

ВІДГУК

офіційного опонента члена-кореспондента НАН України, доктора медичних наук, професора В.Ф. Сагача на дисертаційну роботу Марчишак Тетяни Вікторівни «Гепатопротекторна дія комплексу олігорибонуклеотидів з D-манітолом при тіоацетамід-індукованій гепатотоксичності у експериментальних моделях тварин», представленої до спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 при Інституті молекулярної біології та генетики НАН України на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Актуальність теми

Дисертаційна робота Т. В. Марчишак «Гепатопротекторна дія комплексу олігорибонуклеотидів з D-манітолом при тіоацетамід-індукованій гепатотоксичності у експериментальних моделях тварин» направлена на дослідження впливу комплексу олігорибонуклеотидів з D-манітолом на ураження паренхіми печінки, оксидативний стрес та експресію прозапальних і профіброзних генів при гострій та хронічній гепатотоксичності.

Печінка є основним метаболічним та детоксикуючим органом, яка першою контактує та знешкоджує ксенобіотики. Незважаючи на наявність в гепатоцитах клітинної системи детоксикації, метаболічні перетворення деяких з них можуть призвести до утворення токсичних інтермедіатів, внаслідок чого печінка піддається токсичному ураженню. Хоч цей орган і володіє високою регенеративною здатністю, але високий рівень захворювань печінки, обумовлений токсинами та гепато-специфічними вірусами, є проблемою сучасного суспільства. Тому не дивно, що гепатопротекторний захист проти токсичного ураження печінки залишається однією з основних задач в області біомедицини.

Гепатотоксичність на клітинному рівні проявляється некрозом гепатоцитів, інфільтрацією паренхіми нейтрофілами та активацією стелатних клітин печінки з одночасною втратою ними ретиноїд-вмісних ліпідних крапель

та посиленою продукцією компонентів позаклітинного матриксу, що призводить до значного ураження печінки та розвитку фіброзу. Тому, безумовно, важливими і актуальними є дослідження, представлені в даній роботі, враховуючи пошук механізму дії терапевтичного препарату для корекції патологічних станів печінки.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Роботу виконано в рамках наукової тематики 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).

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

Дослідження, які лежать в основі дисертаційної роботи, проведені з використанням загальноприйнятих модельних систем в умовах *in vivo*. На кожному етапі досліджень використовувалась достатня кількість методів, які відповідали поставленій меті і завданням. Достовірність та обґрунтованість наукових положень, викладених у дисертації, забезпечена достатньою кількістю експериментів, коректним статистичним аналізом отриманих результатів та підтверджено апробацією на семінарах та конференціях, а також публікаціями статей у наукових фахових виданнях та статей у журналах, що входять до міжнародної наукометричної бази SCOPUS. Сформульовані висновки відповідають меті дослідження та поставленим завданням, повністю відображають отримані результати.

