

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Марчишак Тетяна Вікторівна



УДК 577.213:577.216: 57.084

Гепатопротекторна дія комплексу олігорибонуклеотидів з D-манітолом при  
тіоацетамід-індукованій гепатотоксичності у експериментальних моделях тварин

03.00.03 — молекулярна біологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

КИЇВ-2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

**Науковий керівник:** кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник  
**Ткачук Зеновій Юрійович**  
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
завідувач наукової групи молекулярної фармакології відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології та генетики НАН України.

**Офіційні опоненти:** доктор медичних наук, член-кореспондент НАН України,  
професор  
**Сагач Вадим Федорович**  
завідувач відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.;

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник  
**Кашуба Олена Віталіївна**  
завідувач лабораторії молекулярних механізмів трансформації клітин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

Захист відбудеться 28 квітня о 10<sup>30</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного 150, тел. (044)526-11-69; e-mail: [inform@imbg.org.ua](mailto:inform@imbg.org.ua).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного 150).

Автореферат розіслано «    » березня 2021 року.

Вчений секретар  
спеціалізованої ради

к.б.н., с.н.с.

І. В. Крупська

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми дисертації.** Захворювання печінки різної етіології, враховуючи їх широке розповсюдження, як у світі так і в Україні являються значним тягарем для сучасної охорони здоров'я, оскільки призводять до скорочення тривалості життя населення та передчасної смертності (Blachier M., 2013). Згідно з останніми даними більше 2 мільйонів смертей у рік в усьому світі спричинені захворюваннями печінки, причому частину захворювань викликають ксенобіотики, нарівні із вірусами гепатиту та такими соціальними проблемами, як ожиріння і вживання надмірної кількості алкоголю (Asrani S., 2019). Сучасні підходи для лікування хвороб печінки направлені на усунення або ослаблення пошкоджуючого агента з наступною гепатотропною терапією шляхом застосування гепатопротекторних препаратів (Leggio L., 2017). Тому актуальним є пошук терапевтичних сполук, які б проявляли гепатопротекторні властивості та не призводили до серйозних побічних ефектів при тривалому застосуванні (Shiani A., 2017).

Незалежно від природи пошкоджуючого агента, захворювання печінки супроводжуються оксидативним стресом, некрозом гепатоцитів, інфільтрацією паренхіми клітинами імунної системи та активацією стелатних клітин печінки з одночасною втратою ними ретиноїд-вмісних ліпідних крапель та посиленою продукцією компонентів позаклітинного матриксу (Shirakami Y., 2011). Це призводить до змін патерну експресії генів і прогресуючого пошкодження печінки. Тому застосування препарату системної гепатопротекторної дії допоможе зменшити ураження печінки різної етіології.

Природні препарати олігорибонуклеотидів (ОРН) та їх комплекс з D-манітолом (ОРН-D-M) показують широкий спектр біологічних ефектів. Зокрема, ОРН-D-M проявляє специфічну противірусну активність широкого спектру дії в основі якої лежать механізми імуномодуляції, протизапального ефекту і вплив на конформацію рецепторів вірусів (Melnichuk N., 2017, Melnichuk N., 2018, Ткачук З.Ю, 2011). Крім того, комплекс ОРН-D-M уже зарекомендував себе як ефективний засіб у клінічній практиці у корекції таких патологій печінки як хронічний вірусний гепатит, викликаний вірусами гепатиту В і С (Фролов В.М., 2012, Ткачук З.Ю, 2011). Оскільки віруси гепатиту В і С є одними з основних етіологічних факторів, що призводять до хронічного гепатиту, фіброзу, цирозу та гепатоцелюлярної карциноми, перспективним є пошук препаратів, які показували одночасно як противірусну, так і гепатопротекторну дію. Тому дослідження гепатопротекторних молекулярних механізмів впливу ОРН-D-M за умов гострої та хронічної гепатотоксичності є предметом наукового інтересу, що робить дану тему дослідження важливою та актуальною.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана 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).

