділі 6 наведено узагальнення результатів на 4 сторінках, де дисертант наводить таблицю (Таблиця 6.1. Узагальнення змін показників у різних моделях викликання ПТСР), яка сформована на базі власно отриманих експериментальних даних.

Усі розділи написані професійною науковою мовою, обґрунтовано подано осмислення власних результатів експериментальної роботи, добре ілюстровано графіками та схемами, що характеризує дисертанта як висококваліфікованого самостійного науковця, котрий може планувати, реалізовувати та аналізувати наукові дані, добре розуміється на молекулярно-біохімічних механізмах реакції на стрес.

Висновки дисертації ґрунтуються на результатах власних експериментальних досліджень, всього сформульовано 6 ключових висновків, які мають практичне спрямування стосовно комплексної перевірки експериментальних моделей ПТСР у мишей, що дозволило детально описати динаміку поведінкових, молекулярно-генетичних, метаболічних та імунологічних змін.

Відсутність порушень академічної доброчесності. За результатами перевірки та аналізу матеріалів дисертаційної роботи Балацького Віталія Андрійовича «Взаємозв'язок між оксидативним стресом і запаленням у мишачій моделі посттравматичного стресового розладу», не виявлено ознак академічного плагіату, самоплагіату, фабрикації та фальсифікації.

Відомості щодо проведення біоетичної експертизи дисертації.

Дослідження здійснювалося з дотриманням принципів гуманного поводження, що відповідають концепції 3R, а також згідно з Директивою 2010/63/ЄС Європейського парламенту та Ради щодо охорони тварин, які використовуються для наукових цілей.

Оцінка мови і стилю викладення матеріалу дисертації.

Мова і стиль викладення матеріалу дисертації відповідають вимогам академічного письма.

Відповідність дисертації встановленим вимогам. Робота виконана на належному методичному рівні та відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року (зі змінами) та Наказу МОН України «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» № 40 від 12.01.2017 року (зі змінами).

Повнота викладу основних положень дисертації в опублікованих працях. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковані 10 праць, зокрема три статті – у міжнародних наукових виданнях, які індексуються наукометричними базами даних Scopus та Web of Science та відносяться до другого і третього квартилів (Q2 і Q3) відповідно до класифікації SCImago Journal, та 7 тез доповідей наукових конференцій

Зауваження та запитання, які виникли при аналізі дисертаційної роботи.

1. Які кореляційні зв'язки між поведінковими та молекулярно-біохімічними даними ваших власних експериментальних досліджень можуть скласти основу первинного тесту на ПТСР?
2. Які відмінності тривалого та хронічного стресу?
3. Утримання тварин здійснювалося з дотриманням принципів гуманного поводження, що відповідають концепції 3R, а також згідно з Директивою 2010/63/ЄС Європейського парламенту та Ради щодо охорони тварин, які використовуються для наукових цілей. Бажано безпосередньо вказувати номер протоколу локального Комітету з біоетики.
4. У Практичні результати бажано було вказати дані Акту впровадження (додаток 2).
5. Невдала назва рис. 3.10. Узагальнююча схема (чого?).
6. Чому більшість досліджень проведена у корі великих півкуль, а не в гіпокампі або амігдалі (або інших відділах головного мозку)?
7. Чому для трьох експериментальних частин застосовували різні статистичні методи? Чи проводили кореляцію між даними трьох незалежних експериментів?
8. Яким чином можна диференціювати ПТСР від хронічного метаболічного розладу або інфекції?

Висловлені запитання та зауваження жодним чином не знижують загальне позитивне враження про дисертаційну роботу, її новизну та наукове-прикладне значення.

Висновок

Дисертаційна робота Балацького Віталія Андрійовича «Взаємозв'язок між оксидативним стресом і запаленням у мишачій моделі посттравматичного стресового розладу» є завершеною науковою працею, результати даної роботи широко презентовані у відкритому науковому просторі, обговорені на профільних наукових конференціях, не містять плагіату, не містять порушення авторського права та основ біоетики.

Вважаю, що дисертація Балацького Віталія Андрійовича містить авторське новітнє вирішення наукового завдання. Дисертаційна робота за своєю актуальністю, об'ємом отриманих результатів, новизною та науково-практичною значимістю отриманих результатів відповідає вимогам передбаченим наказом Міністерства освіти і науки України № 40 від 12.01.2017р. (зі змінами) «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», а також «Порядком присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року № 44 (зі змінами), а її автор заслуговує на присвоєння наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія.

Офіційний опонент:

професор кафедри біохімії та фізіології
Дніпровського національного університету
імені Олеся Гончара МОН України
доктор біологічних наук,
професор

Галина УШАКОВА

