

ВІДГУК

опонента на дисертаційну роботу

Марчишак Тетяни Вікторівні

«Гепатопротекторна дія комплексу олігорибонуклеотидів з D-манітолом при тіоацетамід-індукованій гепатотоксичності у експериментальних моделях тварин»,
поданої на розгляд для здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія

Актуальність теми дисертації

Відомо, що хімічні природні речовини (ксенобіотики) при довстроковій дії негативно впливають на здоров'я людини. Одним із найважливіших органів, який метаболізує ксенобіотики, є печінка. Захворювання печінки є однією із головних причин смертності населення, причому частину захворювань викликають саме ксенобіотики, нарівні із вірусами гепатиту В і С та такими соціальними проблемами, як вживання надмірної кількості алкоголю та ожиріння. Тому важливим напрямом досліджень є пошук лікарських засобів для профілактики і лікування захворювань печінки, викликаних хімічними речовинами.

На підставі вищесказаного, актуальність представленої роботи не викликає сумнівів. Автрром вибрано експериментальну модель тварин (мишей) *in vivo* для вивчення окислювального стресу, викликаного ксенобіотиками, а також для можливої профілактики тта лікування запалювального процесу у печінці.

В якості терапевтичного препарату було вибрано природні препарати олігорибонуклеотидів (ОРН) та їх комплексів з D-манітолом (ОРН-D-M), які раніше показали широкий спектр біологічних ефектів.

Я вважаю, що дослідження потенційної протекторної дії комплексів ОРН-D-M при пошкодженні печінки в результаті дії ксенобіотиків, є важливим і актуальним.

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

Дисертаційна робота виконувалася згідно основного плану науково-дослідних робіт групи молекулярної фармакології відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України «Вивчення впливу олігонуклеотидів на сигнальні білки та експресію генів вродженого імунітету», 2014-2018 рр. (номер державної реєстрації – 0113U002779).

Достовірність та ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Метою дисертаційної роботи було дослідження гепатопротекторних молекулярних механізмів впливу ОРН-D-M на стан печінки при гострій та хронічній ТАА-індукованій гепатотоксичності у експериментальних моделях тварин. Мету роботи повністю розкривають поставлені задачі.

Для виконання поставлених задач дисертантка застосувала сучасні методи дослідження, включаючи методи експериментальної патології (індукція гострої та хронічної гепатотоксичності), гістологічний (аналіз архітектоники паренхіми печінки та відкладень сполучної тканини), спектрометричний (визначення активності ALT і GGT в сироватці крові, рівня ТБК-активних сполук, протеїнових карбонільних груп, протеїнових SH-груп, відновленого глутатіону, MPO-, GPX- і GST- активності у паренхімі печінки), електрофоретичний (дослідження цілісності тотальної РНК), полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (визначення рівня мРНК досліджуваних генів), та статистичного аналізу.

Статистична обробка матеріалу здійснена за допомогою сучасного програмного забезпечення GraphPad Prism (версія 6) з використанням тестів для непараметричних даних.

Достовірність наукових положень, висновків і практичних рекомендацій дисертаційної роботи обґрунтовано вдало обраним комплексом методологічних підходів для досягнення поставленої мети та вирішення завдань дослідження.

Новизна та практичне значення одержаних результатів. Наукова новизна результатів дисертації Марчишак Т.В. полягає у тому, що вперше досліджено гепатопротекторну активність ОРН-D-M при гострому та хронічному токсичному ураженні печінки у мишей. Встановлено, що дія ОРН-D-M призводить до зменшення пошкодження мембран гепатоцитів і рекрутингу клітин імунної системи до місця запалення. Показано, що ОРН-D-M призводять до зниження рівня генерації продуктів оксидативної деградації та підвищенню активності ферментів і вмісту компонентів неферментативної ланки системи антиоксидантного захисту. Встановлено, що введення ОРН-D-M за лікувальною схемою частково інгібує експресію мРНК прозапальних цитокінів (IL-6, TNF- α) і профіброзних факторів (TGF- β 1, COL1A1 та α -SMA) за умов гострої та хронічної гепатотоксичності.

