

ВІДГУК

офіційного опонента доктора медичних наук, професора, Корзуна Віталія Наумовича на дисертаційну роботу Зигало Віктора Миколайовича на тему: «Вплив інкорпорованого ^{137}Cs і $4a/4b$ поліморфізму гена eNOS на NO-синтазну активність ендотелію та корекція її порушень у дітей», подану до офіційного захисту на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.01 – радіобіологія

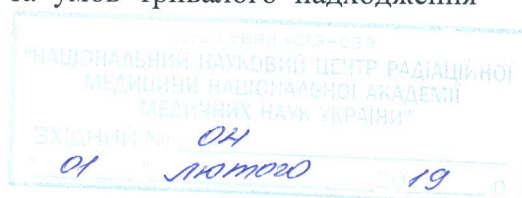
Актуальність обраної теми. Дисертаційна робота В. М. Зигало присвячена одній з найбільш складних та дискусійних проблем сучасної радіобіології та радіаційної медицини – дослідженню несприятливих ефектів Чорнобильської катастрофи у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій.

В результаті Чорнобильської катастрофи радіоактивного забруднення зазнали величезні території України. Утворилося тривалодіюче джерело внутрішнього опромінення у зв'язку з надходженням радіонуклідів у сільськогосподарські культури, продукти харчування, а з ними до організму, що сприяє виникненню порушень у функціонуванні різних органів та систем, котрі з плином часу трансформуються у хронічну соматичну патологію. Роботами чисельних авторів доведено, що діти, які мешкають за умов тривалого надходження ^{137}Cs до організму, мають низький рівень здоров'я. Впродовж усього післяаварійного періоду спостерігається сталий зріст показників захворюваності та поширюваності хронічних соматичних захворювань майже за усіма класами хвороб, серед яких перше місце посідають хвороби системи дихання. Проте патофізіологічні механізми цього негативного явища досі залишаються остаточно не з'ясованими та широко дискутуються у науковій літературі. Роботами деяких дослідників доведено, що тривалий вплив малих доз іонізуючого опромінення за рахунок інкорпорованого ^{137}Cs індукує активацію процесів вільнорадикального та перекисного окислення ліпідів, що призводить до пошкодження клітин, клітинних мембран та інтрацелюлярних органел, у тому числі, і клітин судинного ендотелію, який відноситься до найбільш чутливих до дії радіації елементів судинної стінки. Патологічні процеси, які є наслідком дії радіаційного чинника, супроводжуються дисфункцією судинного ендотелію, котра значною мірою пов'язана з дефіцитом ендотеліального оксиду азоту, і може бути обумовлена порушенням NO-ситазної активності ендотелію.

Накопичується все більше даних про те, що навіть малий рівень інкорпорації ^{137}Cs може викликати медико-біологічні ефекти, особливо якщо існує генетична схильність до певної патології.

У теперішній час описані поліморфні варіанти гена eNOS у різних ділянках гена, у тому числі, у 4-му інтроні – $4a/4b$ VNTR-поліморфізм. Вплив алелі $4a$ пов'язують з порушенням експресії гена eNOS, що призводить до зменшення виробітки NO. Наявність аномальної алелі $4a$ в генотипі розглядають як чинник ризику розвитку бронхолегеневої, серцево-судинної патології та інших мультифакторіальних захворювань, а також пов'язують з більшою радіочутливістю до дії малих доз іонізуючого випромінювання в осіб з $4a/4b$ поліморфізмом гена eNOS.

Дослідження у цьому напрямку мають важливе значення, оскільки дозволяють отримати нові наукові дані, щодо внеску тривалого впливу малих доз внутрішнього опромінення та поліморфізму у 4-му інтроні гена eNOS в розвиток несприятливих ефектів і обґрунтувати методи їх попередження у дітей, які мешкають за умов тривалого надходження ^{137}Cs до організму.



Таким чином, дисертаційна робота В.М. Зигало має безсумнівну актуальність, теоретичну та практичну значущість.

Мета роботи сформульована наступним чином – визначити вплив інкорпорованого ^{137}Cs і поліморфізму в 4-му інтроні гена e-NOS на NO-синтазну активність ендотелію, стан про- та антиоксидантної систем, ризик розвитку ендотеліальної дисфункції та обґрунтувати методи її корекції.