**Мета і завдання дослідження.** 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.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

1. Дослідити вплив ОРН-D-M на морфологічні зміни та показники ураження паренхіми печінки при гострій гепатотоксичності;
2. Визначити вплив комплексу ОРН-D-M на інтенсивність генерації продуктів оксидативної деградації та активність ферментів антиоксидантного захисту в гепатоцитах мишей за умов гострого токсичного ураження печінки;
3. Провести дослідження рівнів відносної експресії генів *Nfkb1*, *Nfkbia*, *Il6*, *Tnfa* та мієлопероксидазної активності в печінці за умов гострої гепатотоксичності на фоні застосування комплексу ОРН-D-M;
4. Визначити вплив ОРН-D-M на рівні відносної експресії генів *Tgfb1*, *Colla1* та *Acta 2* у паренхімі печінки за умов гострого токсичного ураження;
5. Провести дослідження рівнів відносної експресії генів *Hgf*, *Tgfa* та *Egf*, які сприяють регенерації печінки при ТАА-індукованій гепатотоксичності на фоні лікування комплексом ОРН-D-M;
6. Дослідити вплив комплексу ОРН-D-M на рівні відносної експресії прозапальних (*Nfkb1*, *Nfkbia*, *Il6*, *Tnfa*) та профіброзних (*Tgfb1*, *Colla1*, *Acta 2*) генів та провести патоморфологічне дослідження відкладень сполучної тканини та підрахунок її площі у досліджуваних групах при хронічному ураженні печінки.

**Об'єкт дослідження** – молекулярні порушення в печінці при гепатотоксичності.

**Предмет дослідження** – виявлення інтенсивності процесів за участі вільних радикалів, аберацій активностей ферментів, змін профілів відносної експресії прозапальних, профіброзних генів та ростових факторів при гепатотоксичності та корекція цих порушень за допомогою комплексу ОРН-D-M.

**Методи дослідження** – 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.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Під час виконання дисертаційної роботи вперше досліджено гепатопротекторну дію ОРН-D-M при гострому та хронічному токсичному ураженні печінки у мишей.

Показано, що застосування препарату ОРН-D-M зменшує ураження паренхіми печінки та рекрутинг клітин імунної системи до місця запалення. Визначено, що комплекс ОРН-D-M призводить до інгібування 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 ОРН-D-M 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  $\alpha$  (*Tnfa*) за умов гострої гепатотоксичності. Встановлено, що комплекс ОРН-D-M впливає на активацію стелатних клітин печінки при гострій гепатотоксичності. Виявлено знижений рівень відносної експресії гена  $\alpha$ -актину гладеньких м'язів (*Acta 2*) при застосуванні препарату з лікувальною метою. Показано, що ОРН-D-M знижує профілі відносної експресії генів трансформуючого ростового фактору  $\beta 1$  (*Tgf $\beta$ 1*) та колагену А-1 (*Colla1*) при гострому токсичному ураженні печінки. Встановлено, що препарат не змінює профілів відносної експресії ростових факторів – гепатоцитарного ростового фактору (*Hgf*), трансформуючого фактору росту  $\alpha$  (*Tgfa*) та епідермального фактору росту (*Egf*), які беруть участь у регенеративних процесах при гострому токсичному ураженні печінки.

Вперше показано, що виявлена гепатопротекторна дія комплексу ОРН-D-M 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 хронічного токсичного ураження.