Отримані результати дисертаційного дослідження є експериментальним підґрунтям для подальшого доклінічного поглибленого вивчення потенційного гепатопротекторного препаратів, які містять ОРН-D-M.

Повнота викладу результатів дисертації в опублікованих працях. Основні положення та результати дисертації повністю висвітлені у наукових працях та оприлюднені на наукових конференціях та викладені у 12 наукових роботах: 4 статтях у провідних фахових виданнях, затверджених МОН України, 8 – тези доповідей. Основний зміст дисертаційної роботи повністю відображено в опублікованих наукових працях.

Оцінка змісту дисертації та автореферату. Дисертація оформлена із дотриманням існуючих правил, побудована за традиційною схемою, складається з вступу, огляду літератури, розділів Матеріали та методи досліджень, Результати експериментальних досліджень (у семи частинах), Аналіз та узагальнення результатів дослідження та висновків. Дисертацію викладено на 137 сторінках машинописного тексту. У роботі налічується 28 рисунків та 5 таблиць. Список використаних джерел містить 222 найменування.

У вступі авторка ґрунтовно означила актуальність обраної теми, сформулювала мету і задачі, розкрила її наукову новизну і практичне значення.

Огляд літератури структурований і складається із 8 підрозділів, у яких авторка проаналізувала більшість вагомих літературних першоджерел з теми дослідження. Так, детально обговорено роль біоактивації ксенобіотиків у розвитку гепатотоксичності, освітлено дані щодо оксидативного стресу як універсального механізму ушкодження печінки, просумовано джерела щодо розвитку запалення в умовах гепатотоксичності, а також щодо ролі універсального транскрипційного фактору NF- κ B та цитокінів у розвитку запалення при гепатотоксичності, активації стелатних клітин печінки при гепатотоксичності та ролі регенеративних процесів у відновленні печінки після токсичного ураження. Детально описано дані щодо гепатотоксичності, індукованої тіоацетамідом, а також в цілому нуклеїнові кислоти як терапевтичні молекули, включаючи синтетичні і природні нуклеїнові кислоти.

Практично всі найбільш вагомі наукові джерела за останніх 5 – 10 років було включено в аналіз. Огляд літератури змістовний, логічно побудований, аргументовано викладений.

У другому розділі «**Матеріали та методи досліджень**» представлено методи, які було застосовано для вивчення дії ксенобіотиків та протекторну роль олігорибонуклеотидів при гострій і хронічній дії ксенобіотиків. Детально описано експериментальну модель хімічно-індукованої гострої та хронічної гепатотоксичності у тварин (мишей).

Загалом алгоритм дослідження є вдалим та цілком виправдовує поставлену мету.

У третьому розділі «**Результати досліджень та обговорення**» у семи підрозділах викладено результати власних досліджень; цей розділ є найбільш фундаментальним з точки зору залучення сучасних молекулярно-біологічних методів та демонструє оволодіння дисертанткою усіма сучасними лабораторними методами, вміння глобального аналізу зібраного матеріалу для

вивчення ОРН-D-M як потенційного природного препарату при гострій та хронічній гепатотоксичності, індукованій тіоацетамідом, та пошук можливого молекулярного механізму його дії.

У першому підрозділі проведено скринінгове дослідження щодо потенційної гепатопротекторній дії ОРН-D-M при гострій гепатотоксичності; у другому підрозділі показано вплив комплексу ОРН-D-M на морфологічні зміни та показники ураження паренхіми при гострій гепатотоксичності; у третьому підрозділі вивчено показники оксидативного стресу та антиоксидантної системи при гострій гепатотоксичності; у четвертому підрозділі показано вплив комплексу ОРН-D-M на експресію генів ключових прозапальних цитокінів та транскрипційного фактору Nfkb; у п'ятому підрозділі вивчено вплив комплексу ОРН-D-M на активацію стелатних клітин печінки при гострій гепатотоксичності; у шостому підрозділі визначено рівні експресії основних мітогенів печінки при гепатотоксичності, індукованій ТАА, при дії ОРН-D-M; у сьомому розділі показано захисний вплив комплексу ОРН-D-M на розвиток патологічних процесів при хронічному токсичному гепатоураженні. Також запропоновано молекулярно-біологічні механізми гепатопротекторної дії комплексів ОРН-D-M при гострій гепатотоксичності і хронічній гепатотоксичності, індукованій ТАА.

