

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Портніченка Володимира Ілліча «Механізми розвитку гіпометаболічного стану при гіпоксії та нові підходи до патогенетичної корекції гіпоксичних і метаболічних порушень», представлену до офіційного захисту в спеціалізовану вчену раду Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія.

Актуальність обраної теми. Проблема патогенезу наслідків гострої та хронічної гіпоксії завжди була у центрі уваги патофізіологів. Широкого визнання набули дослідження вчених Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України – М.М. Сиротініна, В.А. Березовського, М.М. Середенка, А.З. Колчинської, І.М. Маньковської, Т.В.Серебровської, П.В. Білошицького, Левашова М.І., А.Г. і В.І. Портніченків та інших. Сьогодення висунуло нові виклики завдяки розвитку авіації, космічної галузі, підводних будівельних робіт, транспортних засобів і технологій, і не в останню чергу – альпінізму і високогорному туризму. Нарешті, гіпоксія супроводжує чимало хвороб, а останнім часом – захворювання на Covid-19, який вражає легені.

Зменшення інтенсивності енергетичного метаболізму, яке супроводжує гіпоксичний стан, розглядають як реакцію адаптації до нестачі кисню. Сучасна молекулярна фізіологія вдихнула нове життя у розробку патогенезу гіпометаболічного стану, індукованого гіпоксією, і спонукала до пошуків нових методів лікування супутньої патології. Саме ця ідея лягла в основу докторської дисертації В.І. Портніченка, що й зумовило її актуальність. Несподівані виклики, які поставило перед людством сьогодення, а саме, коронавірусна пандемія Covid-19, збільшило у рази актуальність дисертаційної роботи В.І.Портніченка, адже саме респіраторна гіпоксія є провідним патогенетичним чинником даної хвороби і головною причиною летального виходу.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність, повнота їх викладу в опублікованих працях та авторефераті.

Як свідчить загальний аналіз дисертаційної роботи, здобувач розробив план дослідження у відповідності до мети і завдань., обрав сучасні та адекватні методи, і завдяки успішно виконаним дослідженням, творчому підходу і прискіпливому аналізу результатів досяг поставленої мети. У результаті виконання отримано науково обґрунтовані нові дані, які мають не лише суто теоретичне значення, але й вказують на нові підходи до лікування респіраторної гіпоксії та цукрового діабету.

Основні наукові положення, висновки і практичні рекомендації, які містить дисертаційна робота В.І. Портніченка, аргументовано результатами численних експериментальних і клінічних досліджень з використанням великого спектру сучасних методів – експериментального моделювання на щурах гострої та хронічної гіпоксії, цукрового діабету, іммобілізаційного стресу, респіраторної патології, методів дослідження газообміну, дихальної функції ізольованих мітохондрій, вуглеводного та ліпідного обмінів, визначення експресії мРНК і білків у тканинах і лейкоцитах, гістологічної будови міокарда і легень. Значну частину роботи займають клінічні дослідження на здорових добровольцях і хворих на цукровий діабет першого і другого типів, метаболічний синдром – жителів рівнини і середньогір'я. Здобувач використав умови хронічної помірної гіпоксії середньогір'я для проведення клінічних досліджень на базі міжнародної центру в Приельбруссі..

Відтак, докторська дисертація В.І.Портніченка є класичною патофізіологічною працею, адже в ній є все, що відповідає цій спеціальності: експериментальне моделювання патології на тваринах, методи клінічної патофізіології, розкриття і аналіз механізмів і закономірностей розвитку досліджуваної патології, і на підставі цього запропоновано патогенетично

обґрунтовані шляхи корекції енергетичного стану організму в умовах гіпоксії та при цукровому діабеті. Саме при цукровому діабеті через глікування гемоглобіну зменшується кисневотранспортна спроможність еритроцитів.

Робота без перебільшення вражає різноманітністю дослідженої патології, експериментальних підходів, надзвичайно високим науково-методичним рівнем, який відповідає світовим стандартам і завданням досліджень. Таких масштабних за обсягом і різноманітністю патофізіологічних підходів досліджень у сучасній патофізіологічній науці не так вже й багато, і не тільки в Україні. Тому не дивно, що вона виконувалась протягом більш як 15 років.

