

ВІДГУК

офіційного опонента доктора медичних наук, професора, завідувача лабораторії патофізіології та експериментальної терапії радіаційних уражень Державної установи «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва Національної академії медичних наук України» Сімоної-Пушкар Лариси Іванівни 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

Детальний аналіз дисертації Зигало В.М. «Вплив інкорпорованого ^{137}Cs і 4a/4b поліморфізму гена eNOS на NO-синтазну активність ендотелію та корекція її порушень у дітей» дозволяє сформулювати такі висновки щодо актуальності, наукової новизни, практичного значення, достовірності отриманих результатів, ступеню обґрунтованості основних наукових положень, висновків, рекомендацій, а також загальної оцінки роботи.

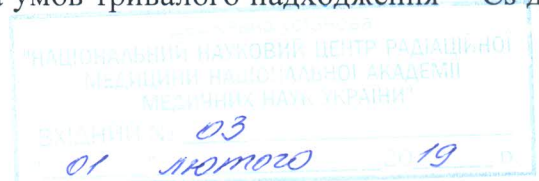
Актуальність теми.

Внаслідок Чорнобильської катастрофи великі контингенти дитячого населення залишилися проживати на радіоактивно забруднених територіях. Стан здоров'я цих контингентів з плином часу продовжує погіршуватися та залишається незадовільним у віддалений після Чорнобильський період.

За даними чисельних вітчизняних досліджень, висновків експертів Чорнобильського форуму та міжнародної спільноти, значне погіршення стану здоров'я постраждалого дитячого населення визнано одним з найбільш несприятливих наслідків Чорнобильської катастрофи. Проте, незважаючи на пильну увагу до проблеми, патофізіологічні механізми цих негативних ефектів у дітей, які проживають за умов тривалого надходження ^{137}Cs до організму, залишаються остаточно нез'ясованими, роль радіаційного фактору дискусійною, а лікувально-профілактичні заходи недостатньо ефективними та потребують удосконалення.

В експериментальних роботах доведено, що низькі дози радіації, отримані протягом тривалого часу, спричиняють значні зміни в пулах стабільних метаболітів оксиду азоту, що призводить до розвитку ендотеліальної дисфункції та може бути причиною порушення NO-залежних фізіологічних функцій організму.

У регуляції продукції оксиду азоту ендотеліальними клітинами важлива роль належить ендотеліальній синтазі NO – eNOS. Пригнічення її активності призводить до порушення синтезу оксиду азоту з L-аргініну й розвитку ендотеліальної дисфункції. На теперішній час описані поліморфні варіанти гена eNOS у різних ділянках, у тому числі, у 4 інтроні – 4a/4b VNTR-поліморфізм. Вплив алелі 4a пов'язують з порушенням експресії гена eNOS, що призводить до зменшення виробітки NO. Наявність алелі 4a в генотипі розглядають як чинник ризику розвитку бронхолегеневої, серцево-судинної та іншої патології. Існують поодинокі повідомлення про більш високу радіочутливість носіїв алелі 4a гена eNOS у гомозиготному та гетерозиготному стані. Проте, дослідження у цьому напрямку вкрай обмежені, а у дітей, які мешкають за умов тривалого надходження ^{137}Cs до організму не проводилися.



Враховуючи велику роль оксиду азоту в регуляції багатьох фізіологічних та патологічних процесів, дослідження впливу інкорпорованого ^{137}Cs , на NO-синтазну активність ендотелію, стан про- та антиоксидантної систем з урахуванням 4a/4b поліморфізму гена eNOS можуть бути важливим для розкриття деяких механізмів несприятливих ефектів Чорнобильської катастрофи у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій та з'ясування взаємодії чинників навколишнього середовища і генетичної компоненти у їх реалізації.

Іншим важливим аспектом проблеми є пошук засобів, здатних стабілізувати функціональний стан ендотелію шляхом надання субстрату, з якого синтезується оксид азоту, що обумовлює необхідність дослідження потенційної ролі донаторів оксиду азоту, як доповнення до існуючих парадигм корекції дефіциту NO при різних патологічних станах, предиктором котрих є ендотеліальна дисфункція.

У зв'язку з цим визначення особливостей метаболізму оксиду азоту, показників про- та антиоксидантної систем, вентиляційної спроможності легенів та їх асоціацій з вмістом інкорпорованого ^{137}Cs і поліморфними варіантами гена eNOS є важливими для встановлення деяких патофізіологічних механізмів розвитку несприятливих ефектів Чорнобильської катастрофи у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій, а вдосконалення підходів щодо їх корекції – це важливий шлях до підвищення ефективності лікувально-профілактичних заходів.

