

Голові Спеціалізованої Вченої ради
Д 26.614.01 при ДУ «Інститут
епідеміології та інфекційних
хвороб ім. Л.В. Громашевського
НАМН України»
член-кор. НАМН України
професору
Задорожній В.І.

ВІДГУК

**офіційного опонента доктора медичних наук, професора
Рибалко Світлани Леонтіївни
на дисертаційну роботу Андрюшкової Наталі Григорівни на тему:
«Значення ентеровірусної інфекції в розвитку гострого порушення
мозкового кровообігу», що представлена на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук до спеціалізованої вченої ради Д 26.614.01 при
ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб
ім. Л.В. Громашевського НАМН України»
за спеціальністю 03.00.06 – вірусологія**

Актуальність теми. Дисертація присвячена вивченню значення ентеровірусної інфекції в розвитку гострого порушення мозкового кровообігу.

Відомо, що ентеровіруси здатні викликати численні захворювання із самими різноманітними клінічними проявленнями від безсимптомної персистенції вірусу, гострих респіраторних і кишкових захворювань, екзантем, геморагічного кон'юнктивіту до тяжких уражень, небезпечних для здоров'я та життя людей, сепсисоподібного захворювання новонароджених, перикардитів, міокардитів, серозного менінгіту, паралітичних поліомієлітоподібних захворювань, хвороби Борнгольма (епідемічної плевродинії). З ентеровірусами зв'язують також виникнення такого актуального та все більш розповсюдженого сьогодні неінфекційного захворювання як цукровий діабет; було показано також, що синдром хронічної втоми зв'язують з хронічною ентеровірусною інфекцією.

Згідно епідеміологічним зведенням ВООЗ, протягом останніх 10-15 років намітилась чітка активізація ентеровірусних інфекцій, нарощування їх епідемічного значення в усьому світі. Про це свідчить постійно діюча реєстрація в різних країнах, що фіксує зростання захворюваності до рівня епідемій і численних спалахів на різних континентах.

В Україні щороку з підозрою на ентеровірусну етіологію обстежується 1500 хворих з клінічною картиною нейроінфекції. Одна з особливостей ентеровірусних інфекцій – це безсимптомна персистенція вірусів у клінічно

здорових людей. При цьому тривалість персистенції збудника в кишківнику може досягати декількох місяців. Це є основою виникнення схожих випадків і епідемій ентеровірусних інфекцій. Слід відмітити, що ентеровіруси здатні уражати не лише дітей молодшого і старшого віку, але й дорослих.

Важливою особливістю ентеровірусів є їх здатність персистувати в організмі людини, а враховуючи їх клінічні прояви – перикардити, міокардити, ураження нервової тканини і судин, цілком закономірний інтерес дисертанта до проблеми ролі ентеровірусної інфекції в розвитку гострого порушення мозкового кровообігу, тобто участь ентеровірусів в соматичній патології людини. В теперішній час найбільша кількість робіт присвячена участі вірусів групи герпесу (HSV-1, HSV-2, HSV-3 (герпес Зостер), Епштейн-Барра, цитомегаловірусу, аденовірусів, вірусів грипу в розвитку гострого ураження мозкового кровообігу. Слід відмітити, що пріоритет у вивченні цієї проблеми належить кафедрам неврології, гістології та ембріології, внутрішньої медицини №2 Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