**Практичне значення одержаних результатів.** 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.

**Особистий внесок здобувача.** Основний обсяг експериментальних досліджень, статистична обробка результатів, підбір та аналіз наукової літератури дисертаційної роботи виконувалися здобувачем особисто. Дані гістологічного дослідження при гострій гепатотоксичності отримані у співпраці з аспіранткою відділу фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця О. М. Ніколаєнко. Дані патоморфологічного дослідження відкладень сполучної тканини та підрахунок її площі при хронічній гепатотоксичності отримані у співпраці з д.мед.н., професором І. В. Гомоляко, зав.лабораторії патоморфології та цитології Національного Інституту хірургії та трансплантології ім. А. А. Шалімова НАМН України та з к.вет.н. С. І. Усенко, м.н.с. кафедри гістології, цитології та ембріології Національного університету біоресурсів і природокористування України. Автор висловлює подяку науковому керівнику к.б.н., г.н.с. Ткачуку Зеновію Юрійовичу відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології та генетики НАН України за допомогу в обговоренні, аналізі та інтерпретації отриманих даних. Автор вдячний д.б.н. І. О. Шмараківу відділу превентивної

медицини та нутрієнтології Колумбійського університету міста Нью-Йорк (США), д.б.н., професору В. І. Кашубі відділу молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології та генетики НАН України та співробітникам відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології та генетики НАН України за корисні поради під час планування досліджень та обговорення результатів.

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень та основні положення дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на конференціях – 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 Пушчинська школа-конференція молодих вчених «Біологія – наука XXI століття» (Пушино, Росія, 2014).

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 13 наукових праць, 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.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення одержаних результатів, висновків та списку використаних джерел. Дисертацію викладено на 137 сторінках машинописного тексту. Вона містить 28 рисунків та 5 таблиць. Список використаних джерел налічує 222 найменування.

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

**В огляді літератури** 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. Значну увагу зосереджено на характеристиці біологічних ефектів природних препаратів ОРН та їх комплексу з D-манітолом – ОРН-D-M.

**Матеріали та методи досліджень.** Утримання тварин і маніпуляції з ними проводили згідно з положеннями Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1998) та норм біомедичної етики, відповідно до закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Київ, 2006). У дослідженнях використовували мишей лінії C57BL/6/J, які знаходилися на стандартному раціоні віварію, вода і їжа були доступні *ad libitum*. Вплив ОРН-D-M на гостру

гепатотоксичність вивчали, використовуючи модель (Shmarakov I.O., 2014). Лікування комплексом та його компонентами (ОРН, D-M) здійснювали через 12 годинні інтервали на протязі 48 год від початку дослідження (групи ОРН-D-M 0 год, ОРН 0 год, D-M 0 год) та через 12 год після індукції гепатотоксичності (групи ОРН-D-M 12 год, ОРН 12 год, D-M 12 год). Хронічне ураження печінки викликали шляхом інтраперитонеальних ін'єкцій розчину тіоацетаміду (ТАА) у фізіологічному розчині в дозі 150 мг/кг маси тіла тричі на тиждень упродовж 8 тижнів. Лікування комплексом ОРН-D-M здійснювали щоденно на протязі 8 тижнів (група ОРН-D-M 0 т) та через 4 тижні щоденно до кінця експерименту (група ОРН-D-M 4 т).

Гістологічний аналіз паренхіми печінки проводили з використанням зрізів зафарбованих гематоксилін/еозином та методом Маллорі з використанням анілінового синього у комбінації з кислим фуксином і оранж G згідно стандартних методик (Горальський Л.П., 2015).

Аланінамінотрансферазну (ЕС 2.6.1.2, АЛАТ),  $\gamma$ -глутамілтранспептидазну (ЕС 2.3.2.2, ГГТ) активності в сироватці крові визначали методом Райтмана-Френкеля за допомогою стандартних біохімічних наборів. Мієлопероксидазну (ЕС 1.11.2.2, МПО) активність у паренхімі печінки визначали за методом (Schierwagen C., 1990). Глутатіон-S-трансферазну (ЕС 2.5.1.18, ГТ) активність у паренхімі печінки визначали за методом (Habig W.H., 1974). Глутатіонпероксидазну (ЕС 1.11.1.9, ГП) активність у паренхімі печінки визначали за методом (Разыграев А.В., 2004).