Таким чином, напрямок досліджень, обраний дисертантом, є актуальним, тема дисертаційної роботи обґрунтованою і має теоретичну та практичну значущість.

Мета роботи полягала у визначенні впливу 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 обґрунтуванні методів її корекції.

Для досягнення мети дослідження послідовно вирішувалися такі основні завдання як: 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. Дисертаційна робота виконана в рамках тематичного плану НДР 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. На підставі проведених досліджень дисертантом отримані наступні найбільш вагомі результати.

Вперше встановлено, 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, а частота бронхоспазму асоційована з маркерами ендотеліальної дисфункції.

Доведено, що зміни цих показників характеризувалися лінійною залежністю від вмісту ^{137}Cs в організмі, підвищенням відносного ризику розвитку ендотеліальної дисфункції ($\text{RR} = 2,351$; 95 % CI: 1,356 – 4,070, $p < 0,001$).

Вперше на підставі дослідження поліморфізму в 4-му інтроні гена eNOS встановлено, що при наявності аномальної алелі *a* (*4a/4a* генотип) у дітей – мешканців РЗТ спостерігалось більш суттєве порушення NO-синтазної активності ендотелію ніж у гомозигот з алелі *b* (*4b/4b* генотип). Показано більш суттєве зниження рівня нітриту у сироватці крові, збільшення термографічного показника тривалості відновлення кровообігу, які у носіїв мінорної алелі *a* були асоційовані з вмістом ^{137}Cs в тілі.

На клінічному рівні ці негативні зміни у носіїв мінорної алелі *a* характеризувалися зниженням показника еластичності і розтяжності легеневої тканини та інтегрального показника прохідності дихальних шляхів.

Результати досліджень автора повністю відповідають сучасним уявленням радіобіології та екогенетики про те що дія несприятливих факторів малої інтенсивності викликає більш виразні негативні ефекти у осіб з наявністю аномальних алелів в генотипі.

Дисертантом обґрунтовано доцільність призначення донатора оксиду азоту (L-аргініну) та потенційного донатора оксиду азоту (цитруліна малату) для покращення метаболізму NO і корекції ендотеліальної дисфункції. Показано, що їх призначення призводило до зростання у сироватці крові вмісту аргініну, сприяло покращенню метаболізму оксиду азоту, параметрів відновлення кровообігу після оклюзійної проби як з боку великих, так і дрібних судин, стану про- та антиоксидантної систем. Встановлено гарний терапевтичний ефект обох засобів.

Значення для науки та практики. Проведені дослідження поповнили та розширили наукові пізнання щодо, впливу інкорпорованого ^{137}Cs на метаболізм оксиду азоту, стан про- та антиоксидантної систем, ризик розвитку ендотеліальної дисфункції та модифікуючої дії поліморфізму у 4-му інтроні гена eNOS на ці процеси

За результатами проведених досліджень запропоновано методи корекції ендотеліальної дисфункції у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій шляхом застосування донаторів та 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 про нововведення в системі охорони здоров'я: «Застосування цитруліну для корекції ендотеліальної дисфункції у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій», № 228 (Київ, 2017). Отримані теоретичні і практичні результати дослідження впроваджені у лікувально-діагностичну

роботу дитячих відділень Клініки ННЦРМ, Українського спеціалізованого диспансеру радіаційного захисту населення МОЗ України.

Ступінь обґрунтування та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій.

Усі наукові положення висновки та практичні рекомендації, які наведено у дисертаційній роботі Зигало В.М. «Вплив інкорпорованого ^{137}Cs і $4a/4b$ поліморфізму гена eNOS на NO-синтазну активність ендотелію та корекція її порушень у дітей» є обґрунтованими та підтверджені отриманими результатами.

Дисертація базується на достатньому за обсягом фактичному матеріалі в основу роботи покладені результати обстеження 138 дітей – постійних мешканців радіоактивно забруднених територій зі щільність забруднення ґрунтів понад 185 кБк/м^2 , раціон харчування яких складався переважно з продуктів місцевого виробництва; 49 дітей групи нозологічного контролю, які за віком, статтю та станом здоров'я не відрізнялися від дітей основної групи, але проживали на «чистих» територіях, та 27 практично здорових неопромінених дітей, які не належали до контингентів постраждалих внаслідок Чорнобильської катастрофи.