Вивчення ролі ентеровірусної інфекції в розвитку гострого порушення мозкового кровообігу, незважаючи на очевидність (нейротропність і кардіотропність) довгий час залишалася мало вивченою. Тому сміливість дисертанта Н.Г. Андрюшкової та її керівника В.П. Широбокова слід високо оцінити. Ретроспективно аналізуючи роботи 60-70-х років – Богданова І.Л., Голуба Н.Ф., Суптель Е.А., Ващенко М.А., Гирина В.Н., Бурвікової В.І., Херсонської Я.Р., Бондаренко В.І., Некрашевич-Горегляд Н.І. та ін., слід відмітити, з якою обережністю проводилася етіологічна розшифровка спалахів з виділенням вірусів Коксакі і ентеровірусів, тому що тривалий час ЕСНО-віруси (віруси сирітки) вважалися малопатогенними для людини. В кінцевому результаті автори прийшли до висновку, що виділення ентеровірусів із спинномозкової рідини, крові, а також серологічне підтвердження (чотирикратне наростання титрів антитіл) може мати етіологічне значення для ураження центральної нервової системи. В практичному плані докази зв'язку вірусів Коксакі і ЕСНО-вірусів з гострим порушенням мозкового кровообігу в якості тригерів (що запускають процес) може привести до розробки способів активної профілактики ентеровірусної інфекції, тобто створенню вакцин до ентеровірусів. Досвід такий був у 70-х роках 20-го сторіччя. В період епідемії грипу А2/Гонконг/68/Н3N3/ була проведена вакцинація робітників заводу «Арсенал» живою ентеровірусною вакциною ЖЕВ-13 (ЕСНО-1) и ЖЕВ-15 (ЕСНО-12) (автори М.П. Чумаков і М.К. Ворошилова), яку використовували як ефективний індуктор інтерферону.

Тому визначення ролі ентеровірусів у розвитку гострого порушення мозкового кровообігу – проблема актуальна та пропонує новий напрямок у вивченні ентеровірусних інфекцій.

Метою роботи було: вивчення ролі ентеровірусної інфекції у розвитку гострого порушення мозкового кровообігу.

Відповідно до поставленої мети було висунуто 7 завдань дослідження.

Зв'язок роботи з науковими проблемами, планами, темами.

Дисертація виконувалася відповідно до плану науково-дослідних робіт (НДР) кафедри неврології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (НМУ імені О.О. Богомольця) та є фрагментом НДР «Клініко-параклінічна характеристика і патогенетичні співставлення у хворих з гострим порушенням мозкового кровообігу, оптимізація методів лікування та профілактики рецидиву» (термін виконання 2014-2017 рр., № державної реєстрації 0114U001358).

Наукова новизна. Наукова новизна результатів дослідження Наталі Григорівни полягає в тому, що вперше експериментально доказано, що в сироватках хворих з гострим порушенням мозкового кровообігу в реакції ПЦР виявлені РНК ентеровірусів, виділені і типовані штами ентеровірусів (Коксаки і ЕСНО-віруси), які згідно генетичним маркерам gct_{40} і розміру бляшок (S) відповідають тим мутаціям, які характерні для персистуючих вірусів грипу (Медведєва, Щербинська). Виявлені специфічні Ig M і Ig G глобуліни до ентеровірусів у хворих основної групи, що дало дисертанту підставу сформулювати гіпотезу про персистуючу ентеровірусну інфекцію у хворих з гострим порушенням мозкового кровообігу, яка при загостренні грає роль тригера, тобто запускає процес судинних порушень.

Практичне значення отриманих результатів дослідження полягає в тому, що на підставі результатів дослідження одержано патент «Спосіб діагностики ентеровірусної інфекції у хворих з гострим порушенням мозкового кровообігу (93020 ИА)», розроблені пропозиції для практичної охорони здоров'я про доцільність діагностики ентеровірусної інфекції у хворих з гострим порушенням мозкового кровообігу. Крім того, розроблений курс лекцій і вдосконалена програма підготовки лікарів з урахуванням розробленої проблеми – участь ентеровірусів у виникненні гострих порушень мозкового кровообігу.

Результати дисертаційної роботи впроваджені в практичну діяльність: Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова (акт впровадження), при підготовці посібників, лекцій, методичних розробок у курсі викладання мікробіології, вірусології та імунології у вищих медичних навчальних закладах (ВМНЗ) України.

Обсяг та структура дисертації.

Дисертація викладена на 161 сторінці друкованого тексту (з них обсяг основного тексту – 117 сторінок), містить 17 таблиць, 10 рисунків. Бібліографія включає 289 джерел, з них вітчизняних – 141, зарубіжних – 148.

У **вступі**, написаному у відповідності до рекомендацій МОН України, чітко і конкретно сформульовані мета і завдання дослідження.

Автор розкриває суть проблеми шляхом критичного аналізу, висвітлює актуальність теми, її зв'язок з плановою роботою Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. Визначені мета і завдання роботи, об'єкт, предмет і методи дослідження, наукова новизна і практичне значення,

складена програма досліджень. Огляд літератури складається з одного розділу та двох підрозділів.