Оксидативне пошкодження біополімерів оцінювали за рівнем продуктів пероксидного окислення ліпідів (Ohkawa H., 1979), протеїнових карбонільних груп (Levine R., 1990), протеїнових SH-груп (Murphy M.E., 1989), відновленого глутатіону (Горячковський О.М., 2005).

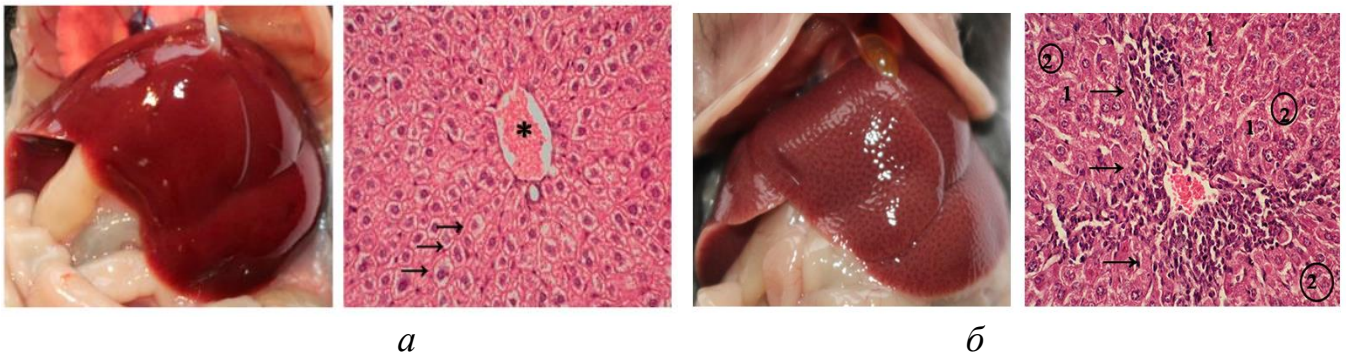
Рівні відносної експресії генів *Nfkb1*, *Nfkbia*, *Il6*, *Tnfa*, *Tgfb1*, *Colla1*, *Acta 2*, *Hgf*, *Tgfa* та *Egf* визначали за допомогою ПЛР аналізу експресії генів в реальному часі, використовуючи кДНК, яку синтезували з тотальної РНК з паренхіми печінки, *SYBR Green/Fluorescein PCR master mix* (Thermo Scientific, США) та ген-специфічні праймери (Invitrogen, Фінляндія). В якості внутрішнього стандарту використовували ген «домашнього господарства» *Gapdh*. Для розрахунку рівнів відносної експресії генів використовувати метод  $2^{-\Delta Ct}$ .

Статистичний аналіз отриманих даних проводили за допомогою програмного забезпечення GraphPadPrism 6 (GraphPad, La Jolla, Ca). Усі дані представлені як середнє  $\pm$  стандартне відхилення. Оцінку нормальності розподілу значень проводили за допомогою W-критерію Шапіро-Вілка. Порівняння між двома групами проводили, використовуючи двовибірковий t-критерій Стьюдента для незалежних вибірок. Для порівняння більш ніж двох груп між собою використовували однофакторний дисперсійний аналіз (one-way ANOVA) з наступним застосуванням апостеріорного критерію Тьюкі. Різниці з величиною  $p < 0,05$  вважались достовірними.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

**Дослідження впливу комплексу ОРН-D-M на морфофункціональні зміни паренхіми печінки при гострій гепатотоксичності.** ТАА-індуковане ураження печінки на клітинному рівні характеризується пошкодженням органел (мітохондрій,