Новизна наукових положень, висновків і рекомендацій

Результати дисертаційної роботи свідчать про комплексний підхід до проведення дослідження потенційної гепатопротекторної дії комплексу олігорибонуклеотидів з D-манітолом (ОРН-D-M) та пошуку механізму його дії при гострій та хронічній гепатотоксичності на молекулярному, біохімічному та морфологічному рівнях організації тканини органу. Науковими результатами дисертації є зниження ураження паренхіми органу за рекрутингу клітин імунної системи до місця запалення за умов гострої гепатотоксичності на фоні застосування комплексу. Було показано, що комплекс ОРН-D-M призводить до інгібування тіоацетамід (ТАА)-індукованого вільнорадикального пошкодження біомолекул гепатоцитів мишей за рахунок зниження рівня генерації продуктів оксидативної деградації та підвищення активності ферментів і вмісту компонентів неферментативної ланки системи антиоксидантного захисту. Вперше виявлено, що введення комплексу олігорибонуклеотидів з D-манітолом у дозі 200 мг/кг маси тіла тварин знижує рівень відносної експресії універсального транскрипційного фактору *Nfkb1*, що перешкоджає індукції цитокінів, зокрема, інтерлейкіну 6 (*Il6*) та фактору некрозу пухлин α (*Tnfa*) за умов гострої гепатотоксичності. Встановлено, що комплекс ОРН-D-M впливає на активацію стелатних клітин печінки при гострій гепатотоксичності про що свідчить знижений рівень відносної експресії гена α -актину гладеньких м'язів (*Acta 2*), трансформуючого ростового фактору $\beta 1$ (*Tgf\beta 1*) та колагену А-1 (*Colla1*). Автором показано, що виявлена гепатопротекторна дія комплексу у моделі гострої гепатотоксичності зберігається і при хронічному токсичному ураженні печінки. Встановлено, що довготривале лікування препаратом ефективно знижує підвищені рівні відносної експресії генів *Nfkb1*, *Nfkbia*, прозапальних цитокінів (*Il6*, *Tnfa*) та профіброзних генів (*Tgf\beta 1*, *Colla1*, *Acta 2*) в паренхімі печінки, що призводить до зменшення відкладень сполучної

тканини та зменшення розвитку фіброзу печінки за умов хронічної гепатотоксичності.

Практичне значення результатів дисертаційного дослідження

Отримані результати дисертаційного дослідження дають розуміння потенційного механізму дії комплексу ОРН-D-M при гострій та хронічній гепатотоксичності у мишей. Представлені дослідження стали експериментальним підґрунтям для подальшого доклінічного вивчення потенційної гепатопротекторної дії препарату на основі олігорибонуклеотидів. Крім того, отримані результати дозволяють розширити тривалість лікування гепатитів лікарською формою ОРН-D-M під комерційною назвою «Нуклекс», що може підвищити ефективність такого лікування, оскільки на сьогодні, відповідно до затвердженої МОЗ України інструкції про застосування цих ліків, вона обмежена двома тижнями.

Повнота викладу в опублікованих працях положень, висновків, рекомендацій

Основні положення та результати досліджень достатньо повно викладено у 13 наукових працях, з них 2 статті у виданнях, що входять до наукометричних баз SCOPUS, 2 статті в фахових журналах і 9 тез доповідей у збірках матеріалів вітчизняних і міжнародних наукових конференцій і з'їздів: XII український біохімічний конгрес (Тернопіль, Україна, 2019), IV міжнародна електронна конференція з лікарської хімії (Online, 2018), VI науково-практична конференція школи молодих науковців ПАТ «Фармак» (Київ, Україна, 2018), міжнародна конференція молодих вчених «XI Parnas Conference» (Київ, Україна, 2018), XII відкрита конференція молодих вчених ІМБГ (Київ, Україна, 2018), III міжнародна електронна конференція з лікарської хімії (Online, 2017), V науково-практична конференція школи молодих науковців ПАТ «Фармак» (Київ, Україна, 2017), XI відкрита конференція молодих вчених ІМБГ (Київ,

Україна, 2017), 18 міжнародна Пущинська школа-конференція молодих вчених «Біологія – наука XXI століття» (Пушино, Росія, 2014).

Структура, зміст і оформлення дисертації

Дисертаційна робота включає анотацію, вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень, аналіз та узагальнення результатів, висновки та список використаних джерел.

У вступі чітко обґрунтовано та викладено актуальність проблеми, визначено мету і завдання дисертаційного дослідження, наукову новизну та практичну значимість роботи, вказано особистий внесок дисертанта у виконанні дисертаційної праці, наукові положення, на яких проведена апробація фрагментів роботи.

В «Огляді літератури» автором проаналізовано сучасні уявлення щодо біотрансформації ксенобіотиків та особливостей патогенезу гепатотоксичності. Систематизовано новітні відомості про взаємозв'язок між оксидативним стресом, запаленням та активацією стелатних клітин печінки при розвитку патології органу. Особливу увагу приділено характеристиці препаратів на основі нуклеїнових кислот як терапевтичних агентів. Також автором наведено характеристику біологічних ефектів природних препаратів олігорибонуклеотидів та їх комплексу з D-манітолом.