Для її досягнення послідовно вирішувалися 6 **завдань**: 1. Дослідити рівень L-аргініну та метаболізм оксиду азоту за рівнем його кінцевих метаболітів в сироватці крові дітей при тривалому надходженні ^{137}Cs до організму. 2. Оцінити ендотеліальну реактивність у дітей при тривалому надходженні ^{137}Cs до організму. 3. Дослідити активність вільнорадикальних процесів, стан про- та антиоксидантної систем у дітей при тривалому надходженні ^{137}Cs до організму. 4. Визначити функціональний стан бронхолегеневої системи у дітей при тривалому надходженні ^{137}Cs до організму. 5. Встановити частоту $4a/4b$ і $4b/4b$ генотипів гена eNOS і їх асоціації з особливостями метаболізму оксиду азоту, показниками про- та антиоксидантних систем, вентиляційної спроможності легенів та рівнем інкорпорованого ^{137}Cs . 6. Оцінити ефективність корекції ендотеліальної дисфункції у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій за допомогою донаторів та потенційних донаторів оксиду азота.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертація виконана у відповідності з планом науково-дослідної роботи відділу радіаційної педіатрії, вродженої та спадкової патології Державної установи «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України» та є фрагментом науково-дослідної роботи: «Обґрунтування методів корекції ендотеліальної дисфункції та порушень психоемоційного стану у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій та дітей, які переміщені з південного сходу України» (2015 – 2017 рр. № держреєстрації 0115U002701). Дисертант є співвиконавцем НДР.

Наукова новизна отриманих результатів полягає у доказах того, що тривале надходження ^{137}Cs до організму призводить до пригнічення NO-синтазної активності ендотелію з розвитком ендотеліальної дисфункції, маркерами якої є зниження вмісту нітриту у сироватці крові та подовженості тривалості відновлення кровообігу до вихідного рівня після оклюзійної проби. Вперше встановлено, що зміни цих показники асоційовані з вмістом ^{137}Cs у організмі, характеризуються лінійною залежністю, а зв'язок між дією чиннику ризику та розвитком ендотеліальної дисфункції має помірну силу ($\phi = 0,306$).

Доведено, що у дітей – мешканців РЗТ з генотипом $4a/4b$ у порівнянні з дітьми, які мали генотип $4b/4b$, відмічалось більш суттєве зниження вмісту нітриту в сироватці крові, збільшення термографічного показника тривалості відновлення кровообігу до вихідного рівня після оклюзійної проби і підвищення ризику розвитку ендотеліальної дисфункції, а виразність порушень NO-синтазної активності ендотелію в осіб з наявністю мінорної алелі a в генотипі, характеризувалась лінійною залежністю від вмісту ^{137}Cs в тілі.

Показано, що висока частота гіперреактивності бронхів у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій (у 45,7 %), асоційована з маркерами ендотеліальної дисфункції: зниженням рівню нітриту ($R = -0,392$), збільшенням тривалості відновлення термографічного показника кровообігу до вихідного рівня після оклюзії ($R = 0,274$), а також з наявністю алелі a у 4-му інтроні гена eNOS.

Доведено, що ефективним методом корекції ендотеліальної дисфункції є донатори та потенційні донатори оксиду азоту.

Практичне значення отриманих результатів. За результатами проведених досліджень запропоновано методи корекції ендотеліальної дисфункції у дітей – мешканців

радіоактивно забруднених територій шляхом застосування донаторів і потенційних донаторів оксиду азоту, що сприяє покращенню стану здоров'я, нормалізації метаболізму оксиду азоту, зменшенню виразності проявів ендотеліальної дисфункції та нормалізації вентиляційної спроможності легенів.

На підставі результатів дослідження видано інформаційний лист: «Застосування цитруліну для корекції ендотеліальної дисфункції у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій», № 228 (Київ, 2017). Результати дослідження впроваджені у лікувально-діагностичну роботу дитячих відділень Клініки ННЦРМ та Українського спеціалізованого диспансеру радіаційного захисту населення МОЗ України.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Основні наукові положення, висновки та рекомендації, що висвітлені в дисертаційній роботі, науково обґрунтовані, базується на достатньому за обсягом фактичному матеріалі, отриманому з використанням сучасних клініко-лабораторних, інструментальних і статистичних методів. Звертає на себе увагу, що автор ретельно підійшов до формування та структурування груп спостереження. Для цього їм було розроблено формалізований анкетний тест, який використовувався для проведення скринінгових досліджень на першому етапі формування основної групи та групи нозологічного контролю, а в подальшому використовувалися критерії включення і виключення в наукове дослідження, які були розроблені дисертантом.