Усе вищезазначене у сукупності з ретельним статистичним обробленням отриманих даних зумовило аргументованість, обґрунтованість і достовірність основних положень і висновків роботи. Висновки базуються на вірогідних результатах власних досліджень здобувача, вони відповідають меті і задачам роботи, характеризуються новизною.

Автореферат і публікації автора роботи повно віддзеркалюють основний зміст дисертації. За результатами дисертаційного дослідження опубліковано 62 наукові роботи, з яких 30 статей у фахових вітчизняних та закордонних виданнях. 13 статей входять до бази даних Web of Science, Scopus з них 3 статті у виданнях Q1, 4 - в Q2 і 1 - в Q3. Результати роботи відображені у 2 патентах та 33 тезах доповідей у матеріалах вітчизняних і міжнародних наукових конференцій.

Новизна результатів роботи, наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, є очевидною.

Завдяки численним експериментам і спостереженням, В.І.Портніченко вичленив послідовні фази змін газообміну у відповідь на різні види гіпоксії (гостру, хронічну, періодичну), а саме, гіпометаболічну, перехідну, гіперметаболічну та адаптивну. Кожна з цих фаз має особливості дихання, альвеолярної вентиляції, газообміну, мітохондріального дихання. Здобувач довів, що гіпометаболічна фаза характеризується роз'єднанням

окислювального фосфорилування, а гіперметаболічна – навпаки, посиленням даного біохімічного процесу. Вперше встановлено, що гіпометаболічна фаза характеризується переважним окисненням мітохондріями флавінаденіндинуклеотид-залежних субстратів, а гіперметаболічна – окисненням НАД-залежних субстратів, в тому числі, ліпідних, та зростанням окисного фосфорилування. Хоча було відомо, що послаблення енергетичного метаболізму при гіпоксії зумовлено зменшенням синтезу АТФ, В.І.Портніченко встановив зв'язок змін утворення АТФ із описаними ним фазами метаболічних змін. Виявлено, що в механізмах фазових змін енергетичного метаболізму при іммобілізаційному стресі у щурів суттєву роль грають зміни секреції кортикостерону. Важливим здобутком дисертанта стало виявлення статевих, вікових і генетично-обумовлених особливостей змін енергетичного стану при гіпоксії.

Здобувач вперше показав, що індукований гіпоксією розвиток гіпометаболічного стану асоційований із зростанням експресії фактора HIF-1 α , а у гіперметаболічній фазі із переважним зростанням експресії HIF-3 α . Ці гіпоксичні фактори змінюють експресію захисних і адаптивних генів. Зокрема, встановлено участь NO-залежного відкривання K_{АТФ}-каналів мітохондрій і зниження споживання кисню, а також участі Akt-залежних сигнальних шляхів та кавеоліну-3 в патогенезі гіпометаболічного стану. Стосовно вуглеводного обміну чітко показано закономірності виникнення гіпоглікемії при різних видах гіпоксії та механізми її розвитку, які полягають в активації гліколізу та опосередкованим фактором HIF-1 зростанні експресії транспортерів глюкози GLUT1 та GLUT4. Вперше із застосуванням складного математичного апарату розроблена математична модель розвитку гіпометаболічного стану при гіпоксії, завдяки якій стало можливим передбачати зміни кисневих параметрів і кровообігу при різних видах гіпоксії.

В.І.Портніченко не обмежився вивченням патогенезу гіпометаболічного стану при гострій експериментальній пневмонії, яка характеризується респіраторною недостатністю, а довів позитивний терапевтичний ефект препарату наночастинок діоксиду церію.

Для клінічної діабетології важливе значення має доведена В.І.Портніченком ефективність розроблених ним режимів хронічної гіпоксії та інтервальної гіпоксії при діабеті 1 і 2 типів на початкових стадіях захворювання і з'ясування відповідних механізмів. Вони опосередковуються HIF-1 α -залежною індукцією рецепторів інсуліну, транспортерів глюкози SLC2, субодиниць K_{ATP}-каналів KCNJ8, лептину на різних фазах метаболічної відповіді.