Для корекції порушень NO-синтазної активності ендотелію та оцінки запропонованих лікувальних засобів, серед основної групи відібрано 60 дітей з ендотеліальною дисфункцією розподілених на 3 підгрупи (по 20 осіб у кожній). Дітям 1-ої підгрупи, додатково до базисної терапії, призначався донатор оксиду азоту (L-аргінін), 2-ої підгрупи – потенційний донатор оксиду азоту (цитруліну малат), діти 3-ої підгрупи отримували лише базисну терапію. Обстеження дітей проводили двічі – до та після закінчення курсу лікування.

Для виконання дисертаційної роботи використовувалися сучасні, адекватні поставленої меті та завданням методи дослідження, вона ґрунтується на достатньому за обсягом клінічному матеріалі, що дозволило сформувати репрезентативні групи з достатньою потужністю вибірки для проведення коректної статистичної обробки отриманих даних.

Таким чином комплексний підхід до проведення дослідження з чітко побудованим дизайном та ретельним підходом до формування груп спостереження згідно до критеріїв включення – виключення, розроблених автором, використання сучасних інформативних методів дослідження та належна статистична обробка отриманих результатів дозволили зробити обґрунтовані твердження, висновки та практичні рекомендації.

Первинна документація оформлена згідно до існуючих вимог, змістовна і повністю підтверджує отримані результати.

Робота виконана з дотриманням вимог і основних положень з питань етики згідно сучасних міжнародних і вітчизняних документів з біомедичних досліджень.

Висновки (їх 10) та практичні рекомендації носять об'єктивний та обґрунтований характер, чітко аргументовані, базуються на результатах власних досліджень та їх належній статистичній обробці, логічно впливають з суті отриманих даних.

Повнота викладення основних результатів дисертаційної роботи в опублікованих працях і в авторефераті. Матеріали дисертації докладно висвітлені в печаті. Основні положення дисертаційного дослідження викладені у вигляді 15 наукових робіт. З них 6 статей, які опубліковані у наукових фахових виданнях, рекомендованих ДАК

України, 8 тезах – у матеріалах всеукраїнських та міжнародних конференцій. Результати досліджень обговорювалися на наукових форумах різного рівню, включаючи міжнародний. Видано 1 інформаційний лист.

Важливо підкреслити, що результати, отримані під час виконання досліджень, вже знайшли практичне використання. Вони впроваджені у лікувально-діагностичну роботу дитячих відділень Клініки ННЦРМ, Українського спеціалізованого диспансеру радіаційного захисту населення МОЗ України.

Оцінка наукової та літературної якості складу матеріалу і стилю дисертації загалом позитивна. Дисертаційна робота побудована за загальноновизнаною структурою 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 і 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.

Структура і зміст дисертації.

«**Анотація**» написана згідно до встановлених для дисертаційних робіт формою, містить основні положення щодо результатів отриманих здобувачем, наукової новизни та практичної значимості дисертаційної роботи.

«**Вступ**» написаний за встановленою для дисертації формою у ньому обґрунтована актуальність і важливість дослідження, сформульовані мета та завдання, об'єкт та предмет дослідження, підкреслено наукову новизну роботи, представлено основні відомості щодо власного внеску здобувача у проведення досліджень, представлені публікації за темою роботи, наведено відомості щодо обговорення результатів дослідження на наукових форумах.

Розділ 1 (огляд літератури) складається з чотирьох підрозділів які відображують основні аспекти та дискусійні питання дії малих доз іонізуючого випромінювання на метаболізм оксиду азоту, який є одним з важливіших регуляторів фізіологічних та патологічних процесів, NO-синтазну активність судинного ендотелію та розвиток ендотеліальної дисфункції. Проаналізовані літературні джерела, які висвітлюють питання щодо модифікуючого впливу на виразність змін метаболізму оксиду азоту поліморфізму у 4-му інтроні гена eNOS. Приділяється значна увага аналізу літературних даних, присвячених методам корекції ендотеліальної дисфункції, та її клінічним проявам у вигляді чисельних функціональних розладів з боку різних органів та систем, що може бути предиктором розвитку хронічної соматичної патології зростання якої спостерігається у дітей - мешканців радіоактивно забруднених територій впродовж усього постчорнобильського періоду. Отже критичний аналіз літературних джерел дозволив дисертанту визначити спектр дискусійних і невирішених питань, недостатність і фрагментарність наукових даних за багатьма аспектами розглянутої проблеми, та обґрунтувати актуальність, доцільність і перспективність своєї роботи.