В першому підрозділі представлені відомості про сучасний стан проблеми участі вірусних і бактеріальних інфекцій в етіопатогенезі гострого порушення мозкового кровообігу, приводяться теорії виникнення атеросклеротичного процесу в судинах, при цьому особливу увагу приділено інфекційній теорії розвитку атеросклерозу. В якості етіопатогенетичного фактору розглядається персистентна інфекція в розвитку соматичних захворювань таких як атеросклероз судин, міокардити, перикардити, бронхіальна астма, захворювання легенів, уразкова хвороба, синдром хронічного втомлення, онкологічні процеси і приводить сучасні результати дослідження участі вірусів грипу, герпесу 1,2,3,6 типів, цитомегаловірусів, вірусів Епштейн-Барра, аденовірусів і бактеріальних патогенів *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, а також асоціацій цих патогенів.

У другому підрозділі представлені сучасні уявлення про структурно-функціональні особливості ентеровірусів, їх молекулярно-біологічна характеристика, класифікація, епідеміологія, значення генетичних маркерів у вірулентності і патогенності ентеровірусів, вперше розроблені на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Київського медичного університету, циркуляція ентеровірусів в природних вогнищах.

Приведені роботи, в яких доведено участь вірусів Коксаки А і В та їх асоціацій із декількох серотипів у патогенезі неінфекційних захворювань: інфаркта міокарду, міокардиту, перикардиту, дилатаційної кардіоміопатії, атеросклерозу, юнацького діабету, панкреатиту, нефриту, гепатиту, дерматоміозиту, псоріазу (експериментальні і клінічні). Крім того, показано, що при доведеній етіологічній ролі вірусної інфекції застосування антивірусної терапії призводить до більш ефективного лікування цих хвороб.

Огляд літератури призводить до висновку про необхідність виконання обраної теми. Слід звернути увагу, що огляд літератури написано професійно, легко читається, приведені в ньому результати досліджень критично обмірковані автором, що свідчить про глибоке знання предмету досліджень.

Власні дослідження починаються розділом «Програма і матеріали і методи дослідження».

Програма досліджень складається з 7 пунктів для здійснення мети досліджень. В розділі «Матеріали і методи» представлені клінічна характеристика хворих основної групи – 72 хворих з різними формами гострого порушення мозкового кровообігу і групи порівняння. Вірусологічні методи: культури клітин, використані віруси, специфічні сироватки, тест-системи, методи класичної вірусології – культивування клітин і вірусів, типування вірусів у реакції нейтралізації, генетичні маркери: $A_{\text{бент}}^+$, $A_{\text{бент}}^-$, gct_{40}^+ , молекулярно-біологічні методи аналізу – полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), імуноферментний метод, статистичний аналіз.

Слід підкреслити, що дисертація Н.Г. Андрюшкової є фрагментом наукового напряму, який розробляється на кафедрі мікробіології, вірусології

та імунології під керівництвом і безпосередньою участю академіка НАНУ і НАМНУ, професора В.П. Широбокова – серії пріоритетних наукових досліджень молекулярних механізмів репродукції ентеровірусів, гетерогенності популяції ентеровірусів по генетичному маркеру – здатності сорбції до бентоніту, на основі якого розроблені методичні підходи для виявлення цитопатогенних ентеровірусів по бляшкоутворенню під бентонітовим покриттям, а також розділення популяції ентеровірусів за ступенем афінітету до бентоніту. Ці дослідження дозволили в подальшому прогнозувати ступінь вірулентності і патогенності виділених ентеровірусів, а також розробити теоретичні основи одержання вакцинних штамів ентеровірусів.

Результати досліджень дисертанта – один з найважливіших фрагментів цієї проблеми, яка об'єднує розробку методичних підходів при вивченні ентеровірусних інфекцій і при соматичній патології гострого порушення мозкового кровообігу.

Результати експериментальних досліджень представлені у розділах 3 і 4.

Розділ 3 «Використання вірусологічних, молекулярно-генетичного і серологічного методів дослідження сироваток крові хворих з гострим порушенням мозкового кровообігу з метою виявлення ентеровірусної інфекції».