У підсумку, після ретельного обстеження були сформовані основа група зі 138 дітей, які мешкали на радіоактивно забруднених територіях населених пунктів Народичського, Овруцького та Коростенського районів зі щільністю забруднення ґрунтів ^{137}Cs понад 185 кБк/м^2 , група нозологічного контролю із 49 дітей, які за віком, статтю та станом здоров'я відповідали дітям основної групи, але не відносилися до Чорнобильських контингентів та 27 практично здорових не опромінених дітей. Корекція ендотеліальної дисфункції проводилася у 20 дітей, які додатково до базисної терапії отримували донатор оксиду азоту – L-аргінін та у 20 дітей, які додатково до базисної терапії отримували потенційний донатор оксиду азоту – цитруліну малат. Групу порівняння склали 20 дітей, які отримували лише базисну терапію. Усі дослідження проводилися двічі – до та після закінчення курсу терапії.

Використані під час виконання дисертації методи дослідження, а саме, визначення вмісту ^{137}Cs в організмі; рівню стабільних метаболітів NO та L-аргініну; стану про- та антиоксидантної систем; проведення термографічного дослідження ендотеліальної реакції на оклюзію дрібних та ультразвукового дослідження ендотеліальної вазодилатації великих судин, пневмотахографічне дослідження вентиляційної спроможності легенів; молекулярно – генетичні дослідження поліморфізму в 4-му інтроні гена eNOS є інформативними та забезпечують сучасний науковий рівень

Основні положення, сформульовані автором, науково обґрунтовані і викладені на підставі ретельного аналізу джерел літератури та результатів власних досліджень, логічно витікають з матеріалів дисертації.

Практичні рекомендації ґрунтуються на даних власних спостережень, спрямовані на вирішення конкретних практичних завдань. Наведені дані свідчать про те, що дисертація В. М. Зигало виконана на сучасному науково-методичному рівні та ґрунтується на цілком достатньому фактичному матеріалі.

Таким чином, достатній обсяг фактичного матеріалу, ретельне формування репрезентативних груп спостереження, використання сучасних інформативних методів дослідження, належна статистична обробка отриманих результатів дозволили зробити обґрунтовані висновки твердження та практичні рекомендації.

Робота виконана згідно вимог етики і документів з біомедичних досліджень.

Висновки, їх 10 та практичні рекомендації носять обґрунтований характер, базуються на результатах власних досліджень і відбивають суть отриманих даних.

Повнота викладу основних положень дисертації в опублікованих роботах

За темою дисертації опубліковано 15 наукових праць та 1 інформаційний лист. Публікації та автореферат повністю відображають основний зміст роботи.

Положення дисертаційної роботи були неодноразово представлені на конгресах, науково-практичних конференціях, у тому числі, з міжнародною участю, про що свідчить наявність відповідних сертифікатів та програм.

Оцінка наукової та літературної якості складу матеріалу і стилю дисертації

Дисертаційна робота побудована за традиційним принципом, згідно до вимог ДАК МОН України та складається з анотації, вступу, аналітичного огляду літератури, опису об'єкту та методів дослідження, 4 розділів власних досліджень, розділу «Аналіз та узагальнення результатів дослідження», висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел та додатків. Текст викладено на 197 сторінках принтерного тексту (з них основний текст – 156 сторінок), дисертація ілюстрована 27 таблицями, 11 рисунками, містить 8 додатків. Список використаних джерел включає 248 найменувань, з них 182 кирилицею, 66 латиницею. Робота оформлена згідно державних стандартів, суттєвих зауважень щодо змісту, правопису і побудови дисертації немає.

У вступній частині, яка написана за стандартною формою, дисертантом подані відомості щодо актуальності, мети, завдань, наукової новизни і практичної значущості результатів, власного внеску здобувача у проведенні досліджень, представлені публікації за темою дисертації та дані щодо обговорення результатів дослідження на наукових конференціях.

Розділ 1 - огляд літератури, побудований за класичною схемою, містить чотири підрозділи, що стосуються ролі оксиду азоту та поліморфізму в 4-му інтроні гена eNOS у розвитку ендотеліальної дисфункції, аналізуються літературні джерела, які стосуються дискусійних питань дії малих доз іонізуючого випромінювання на метаболізм оксиду азоту, NO-синтазну активність судинного ендотелію та розвиток ендотеліальної дисфункції. Висвітлюються питання щодо особливостей медико-біологічних ефектів при дії радіаційного чинника в осіб з наявністю поліморфізму в 4-му інтроні гена eNOS. Автор приділяє особливу увагу аналізу літературних джерел, які стосуються корекції ендотеліальної дисфункції.