Теоретичне та практичне значення результатів дослідження. Сукупність наведених у дисертації результатів дозволяє характеризувати їх як такі, що є новими і важливими для патологічної фізіології. Робота демонструє, як патофізіологічне дослідження трансформується у практичні рекомендації та їх клінічну реалізацію.

Структура і зміст дисертації. Дисертаційна робота В.І.Портніченка побудована згідно з вимогами МОН України, викладена українською мовою на 334 сторінках та ілюстрована 134 рисунками і 14 таблицями. Слід відзначити відносну простоту і доступність для читача та наочність ілюстративного матеріалу. Текст дисертації складається з вступу, огляду літератури, опису методики, 7 розділів з результатами власних досліджень, аналізу цих результатів, висновки та список літератури, який налічує 512 джерел.

У вступній частині дисертації обґрунтовується актуальність проблеми, мета і завдання дослідження, визначається новизна наукових досліджень, практичне значення отриманих результатів та особистий внесок здобувача в дисертаційну роботу.

В огляді літератури автор описує сучасний стан досліджуваної проблеми. Послідовно викладено сучасні дані про особливості змін метаболізму при гіпоксії, а також історичний розвиток досліджень гіпометаболічного стану різного генезу. Описано особливості розвитку гіпометаболічного стану у різних видів тварин, при поєднаному впливі на організм гіпоксії та холоду, проаналізовано участь різних тканин у підтримці енергетичного обміну у цих тварин. Базуючись на відомостях про зміни патерну дихання при гіпометаболічному стані, автор приходить до важливого висновку про те, що розвиток гіпометаболічного стану - це процес, повністю контрольований організмом. В подальших підрозділах огляду літератури автор зупиняється на особливостях впливу періодичної гіпоксії, гіпоксичного стану при стресі. Також автор висвітлює участь різних факторів у механізмах, які впливають на розвиток гіпометаболічного стану при різних видах гіпоксії, це і особливості жирового обміну при гіпоксії, фактора транскрипції HIF-1 та його генів-мішеней, роль системи оксиду азоту і K_{ATP} -каналів в реакціях на гіпоксію, інгібіторів ангіотензин-перетворюючого ферменту та інших. Окрему частину огляду літератури займає аналіз впливу високогірної гіпоксії на організм людини і тварин, та особливості її впливу на енергетичний обмін. Висвітлено виникнення гіпоглікемії при адаптації до високогір'я та показано імовірні механізми її розвитку. Також висвітлено особливості розвитку цукрового діабету у горах. В підсумку, автор приходить до висновку, що розвиток гіпометаболічного стану при різних видах гіпоксії вкрай недостатньо охарактеризований і потребує додаткового вивчення, , потребують деталізації особливості змін енергетичного вуглеводного і ліпідного метаболізму при гіпоксичних впливах, відмінності метаболічної регуляції у відповідь на гіпоксію у людини і тварин з метаболічними розладами, системні і молекулярні механізми цих процесів, а також можливості використання гіпоксичних і

фармакологічних впливів для корекції цих механізмів, що і визначило завдання цієї роботи.

У другому розділі дисертації викладено опис дизайну дослідження, методичні підходи моделювання гіпоксичних впливів та іммобілізаційного стресу. Охарактеризовано методи дослідження патерну дихання, газообміну та альвеолярної вентиляції, температури тіла. Описано методи проведення біохімічних досліджень (глюкоза крові, ліпідограма, концентрація кортикостерону). Викладено методи дослідження функції ізольованих мітохондрій печінки і серця, визначення експресії мРНК і білків. Висвітлено методичні підходи клінічних досліджень у горах і на рівнині. Детально охарактеризовано методи статистичного аналізу.