В четвертому розділі «Аналіз та узагальнення результатів» дисертаційної роботи, проведено аналіз отриманих результатів. Авторка, інтегруючи результати власних досліджень, зводить їх у єдину систему, зіставляє з даними джерел літератури, а також висловлює власні міркування з приводу лікувальної дії природних олігорибонуклеотидів при гострій і хронічній гепатотоксичності, викликаній ТАА. У цьому розділі надається можливість у цілому охопити масштабну наукову роботу дисертантки, простежити за умотивованою послідовністю реалізованих дослідницьких кроків, усвідомити основні положення, їх інтерпретацію та з'ясувати зв'язок з наступними висновками, які сформульовано в шести пунктах, які повністю відповідають меті, задачам та результатам проведеного дослідження.

Вірогідність одержаних результатів підтверджена їх адекватною статистичною обробкою.

В авторефераті з оптимальною повнотою відображено зміст усіх розділів дисертації, її наукові положення і висновки, а його зміст беззаперечно відповідає змісту дисертації.

В дисертації мають місце окремі орфографічні та стилістичні помилки, які, втім, не перешкоджають адекватному сприйняттю результатів роботи, не впливають на загальну високу оцінку дисертаційної роботи у розв'язанні важливого наукового завдання щодо дослідження гепатопротекторних молекулярних механізмів впливу ОРН-D-M на стан печінки при гострій та хронічній гепатотоксичності, індукованій ТАА, в експериментальних моделях тварин.

Втім, для з'ясування можливості застосування результатів дослідження для обґрунтування використання природних препарати олігорибонуклеотидів та їхнього комплексу з D-манітолом при лікуванні хворих із ураженням печінки виникло кілька запитань:

1. Добре описано причину вибору тіоацетаміду як індукуючого фактора ураження печінки. Проте хотілося б знати, яке місце у забрудненні навколишнього середовища займає ця сполука, у порівнянні з більш токсичними і широко розповсюдженими, такими, як поліциклічні ароматичні вуглеводні та поліхлоровані діоксини, наприклад, як тетра-хлоро-дибензо-р-диоксин (TCDD).

2. Як ви збираєтесь продовжувати цю роботу? Як дані, отримані у експериментальній моделі, ви плануєте перенести на людей, беручи до уваги, що імунна система є різною?

3. У чому Ви вбачаєте перспективи застосування результатів експериментального дослідження у клінічній практиці?

Таким чином, дисертація Марчишак Т.В. є закінченим науковим дослідженням з експериментального обґрунтування можливості і перспективи використання ОРН-D-M як потенційного природного препарату для

застосування при гострій та хронічній гепатотоксичності, індукованій тіоацетамідом, та пошук можливого молекулярного механізму його дії.

Висновок

Дисертація Марчишак Тетяни Вікторівни «Гепатопротекторна дія комплексу олігорибонуклеотидів з D-манітолом при тіоацетамід-індукованій гепатотоксичності у експериментальних моделях тварин», поданої на розгляд для здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія, є закінченим, самостійно виконаним науковим дослідженням, яке присвячене експериментальному обґрунтуванню можливості використання комплексів олігорибонуклеотидів з D-манітолом для лікування гострої та хронічної гепатотоксичності, викликані ксенобіотиками.

Дисертація відповідає вимогам п. 11 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 (зі змінами, внесеними згідно з постановою Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015), а її авторка заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.03 – молекулярна біологія.

Завідувачка лабораторії молекулярних механізмів
трансформації клітини Інституту експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є Кавецького
НАН України
доктор біологічних наук

О.В. Кашуба



СВІДЧУЮ
І. м. Вовчкова
11.05