Критичний аналіз сучасних літературних даних, проведений автором, дозволив визначити основні невирішені та дискусійні питання щодо дії малих доз іонізуючого випромінювання та поліморфізму в 4-му інтроні гена e-NOS на метаболізм оксиду азоту, NO-синтазну активність ендотелію, стан про- та антиоксидантної систем, ризик розвитку ендотеліальної дисфункції та шляхи її корекції.

Розділ написаний літературною українською мовою, і виявляє наукову ерудицію автора і вміння працювати зі спеціальною літературою.

Розділ 2 – матеріали та методи досліджень Для вирішення поставленої мети та завдань дослідження дисертантом побудовано логічно завершений та методологічно забезпечений дизайн дослідження, який складається з двох підрозділів. В першому підрозділі докладно представлені етапи формування та структурування груп спостереження. У другому підрозділі детально наведені методи, які використовував автор. Методичні підходи добре обґрунтовані, методи дослідження детально описані, доведена їх адекватність для вирішення поставленої мети і завдань дисертації. Обсяг проведених досліджень цілком достатній для отримання результатів, що дозволяє зробити достовірні висновки, твердження та рекомендації.

У розділі 3 представлено клініко-дозиметричну характеристику груп спостереження, результати досліджень особливостей метаболізму оксиду азоту, стану про- та антиоксидантної

систем. Проаналізовано ендотелій залежну реакцію судин на оклюзійну пробу та вентиляційну спроможність легенів у дітей з різним рівнем інкорпорованого ^{137}Cs .

Отримані докази того, що тривале надходження ^{137}Cs до організму дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій призводить до пригнічення NO-синтазної активності ендотелію, маркерами якої є зниження вмісту нітриту у сироватці крові та збільшення тривалості відновлення кровообігу до вихідного рівня після оклюзійної проби. Встановлено, що зміни цих показники асоційовані з вмістом ^{137}Cs в організмі, характеризуються лінійною залежністю, підвищенням відносного ризику розвитку ендотеліальної дисфункції і наявністю помірної сили зв'язку між дією чинника ризику та розвитком ендотеліальної дисфункції. Визначено, що частота бронхоспазму у дітей – мешканців РЗТ, асоційована з маркерами ендотеліальної дисфункції: зниженням рівня нітриту, збільшенням тривалості відновлення термографічного показника кровообігу до вихідного рівня після оклюзії.

В розділі 4 наведено результати досліджень частоти *4a/4b* і *4b/4b* генотипів гена eNOS у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій та дітей, які не були залучені до Чорнобильської катастрофи. Проведено аналіз асоціації поліморфних варіантів гену eNOS з клініко-лабораторними показниками та функціональним станом бронхолегеневої системи у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій.

Показано, що медико-біологічні ефекти у дітей при наявності поліморфізму у 4-му інтроні гена eNOS характеризувалися більш суттєвим зниженням вмісту нітриту в сироватці крові, збільшенням термографічного показника тривалості відновлення кровообігу до вихідного рівня після оклюзійної проби і підвищення ризику розвитку ендотеліальної дисфункції, а виразність порушень NO-синтазної активності ендотелію при *4a/4b* генотипі, характеризувалась лінійною залежністю від вмісту ^{137}Cs в тілі. В клінічному аспекті у дітей з поліморфізмом в 4-му інтроні гена eNOS визначені більш суттєві порушення вентиляційної спроможності легенів ніж у дітей з *4b/4b* генотипом.

У 5-му та 6-му розділах надано теоретичне обґрунтування та визначена доцільності застосування для корекції ендотеліальної дисфункції у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій донатора оксиду азоту (L – аргініну) та потенційного донатора оксиду азоту (цитруліну малату). Приведено докази того, що їх призначення призводило до підвищення NO-синтазної активності ендотелію, що проявлялося збільшенням рівню нітриту, покращенням параметрів відновлення кровообігу до вихідного рівня після оклюзійної проби як з боку дрібних, так і великих судин, характеризувалося зниженням у сироватці крові ТБК-активних продуктів ПОЛ і підвищенням активності каталази. Терапевтичний ефект проявлявся покращенням самопочуття, зменшенням скарг, порушень астено-вегетативного характеру, частоти бронхоспазму, ознак абдомінального та диспептичного синдромів. Вміст ^{137}Cs у тілі дітей зменшувався, відповідно, на 28 % та на 32 %, у дітей групи порівняння на 17 %.