Для встановлення можливої ролі ентеровірусів у розвитку гострого порушення мозкового кровообігу були проведені дослідження по виявленню РНК ентеровірусів у полімеразній ланцюговій реакції, варіант зворотної транскрипції (ЗТ-ПЛР) за допомогою стандартної тест-системи АмпліСенс ентеровірус 207. Присутність геному (РНК) ентеровірусів було виявлено у 17 хворих з ГПМК, а в групі порівняння у 1 з 35, що відповідало 23,6% і 2,9%. Для виділення ентеровірусів використовували культури клітин RD, Нер-2, HeLa. За допомогою класичного вірусологічного методу дослідження було виділено 11 цитопатогенних агентів у сироватках крові хворих з інсультом. В групі порівняння вірус не був виділений.

Досвід дослідження при моделюванні персистентної інфекції вірусу грипу свідчить про те, що при персистентній інфекції *in vitro* вірус втрачає свої вірулентні властивості, тому виділення вірусу представляє велику важкість і відбувається на 3-5 пасажах. Виділені дисертантом ентеровіруси проявляли цитопатогенну дію вже через 24 години після інфікування, отже, більша частина ентеровірусів (15,3%) не втрачала своїх цитопатогенних властивостей. Можливо, при більш тривалому пасуванні проявилися б цитопатогенні властивості і у 6 ПЛР позитивних сироватках, що залишилися.

Виділені штами ентеровірусів ідентифіковані в реакції нейтралізації як віруси Коксаки В (серотип 2,3,4) і віруси ЕСНО (серотипи 6,9,27 два штами, 29); 3 – виділені цитопатогенні агенти не ідентифіковані.

Особливу увагу викликають дослідження фенотипових особливостей виділених штамів за генетичними маркерами вірулентності. Дисертант обґрунтовує застосування генетичних маркерів визначення патогенності і

вірулентності згідно розробленим на кафедрі методичним підходам: бентонітовий маркер ($A_{\text{бент}+}$, $A_{\text{бент}-}$), розмір бляшок (S) і зниження здатності атенуйованих штамів ентеровірусів розмножуватися при температурі 40°C (rct_{40-} і rct_{40+}). Результати дослідження виділених ентеровірусів із крові хворих ГПМК за вказаними генетичними маркерами привели дисертанта до висновку, що всі виділені ентеровіруси розмножувалися при температурі 40°C , тобто були термостійкими, 10 з 11 ентеровірусів (90%) мали слабкий афінитет до бентоніту ($A_{\text{бент}-}$) і 8 з 11 штамів утворювали бляшки менше 1,5мм (маркер S). Отже, виділені штами ентеровірусів були гетерогенні за вірулентністю і патогенністю: 72,8% були за генетичними маркерами патогенними і вірулентними, а 27,2% знаходилися в перехідному стані, оскільки два маркери або ж один з маркерів (S+ або $A_{\text{бент}+}$) відповідали вірулентним штамам. Закінчується розділ результатами визначення специфічних Ig M і Ig G до ентеровірусів імуноферментним методом.

В розділі 4 власних досліджень наведена порівняльна характеристика клінічного стану хворих 5 підгруп. У розділі проаналізовано клініко-лабораторні дані хворих основної групи, здійснено порівняльний аналіз цих даних з показниками у групі порівняння. У розділі представлені результати сезонних коливань вираженості персистентних ентеровірусних інфекцій (весна і осінь).

Розділ «Аналіз і узагальнення результатів» написано професійно, що є ще одним свідченням автора до глибокого аналізу одержаних результатів і можливості робити висновки із власних досліджень і даних літератури.

Висновки (5 пунктів) у чіткій формі відбивають результати проведених досліджень, новизну і практичну значущість одержаних результатів.

Ступінь обґрунтованості і достовірності наукових пропозицій, сформульованих в дисертації. Всі представлені експериментальні результати дисертації, її наукові положення і висновки базуються на власних дослідженнях, їх достовірність обумовлена використанням сучасних методів дослідження для вирішення поставлених завдань.