При викладені матеріалів цього розділу використані сучасні та доказові джерела інформації.

У розділі 2 «Матеріали та методи дослідження» викладений детально, дає повне уявлення про основні етапи, структуру роботи та використані методи дослідження. Методичні підходи добре обґрунтовано, 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 розділ 3 дисертаційної роботи надана клінічна та дозиметрична характеристика дітей груп спостереження, приведено результати досліджень показників, характеризуючих метаболізм оксиду азоту, стан про- та антиоксидантної систем, ендотеліязалежну реакцію судин на оклюзійну пробу та вентиляційну спроможність легенів. Основна група та група нозологічного контролю були співставними за віком, статтю та станом здоров'я. Для оцінки виразності змін показників, що вивчалися, представлено результати обстеження практично здорових неопромінених дітей.

Використовуючи в якості визнаних маркерів NO-синтазної активності ендотелію, а саме, показника вмісту нітриту у сироватці крові та термографічного показника тривалості відновлення кровообігу до вихідного рівня після оклюзійної проби, автором доведено залежність виразності їх змін від рівню інкорпорованого ^{137}Cs . Визначено підвищений ризик розвитку ендотеліальної дисфункції та встановлено високу частоту бронхіальної реактивності у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій, яка була асоційована з маркерами ендотеліальної дисфункції.

У розділі 4 роботи представлено дані щодо частоти $4a/4a$ та $4a/4b$ генотипів гена eNOS у дітей основної та контрольної груп. Надані результати досліджень, які характеризують NO-синтазну активність судинного ендотелію при поліморфних варіантах гена eNOS. Встановлена більша чутливість дітей з $4a/4a$ генотипом, у порівнянні з генотипом $4b/4b$ до дії радіаційного чинника, яка характеризувалося більш суттєвим зниженням рівня нітриту у сироватці крові, збільшенням термографічного показника тривалості відновлення кровообігу до вихідного рівня після оклюзії та підвищенням ризику розвитку ендотеліальної дисфункції.

На клінічному рівні ці негативні зміни у носіїв мінорної алелі a характеризувалися зниженням показника еластичності і розтяжності легеневої тканини та інтегрального показника прохідності дихальних шляхів.

Розділи 5 та 6 дисертації присвячені обґрунтуванню підходів щодо корекції ендотеліальної дисфункції у дітей, які мешкають за умов тривалого надходження ^{137}Cs .

На підставі отриманих результатів здобувач вважає, що зниження NO-синтазної активності судинного ендотелію у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій потребує стабілізації функціонального стану судинного ендотелію, а зниження вмісту L-аргініну у сироватці крові вказує на необхідність надання донаторів оксиду азоту, з яких ендотелій може синтезувати потрібні речовини.

У розділі 5 надані результати дослідження ефективності корекції ендотеліальної дисфункції за допомогою донатору оксиду азоту (L-аргініну), котрий призначався додатково до базисної терапії. Дослідження проводились двічі – до та після закінчення курсу лікування. Встановлено, що призначення L-аргініну призводило до нормалізації рівню L-аргініну в сироватці крові, оптимізації метаболізму оксиду азоту, збільшення NO-синтазної активності судинного ендотелію, що характеризувалося підвищенням рівню

нітриту та покращенням реакції як великих, так й дрібних судин на оклюзію. Відмічалось зниження інтенсивності процесів ПОЛ та покращення параметрів антиоксидантного захисту. Призначення L-аргініну позитивно впливало на клінічний стан дітей. Спостерігалось покращання самопочуття, зменшення скарг та оптимізація функціонування бронхолегеневої системи. Вміст ^{137}Cs знижувався на 28%.

У дітей групи порівняння, які отримували лише базисну терапію, статистично значущих відмінностей між результатами первинного та повторного обстеження не виявлено.

У розділі 6 представлено результати досліджень корекції порушень NO-синтазної активності судинного ендотелію у дітей, які мешкають за умов тривалого надходження ^{137}Cs , за допомогою потенційного донатора оксиду азоту – цитруліну малату, котрий призначався додатково до базисної терапії. Надано теоретичне обґрунтування можливостей його застосування, приведено результати досліджень до та після закінчення курсу терапії. На підставі проведених досліджень визначено позитивний вплив застосування цитруліну малату на параметри, що характеризують NO-синтазну активність судинного ендотелію, стан про- та антиоксидантної систем. Встановлено гарний терапевтичний ефект та відсутність побічних явищ. Вміст ^{137}Cs знижувався на 32 %.