У розділі «Матеріали та методи дослідження» наведено опис використаних у роботі методів експериментальної патології (індукція гострої та хронічної гепатотоксичності), гістологічні (аналіз архітектури паренхіми печінки та відкладень сполучної тканини), спектрометричні (визначення продуктів оксидативної деградації біополімерів, ферментативних активностей у паренхімі печінки), електрофоретичні (дослідження цілісності тотальної РНК), молекулярно-біологічні (полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі для визначення рівнів відносної експресії досліджуваних генів), статистичного аналізу.

У третьому розділі «Результати експериментальних досліджень» викладені з належною академічною повнотою і наведенням відповідних малюнків і таблиць.

Згідно до поставлених завдань в дисертаційній роботі докладно описано вплив комплексу ОРН-D-M при гострій та хронічній гепатотоксичності у мишей. Було показано, що введення 500 мг/кг ТАА сприяло розвитку гострої гепатотоксичності, що призводило до глибоких уражень печінки через 48 годин та проявлялось появою зон вогнищового некрозу та підвищення рівнів сироваткових трансаміназ. Показано, що застосування комплексу призводило до зменшення розвитку центрально-лобулярного некрозу та вираженості патологічних змін біохімічних показників цитолізу печінки у сироватці крові тварин.

Достатньо детально проаналізовано вплив комплексу ОРН-D-M на оксидативне пошкодження печінки. Аналіз отриманих даних виявив зростання вмісту продуктів оксидативного пошкодження біомолекул гепатоцитів, що підтверджує розвиток оксидстресу при ТАА-індукованій гострій гепатотоксичності. Застосування потенційного гепатопротекторного препарату призводить до атенуації індукованого гострим ураженням оксидативного пошкодження клітинних біополімерів про що свідчать низькі рівні продуктів пероксидного окислення ліпідів та білків та підвищені рівні відновленого глутатіону та білкових тіолів. Крім того, застосування комплексу ОРН-D-M призводило до відновлення активності ферментів глутатіонової системи антиоксидантного захисту та нормалізації про-антиоксидантної рівноваги.

За допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі автором визначено рівні відносної експресії низки генів, які залучені у розвитку гепатотоксичності. Виявлено, що введення комплексу ОРН-D-M мишам з лікувальною метою знижує рівні мРНК прозапальних генів *Tnfa* та *Il6*. Крім того, було показано зниження надекспресії мРНК універсального

транскрипційного фактору *Nfkb1* та його інгібітору *Nfkbia* за дії терапевтичного препарату. Автор припускає, що комплекс ОРН-D-M, впливаючи на профіль відносної експресії транскрипційного фактору *Nfkb1*, знижує розвиток запалення, що корелює з низькою МПО активністю та гістопатологічними дослідженнями.

Слід відмітити, що досліджуваний препарат ефективно знижує профілі експресії маркера активованих стелатних клітин – *Acta 2*, ключового профіброгенного цитокіну – *Tgfβ1* та основної молекули позаклітинного матриксу – *Colla1*. Це свідчить про те, що комплекс ОРН-D-M може проявляти свій гепатопротекторний потенціал, впливаючи на активацію стелатних клітин печінки та ремоделювання позаклітинного матриксу.

Разом з тим, дані стосовно впливу ОРН-D-M на регенеративні процеси, принаймні на рівні відносної експресії основних мітогенів залишались статистично незмінними порівняно з показниками контрольної патології. Зауважу, що отримані результати можна пояснити неоднаковою кінетикою активації генів, що відповідають за регенерацію на дію токсину та пошкодження печінки, неоднаковим ефектом різних доз ОРН-D-M та часом дослідження профілів експресії основних мітогенів, але це звісно потребує окремого дослідження, що виходить за рамки даної роботи.