У третьому розділі наведено результати експериментальних досліджень розвитку гіпометаболічного стану при впливі гострій гіпоксії і в періоді відновлення після гострої гіпоксії. Внаслідок детального дослідження динаміки змін патерну дихання, глюкози крові, температури тіла, альвеолярної вентиляції, ефективності дихання, мітохондріального дихання автором виявлено фазові зміни метаболізму після впливу гострої гіпоксії. Показано морфологічні передумови виникнення гіпометаболічного стану. При дослідженні функції мітохондрій з використанням різних субстратів окиснення встановлено роль цих органел у формуванні фазових змін метаболізму в періоді відновлення після гострої гіпоксії. При молекулярно-генетичних дослідженнях виявлено, що в розвитку фазових змін ключову роль відіграють зміни експресії факторів транскрипції HIF-1 α і HIF-3 α . Показано динаміку змін HIF-1 α -опосередкованої експресії мітохондріального антиоксидантного фермента MnSOD, скаффолд-протеїна кавеоліну-3 та кінази Акт після гострого гіпоксичного впливу в правому і лівому шлуночках серця. Представлено вікові особливості розвитку гіпометаболічного стану у старих і молодих щурів та висвітлено роль NO в цих змінах. Встановлено роль K_{ATP}-залежних каналів у розвитку

гіпометаболічного стану після гострої гіпоксії, а також вплив блокаторів ангіотензин-перетворюючого ферменту на розвиток гіпоксичної вазоконстрикції.

У четвертому розділі дисертаційної роботи висвітлено основні закономірності впливу періодичної гіпоксії на паттерн дихання, газообмін, альвеолярну вентиляцію, ефективність дихання та термогенез, охарактеризовано статеві відмінності цих проявів у щурів. Встановлено подібність впливу гострої та періодичної гіпоксії на розвиток фазових змін енергетичного метаболізму, але й відмінності цих гіпоксичних впливів щодо термінів виникнення метаболічних змін. Це підтверджено даними, одержаними при вивченні мітохондріального дихання у цих тварин і при визначенні експресії HIF-1 α та HIF-3 α .

У п'ятому розділі наведено результати кількох серій досліджень впливу хронічної гіпоксії на організм людини та експериментальних тварин у середньогір'ї. Аналізується вплив різних режимів адаптації до хронічної гіпоксії на організм адаптованих і неадаптованих експериментальних тварин, показано особливості змін патерну дихання, газообміну, альвеолярної вентиляції на початку і через чотири тижні адаптації. У щурів, адаптованих до середньогір'я, також проводили дослідження впливу гострої і періодичної гіпоксії. Показано зміни у молекулярних механізмах відповіді організму на гостру гіпоксію внаслідок переходу роботи мітохондрій на більш економічний, але менш продуктивний функціональний рівень. Натомість періодичні гіпоксичні впливи редукували гіпометаболічний стан, при цьому спостерігалось зменшення індукції HIF-3 α , HSP70 і iNOS та посилення регенерації тканин.

При молекулярних дослідженнях встановлено, що гостра гіпоксія активує інсулінозалежні шляхи метаболічної адаптації (GLUT-4). При тривалій адаптації ці механізми обмежуються, а посилений метаболізм забезпечується через індукцію інсулінонезалежних ланок (GLUT-1, IGF-1) та

стрес-реактивну регуляцію. Представлено морфологічні зміни в органах при довготривалій адаптації до середньогір'я і після впливу гострої гіпоксії, які свідчать, що розвиток гіпометаболічного стану через добу обумовлюється перш за все активацією процесів очищення тканин від пошкоджених елементів, а самі тканини переходять до економного режиму функціонування.

Шостий розділ присвячений результатам досліджень розвитку гіпометаболічного стану при гострому імобілізаційному стресі. Базуючись на відомостях щодо наявності тканинної гіпоксії при стресі та аналізуючи показники патерну дихання, газообміну, альвеолярної вентиляції, автор встановив, що при гострому стресі також розвивається гіпометаболічний стан, залежний від активації K_{ATP} -каналів. Встановлено наявність перехресної метаболічної адаптації до періодичної інтервальної гіпоксії і стресу. При дослідженні динаміки змін енергетичного обміну, дихання і функції мітохондрій при хронічному стресі, встановлено наявність фазових змін метаболізму, подібних до таких при гострій і періодичній гіпоксії. Проте вони мали свої особливості, пов'язані з більшою активацією стрес-реактивних систем, гіперглікемію і підвищенням температури тіла після сеансів стресу. Представлені дані антиоксидантно-прооксидантного гомеостазу при моделюванні хронічного стресу. Встановлено роль кортикостерону у фазових змінах метаболізму: в гіпометаболічній фазі його рівень зростав, а в гіперметаболічній падав.