У розділі «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» дисертант підсумовує отримані результати, пояснює найбільш важливі факти та положення, зіставляє їх з даними інших авторів. Цей розділ свідчить про достатню ерудицію та професійний рівень дисертанту, його вміння узагальнювати та аналізувати отримані результати.

Висновки (їх 10) та **практичні рекомендації** чітко аргументовані, базуються на результатах власних досліджень, логічно впливають з суті отриманих даних, мають теоретичне та практичне значення.

Автореферат має ідентичний зміст з основними положеннями дисертації.

Зауваження до дисертаційної роботи.

Принципових зауважень до роботи у цілому та до окремих її розділів немає. До не принципових зауважень слід віднести:

1. У розділі 1 варто було б дещо детальніше висвітлити дискусійне питання щодо впливу малих доз іонізуючого випромінювання на стан здоров'я дітей у віддалений період Чорнобильської катастрофи.

2. Висновки за результатами досліджень, які наведено у розділах 3 та 5, слід було б викласти у більш стислій формі.

3. У дисертації зустрічаються окремі дрібні стилістичні та орфографічні похибки.

Однак ці зауваження не змінюють в цілому позитивної оцінки дисертаційної роботи.

Проте в процесі рецензування дисертації виник ряд питань що можуть бути вирішені у дискусії:

1. Поясніть, будь ласка, чому тривале надходження ^{137}Cs до організму призводить до більш виразних порушень NO-синтазної активності судинного ендотелію у дітей з генотипом 4a/4e, а ніж з генотипом 4e/4e.

2. Можуть лі зміни NO-синтазної активності судинного ендотелію бути пов'язані з дією інших несприятливих чинників нерадіаційного походження.

3. Чи можливо екстраполювати результати Ваших досліджень на інші контингенти осіб, які зазнають дії радіаційного чинника.

Висновок

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 закінченою самостійною роботою, містить нові обґрунтовані результати і висновки, що вирішують конкретне наукове завдання в галузі радіобіології, радіаційної медицини та педіатрії, а саме, покращення здоров'я дітей, які проживають за умов тривалого надходження ^{137}Cs до організму, шляхом корекції ендотеліальної дисфункції за допомогою донаторів оксиду азоту на підставі нових наукових даних про порушення метаболізму оксиду азота, зниження NO-синтазної активності ендотелію, ризик розвитку ендотеліальної дисфункції у дітей при тривалому надходженні ^{137}Cs до організму і поліморфізмі в 4-му нитроні гена eNOS.

Результати проведених досліджень і зміст дисертації відповідають спеціальності 03.00.01- радіобіологія та профілю спеціалізованої вченої ради Д 26.562.01.

За актуальністю обраної теми, обсягом виконаних досліджень, ступенем обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, науковою новизною та практичною значущістю дисертаційна робота Зигало В.М. повністю відповідає вимогам п.11 «Порядку присудження наукових ступенів», щодо кандидатських дисертацій, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 562 від 24 липня 2013 року, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата медичних наук.

Офіційний опонент,

Головний науковий співробітник

лабораторії радіаційної онкології.

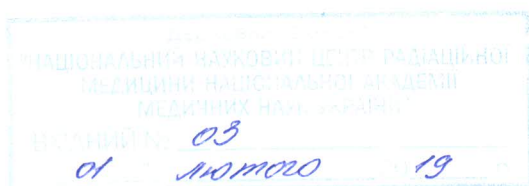
Державна Установа «Інститут медичної радіології

імені С.П. Григор'єва Національної академії

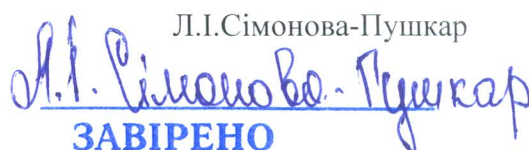
медичних наук України»

Лауреат Державної премії України, доктор

Медичних наук, професор.

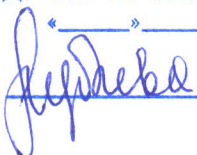
Л.І.Сімонова-Пушкар

Підпис 

ЗАВІРЕНО

Вчений секретар

ДУ ІМР ім. С.П. Григор'єва НАМН України

 20 р.