Апробація результатів дисертації. Результати дослідження і основні положення дисертації доповідались та обговорювались на науково-практичних форумах різних рівнів: на міжнародній науково-практичній конференції “Роль та місце медицини у забезпеченні здоров’я людини у сучасному суспільстві” (Одеса, 2013); міжнародній науковій конференції МКМ-2014-021 “Современные исследования медико-биологических наук” (Москва, 2014); на XIV міжнародній науковій конференції “Формування національних і загальнолюдських цінностей у студентів медичних і фармацевтичних вищих навчальних закладів” (Київ, 2014); у матеріалах VI Конгресу Південно-Східно Європейського Медичного Форуму та XIV з’їзду Всеукраїнського лікарського товариства (Одеса, 2015).

Повнота викладу основних результатів представлена в основних опублікованих роботах.

Публікації. Матеріали дисертації відображені у 12 наукових працях, зокрема у 8 статтях (з яких 5 – у фахових виданнях, рекомендованих МОН

України, 1 стаття в іншому періодичному фаховому виданні, 2 статті в зарубіжних наукових журналах (1 – у виданні бази SCOPUS)), а також 3 наукових публікаціях – у тезах та матеріалах конференцій, з'їздів, конгресів. Матеріали дисертації відображені у 1 патенті на корисну модель.

Дисертація викладена в науковому стилі, українською мовою, достатньо насичена цифровим та ілюстративним матеріалом і посиланнями на найновішу літературу за темою дисертації.

Після проведення рецензування виникли запитання в порядку дискусії:

1. Як Ви вважаєте, чи є необхідність для створення вакцин проти ентеровірусних інфекцій як профілактики гострого порушення мозкового кровообігу? Чи достатньо тотального скринінгу штамів ентеровірусів, виділених при цих захворюваннях протягом року, щоб виявити домінуючі штами ентеровірусів, які причетні до ГПМК? В якому віці краще починати вакцинацію?

2. Як Ви вважаєте, чи доцільно було б застосування антивірусних препаратів при доведеній участі ентеровірусної інфекції при гострому порушенні мозкового кровообігу.

Зауваження до дисертації

Робота виконана на високому науково-методичному рівні. Водночас, вона містить поодинокі недоліки, пов'язані переважно з неточностями редакційного характеру. Відомо, що в процесі персистенції зменшується репродуктивна активність вірусу і патогенність, тому виділення персистуючих вірусів процес трудомісткий та потребує проведення багатьох сліпих пасажів. При цьому може зникнути цитопатогенний ефект, який є маркером присутності вірусу. У таких випадках можна було б застосовувати для виявлення персистуючих вірусів такі додаткові методи як: визначення антигенів ентеровірусів методом ІФА, або застосування ПЛР в культурі клітин, або виділення ентеровірусу методом трансфекції кДНК ентеровірусів.

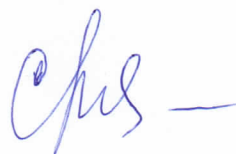
Висловлені зауваження не є принциповими і не зменшують наукового і практичного значення роботи Н.Г. Андрюшкової.

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Андрюшкової Наталії Григорівни «Значення ентеровірусної інфекції у розвитку гострого порушення мозкового кровообігу», що подана на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.06 – вірусологія присвячена актуальній проблемі і вирішує науково-практичну задачу в галузі вірусології, яка полягає у встановленні тригерної ролі ентеровірусів у розвитку гострого порушення мозкового кровообігу, обґрунтуванні доцільності поєднання молекулярно-генетичного, вірусологічного та серологічного методів дослідження для доведення ролі ентеровірусної інфекції у хворих з ГПМК, яке має важливе значення в практичній медицині.

За об'ємом та рівнем проведених досліджень, науковою новизною та практичним значенням отриманих результатів дисертаційна робота Андрюшкової Наталії Григорівни «Значення ентеровірусної інфекції у розвитку гострого порушення мозкового кровообігу» відповідає вимогам пп. 9, 11 Постанови Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (із змінами внесеними згідно з Постановою Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 р.) «Про затвердження Порядку присудження наукових ступенів», а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю: 03.00.06 – вірусологія.

Офіційний опонент,
доктор медичних наук,
професор,
завідуюча лабораторією експериментальної
хіміотерапії вірусних інфекцій ДУ «Інститут
епідеміології та інфекційних хвороб
ім. Л.В. Громашевського НАМН України»



С.Л. Рибалко