Дисертантом також проведено дослідження впливу ОРН-D-M на рівні відносної експресії прозапальних та профіброзних генів з тривалою в часі експозицією токсину. Було показано, що лікування комплексом ОРН-D-M знижувало рівень відносної експресії *Nfkb1*, що в свою чергу пригнічувало генералізований запальний каскад, про що свідчить зниження профілів відносної експресії генів *Il6* та *Tnfa*. Крім того, лікування препаратом знижувало підвищені рівні відносної експресії профіброзних генів *Tgfβ1*, *Colla1* та *Acta 2*, що було підтверджено дослідженнями щодо відкладень фібрил-утворюючих колагенів при хронічному ураженні печінки за дії ТАА.

Аналізуючи та узагальнюючи результати проведених досліджень, Т.В. Марчишак проявила себе достатньо кваліфікованим науковцем, яка добре знає проблему, яку вивчає, вірно оцінює отримані дані, належним чином співставляє їх з літературними даними, робить обґрунтовані висновки.

Висновки дисертації містять фактичний матеріал, відображають сутність проведених експериментів і цілком відповідають поставленим завданням дисертаційного дослідження.

Зауваження та дискусійні положення дисертаційного дослідження.

У цілому позитивно оцінюючи роботу, слід звернути увагу на окремі положення дисертаційної роботи, що потребують додаткового обґрунтування або пояснення:

1. Проведена автором робота потребує підсумовуючої схеми механізмів токсичної дії тіоацетаміду та гепатопротекторної дії досліджуваних сполук.

2. В роботі мова йде скоріше про механізми розвитку токсичного ураження печінки і гепатопротекції препаратів олігорибонуклеотидної природи, тому доцільно було врахувати це в назві роботи.

3. Робота має виражений патолофізіологічний характер, але на жаль публікацій такого профілю у автора нема.

4. Чи спостерігалась загибель тварин при дії ТАА і які органи крім печінки ушкоджувались при цьому? Які клітини інших систем залучались до патологічного процесу?

5. Чи залучені до процесу гепатотоксичності мітохондрії? Оскільки вони являються головним джерелом вільних радикалів при оксидативному стресі, розвиток якого показаний автором.

6. Автором показано, що захисний ефект ОРН прямо пов'язаний з часом застосування препарату після введення токсину. З чим може бути пов'язана така різниця?

Висновок щодо відповідності встановленим вимогам дисертації

Дисертаційна робота Марчишак Тетяни Вікторівни «Гепатопротекторна дія комплексу олігорибонуклеотидів з D-манітолом при тіоацетамід-індукованій гепатотоксичності у експериментальних моделях тварин» є самостійною, цілісною та закінченою науковою працею.

На підставі комплексного дослідження з використанням сучасних методичних підходів вперше отримані науково обґрунтовані дані, які дають підставу стверджувати про ефективність комплексу олігорибонуклеотидів з D-манітолом як гепатопротекторного засобу при експериментальній гепатотоксичності у тварин.

За своєю актуальністю, методичним рівнем, обсягом проведених досліджень, новизною отриманих даних, логічністю, обґрунтованістю висновків представлена до захисту дисертаційна робота «Гепатопротекторна дія комплексу олігорибонуклеотидів з D-манітолом при тіоацетамід-індукованій гепатотоксичності у експериментальних моделях тварин», відповідає вимогам п. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р. (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 р. та № 567 від 27.07.2016 р.) а її автор, Марчишак Тетяна Вікторівна, заслуговує присудження наукового ступеню кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Офіційний опонент –

член-кореспондент НАН України, доктор
медичних наук, професор, завідувач відділу
фізіології кровообігу Інституту фізіології імені

О.О. Богомольця НАН України

В. Ф. Сагач

Підпис чл. кор. НАН України
д.м.н. Сагач В.Ф. засвідчує
Вчений секретар Товариства