В розділі 7 – аналіз та узагальнення результатів дослідження у стислому вигляді надається, обговорюється та глибоко аналізується увесь спектр отриманих даних. Розділ повною мірою відображує суть проведених досліджень. Підсумовуючи отримані результати дослідження, автор проводить порівняльний аналіз з даними робіт, які проводились іншими дослідниками, доказово пояснює найбільш важливі факти і положення дослідження. Цей розділ свідчить о достатній ерудиції та професіоналізмі автора, його вміння аналізувати та узагальнювати результати наукової роботи.

У висновках (їх 10) стисло наведені основні результати дослідження. Вони викладені логічно, послідовно, відповідають меті, завданням та повністю базуються на отриманих результатах досліджень.

Практичне значення одержаних результатів полягає у запропонованих методах корекції ендотеліальної дисфункції у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій шляхом застосування донаторів та потенційних донаторів оксиду азоту, що сприятиме нормалізації метаболізму оксиду азоту, зменшенню виразності проявів ендотеліальної дисфункції, нормалізації вентиляційної спроможності легенів та покращенню стану здоров'я дітей. Слід зазначити, що за результатами дослідження видано інформаційний лист: «Застосування цитруліну для корекції ендотеліальної дисфункції у дітей - мешканців радіоактивно забруднених територій», який вже впроваджений у практику дитячих відділень Клініки ННЦРМ та Українському спеціалізованому диспансері радіаційного захисту населення МОЗ України.

У авторефераті дисертації повністю відображено основні положення дисертації. Автореферат оформлений відповідно до чинних вимог МОН України щодо авторефератів дисертацій на здобуття наукового ступеню кандидата наук.

Зауваження і побажання по дисертації.

Дисертація Зигало В.М. заслуговує позитивної оцінки. Роботу характеризує високий науково-методичний рівень, наукова новизна та практичне значення. З недоліків можна відмітити окремі стилістичні неточності, описки, що не знижує загальної позитивної оцінки наукової і практичної значущості дисертаційної роботи.

У дискусійному порядку вважаю за доцільне обговорити **наступні питання**:

1. Пояснить, будь ласка, відрізнялися чи ні групи дітей з генотипом $4a/4b$ і $4b/4b$ за вмістом інкорпорованого ^{137}Cs ?
2. Який з запропонованих вами засобів краще застосовувати для корекції ендотеліальної дисфункції у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій?
3. Які профілактичні заходи, з вашої точки зору, слід проводити для попередження розвитку ендотеліальної дисфункції у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій?

Висновок

Таким чином, дисертаційна робота Зигало Віктора Миколайовича на тему: «Вплив інкорпорованого ^{137}Cs і $4a/4b$ поліморфізму гена eNOS на NO-синтазну активність ендотелію та корекція її порушень у дітей» є закінченою, самостійною науковою роботою, в який отримані нові наукові дані про порушення метаболізму оксиду азоту, NO-синтазну активність судинного ендотелію, ризик розвитку ендотеліальної дисфункції при тривалому надходженні ^{137}Cs до організму та модифікуючий вплив поліморфізму у 4-му інтроні гена eNOS на виразність цих змін. На підставі отриманих нових наукових даних обґрунтовані та запропоновані методи корекції ендотеліальної дисфункції за допомогою донаторів та потенційних донаторів оксиду азоту, що дозволило по новому вирішити важливу для радіобіології, радіаційної медицини та педіатрії конкретну науково-практичну задачу – покращання здоров'я дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій у віддалений період Чорнобильської катастрофи.

Зміст дисертації відповідає спеціальності 03.00.01 – радіобіологія і профілю спеціалізованої вченої ради Д 26.562.01

Враховуючи актуальність дослідження, наукову новизну та практичну значущість отриманих результатів, широку апробацію у відкритому друці та наукових збірниках, адекватність методичних засобів поставленим завданням, обґрунтованість висновків та рекомендацій, вважаю, що дисертація Зигало Віктора Миколайовича на тему: «Вплив інкорпорованого ^{137}Cs і $4a/4b$ поліморфізму гена eNOS на NO-синтазну активність ендотелію та корекція її порушень у дітей» є такою, що повністю відповідає п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 567 від

24.07.2013 року щодо дисертаційних робіт на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.01 – радіобіологія.

Офіційний опонент:

головний науковий співробітник лабораторії

профілактики аліментарно залежних захворювань

Державна установа «Інститут громадського

здоров'я імені О. М. Марзєєва Національної академії

медичних наук України»

д. мед. н., професор,



Handwritten signature of Vitaliy Naumovich Korzun

Корзун Віталій Наумович