ендоплазматичного ретикулуму, рибосом), порушенням трансмембранного потенціалу, збільшенням проникності мембран, руйнуванням цитоскелету, набуханням клітин печінки, що призводить до їх масової загибелі шляхом апоптозу або некрозу (Најовскы Н., 2012). Тому першим етапом наших досліджень було встановлення дії препарату на деструктивно-дистрофічні процеси в печінці мишей з гострим токсичним ураженням. Як показано на рис. 1 *а*, печінка здорових мишей мала гладку поверхню темно-бордового кольору. Паренхіму печінки складали гепатоцити, які розташовувались у вигляді балок, які йшли у радіальному напрямку до центральної вени. Між гепатоцитами в тому ж напрямку розміщувались кровоносні капіляри (рис. 1 *а*). У групі тварин, яка отримувала ТАА на 48 годину експерименту спостерігались значні патологічні зміни (рис. 1 *б*). Морфологія печінки була змінена, зокрема, колір органу був блідий, спостерігалась вузлувата та шорстка поверхня (рис. 1 *б*). На гістологічних зрізах виявлено великі осередки білково-гідропічної дистрофії цитоплазми з переходом у лізис і некроз паренхімних клітин, дифузно-осередкова запальна інфільтрація в області порталних трактів. Частина гепатоцитів візуалізувалась у вигляді гомогенної еозинофільної маси з явищами каріолізу, що є морфологічним індикатором загальнопатологічного процесу некрозу (рис. 1 *б*).

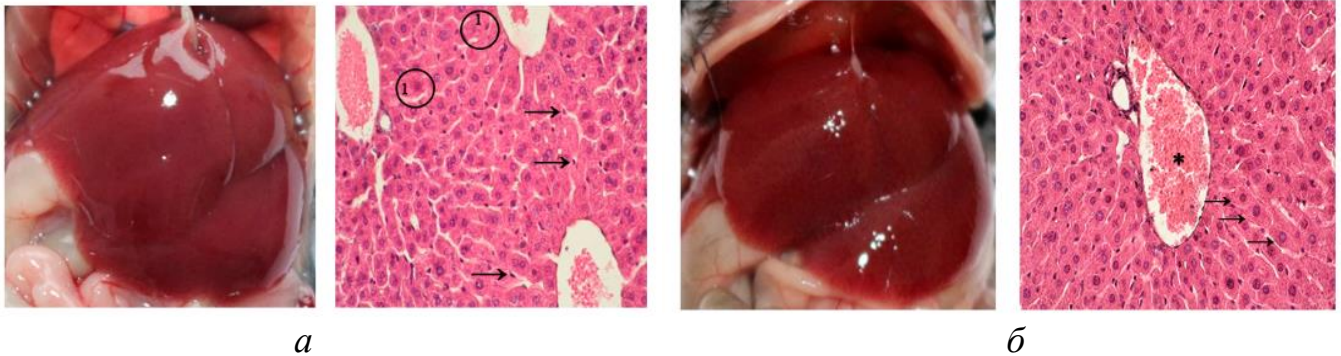


**Рис. 1.** Макрофотографії та приклади гістологічних препаратів фрагментів печінки мишей: *а* – група здорових тварин (→ – гепатоцити, розташовані у вигляді балки, \* – центральна вена); *б* – тварини групи ТАА (→ – інфільтрація паренхіми клітинами імунної системи, 1 – білково-гідропічна дистрофія, 2 – гепатоцити у вигляді гомогенної еозинофільної маси з явищами каріолізу). Забарвлення гематоксиліном та еозином, х400

Застосування комплексу ОРН-D-M у дозі 200 мг/кг з лікувальною метою зменшувало ТАА-індуковану гепатотоксичність. Це проявлялось у зниженні вираженості морфологічних реакцій. Зразки печінки тварин даної групи не мали явних ознак пошкодження на морфологічному рівні і були подібними до здорової печінки групи здорових тварин, проте колір печінки був дещо блідіший порівняно з групою здорових тварин (рис. 2 *а*). Гістологічні дослідження печінки даної групи тварин показали зменшення некротичних і апоптотичних ділянок зі збереженою архітектурою паренхіми печінки та відсутністю центрально-лобулярного некрозу. Проте, у більшості тварин даної групи виявлено незначну лімфогістіоцитарну інфільтрацію (<15 клітин у полі зору) в центрально-лобулярній зоні (рис. 2 *а*). В