У сьомому розділі описано розвиток гіпометаболічного стану при деяких інших видах гіпоксії. При моделюванні первинної тканинної гіпоксії шляхом пригнічення функції 1 комплексу електронтранспортного ланцюга мітохондрій встановлено зміни патерну дихання і кисеньзалежної частини енергетичного метаболізму, які свідчать про його фазовий характер. Автором зроблено припущення, що фазові зміни відбуваються автоматично при досягненні необхідного рівня показників, які виступають тригером і

запускають енергетичний обмін. Ці процеси не обмежуються здатністю кисеньтранспортної системи щодо доставки кисню, необхідного для забезпеченню рівня його споживання тканинами, що призводить до загибелі частини тварин при настанні гіперметаболічної фази.

У другій половині розділу аналізується розвиток респіраторної гіпоксії при експериментальній пневмонії, показано пригнічення енергетичного метаболізму, встановлено можливість корекції цього стану препаратом наночастинок діоксиду церію і вітофілом.

У восьмому розділі автор аналізує розвиток гіпометаболічного стану при гіпоксії. Автором продемонстровано, що тривала адаптація щурів до умов середньогір'я змінює системну і метаболічну відповідь на гостру гіпоксію, зростає ефективність використання кисню мітохондріями і резервна потужність мітохондріального дихання. Описано метаболічну перебудову в динаміці впливу високогірної гіпоксії на здорових добровольців та осіб з порушеним метаболізмом, в тому числі, позитивний ефект перебування у середньогір'ї для оптимізації метаболізму глюкози і холестерину у хворих з метаболічним синдромом, предіабетом, цукровим діабетом 1 і 2 типу. Показано участь у цих перебудовах IGF-1 та лептину.

Представлено результати впливу переривчастої інтервальної гіпоксії у здорових добровольців і хворих з метаболічним синдромом та предіабетом. Виявлено значну активацію експресії гена HIF-1 α в гіпометаболічній фазі, що супроводжувалося зростанням експресії транспортерів глюкози, а у відтермінованому періоді – інсулінових рецепторів та субодиниць K_{ATP}-каналів, що є сприятливим для відновлення параметрів вуглеводного метаболізму у хворих, яке і спостерігалось у клінічному дослідженні.

У дев'ятому розділі дисертант представляє дані по математичному моделюванню гіпометаболічного стану при гіпоксії і математично доводить, що наявність гіпометаболізму необхідна для компенсації гіпоксичного

впливу, оскільки без цього стану рівень напруги кисню у тканинах буде мати від'ємні величини.

У **десятому розділі** автор ретельно аналізує одержані результати і дані літератури і підсумовує, що основною реакцією на вплив різних видів гіпоксії є розвиток гіпометаболічного стану, пов'язаного з порушенням синтезу АТФ в клітинах. Внаслідок дії гіпоксії спостерігається пошкодження тканин, мітохондріальна дисфункція, зниження окиснення НАД-залежних і домінування окиснення ФАД-залежних субстратів, розвиток окисного стресу і зміни термогенезу. Комплексні зміни метаболічних параметрів, прояви і механізми фазових змін метаболізму, охарактеризованих автором, вказують на спільні риси стрес-реактивних механізмів та відповіді на гіпоксію. Детально охарактеризовано перебіг та виявлено мітохондріальні і молекулярні механізми розвитку наступних фаз метаболічної перебудови - перехідної, гіперметаболічної та адаптивної.