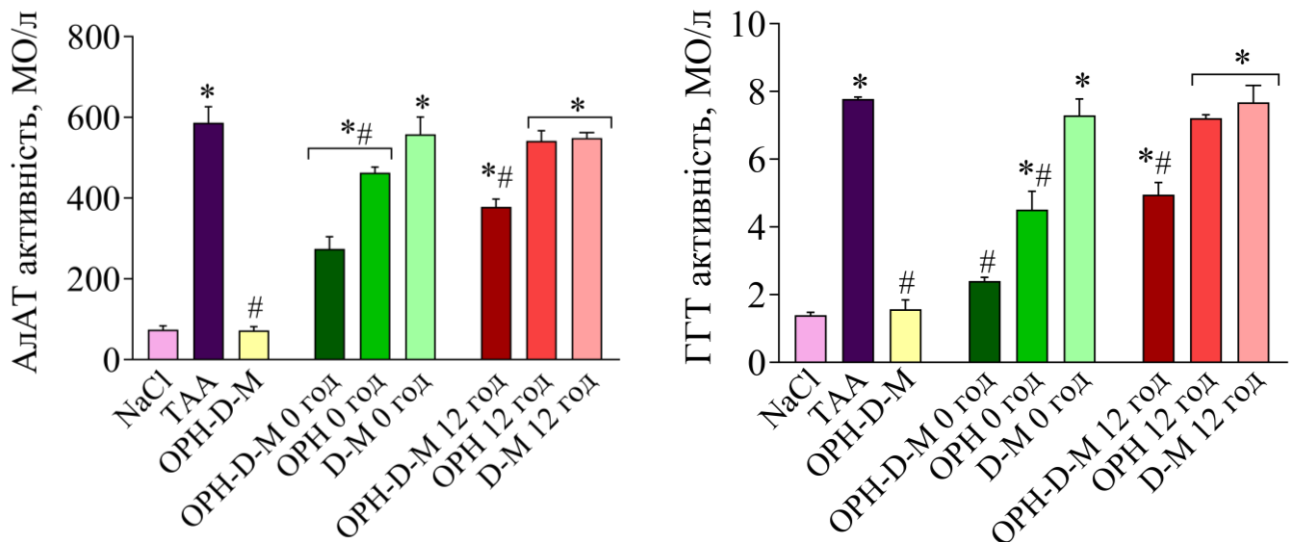


групі контролю препарату стан печінки був без виражених паталогічних змін і не відрізнявся від здорових мишей (рис. 2 б). Морфологічний стан печінки тварин та гістологічні препарати даної групи були аналогічні як у тварин групи NaCl. Аналіз отриманих даних свідчить, що комплекс є нетоксичним у дозі 200 мг/кг маси тіла тварин.