Визначено, що головною причиною розвитку гіпоглікемії при впливі гіпоксії є активація гліколізу, а ключову роль у його розвитку відіграє активація факторів HIF-1 α і HIF-3 α , які підвищують експресію захисних і адаптивних генів. Активація комплексу зазначених механізмів є основою сприятливого впливу гіпоксії на гомеостаз глюкози та ліпідів у хворих на діабет, на підставі чого автором розроблено і рекомендовано режими корекції.

Висновки дисертаційної роботи підсумовують і узагальнюють одержані результати.

Вісім **висновків** дисертації відповідають поставленій меті і завданням наукового дослідження. Вони чітко сформульовані, аргументовані результатами власних досліджень і, що особливо заслуговує на схвалення, не повторюють конкретні результати роботи з відповідними цифрами, а мають узагальнюючий характер.

Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації.

Принципових зауважень до змісту й оформлення дисертації, які могли б вплинути на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи, немає. Однак привертають увагу деякі недоліки. Наприклад, у списку літератури переважають публікації 10-20 річної давнини, хоча є посилання і на сучасну літературу. Ймовірно, це пояснюється тим, що робота була розпочата досить давно.

В огляді літератури (с. 38) автором клонування гену лептину названо Zhang, першого автора публікації в Nature у 1994 році. Але провідним вченим і керівником роботи був Джеффри Фрідман з Рокфелеровського університету в Нью-Йорку. Автор відзиву на дисертацію особисто зустрічався з Фрідманом у Відні і був поінформований про історію цього відкриття.

Загалом здобувач написав дисертацію професійною науковою мовою, з гарною стилістикою, але зустрічаються й жаргонні вирази. Наприклад, автор вживає терміни «ліве серце» і «праве серце», в той час як ліве передсердя і лівий шлуночок у сукупності правильно називати «артеріальним серцем», а праві камери серця – відповідно, венозним серцем.

Запитання до здобувача:

1. Ви встановили, що рівень готовності кисневотранспортної системи до підвищення метаболічних потреб тканин у гіперметаболічній фазі відповіді на гіпоксію не відповідає потребам організму, і це є загрозою погіршення стану здоров'я аж до летального наслідку. Яка Ваша думка щодо можливого застосування специфічних гіпометаболічних засобів (і чи існують такі?) для боротьби з кисневою недостатністю при захворюванні на ковід-19? Чи доцільно, наприклад, використовувати штучну гібернацію?

2. Автор розглядає гліколіз як одну з вагомих причин змін рівня глікемії у своїх експериментальних і клінічних дослідженнях..

Чи цей механізм функціонує за нормоксичних умов, наприклад, вже після впливу гіпоксичних сеансів?

3. На жаль, опонент не знайшов у дисертації відомостей про дозу і спосіб введення ліпополісахариду. Отже, яку дозу ліпополісахариду Ви використовували для моделювання пневмонії і в якому режимі?

4. Чим можна пояснити дещо завищену концентрацію кортикостерону в плазмі крові контрольних щурів (приблизно 1200 наномоль/л) у стані спокою?

Загальний висновок

Дисертація Портніченка Володимира Ілліча «Механізми розвитку гіпометаболічного стану при гіпоксії та нові підходи до патогенетичної корекції гіпоксичних і метаболічних порушень», представлена до офіційного захисту в спеціалізовану вчену раду Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія, є ґрунтовним завершеним науковим дослідженням. Вона відповідає спеціальності «патологічна фізіологія», вирішує актуальну проблему патогенезу метаболічних порушень при гіпоксії, обґрунтовує позитивний терапевтичний ефект періодичної гіпоксії. За актуальністю, теоретичним і практичним значенням, науковою новизною, науково-методичним рівнем робота відповідає сучасним вимогам щодо докторських дисертацій, викладеним у п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів», затверджену постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р. (зі змінами та доповненнями). Портніченко Володимир Ілліч

безперечно заслуговує на присудження наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія.

Офіційний опонент,
доктор медичних наук, професор,
член-кореспондент НАН України, академік НАМН України,
Заслужений діяч науки і техніки України,
завідувач відділу ендокринології репродукції та адаптації
ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин
ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

31.03.2021 р.

Резніков О.Г.