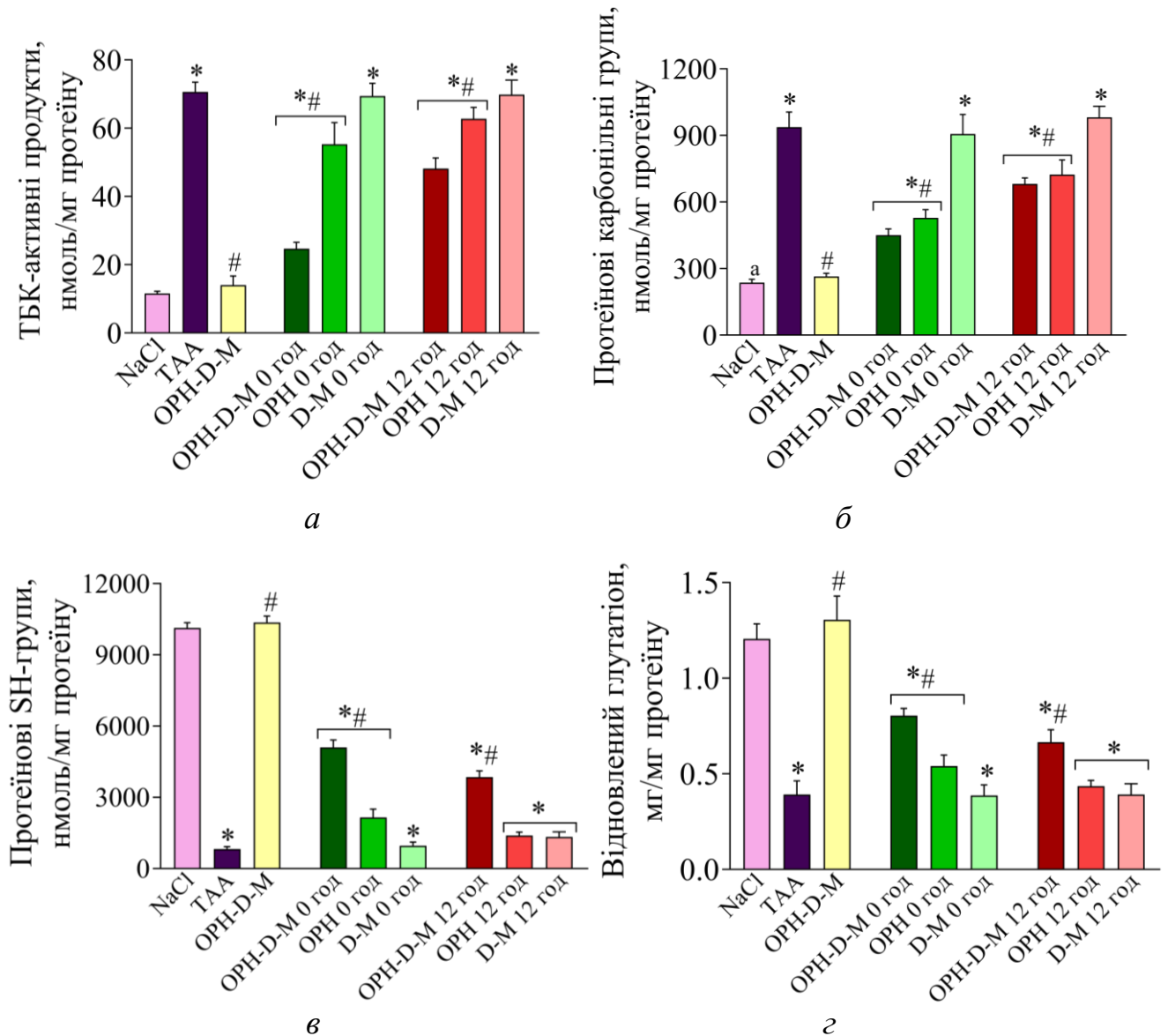
**Рис. 2.** Макрофотографії та приклади гістологічних препаратів фрагментів печінки мишей: *а* – група лікування ОРН-D-M (→ – інфільтрація паренхіми клітинами імунної системи, 1 – білково-гідропічна дистрофія); *б* – група контролю ОРН-D-M (→ – гепатоцити, розташовані у вигляді балки, \* – центральна вена). Забарвлення гематоксиліном та еозином, х400

ТАА-індукована гепатотоксичність характеризується значним порушенням структури клітинних мембран, некрозом гепатоцитів та витоком цитозольних печінкових ферментів в позаклітинний простір (Akhtar T., 2013). Тому, активність АлАТ та ГГТ в сироватці крові має важливе значення для ідентифікації ураження печінки, цілісності мембран гепатоцитів та ступеня пошкодження клітин печінки. Показано, що введення тваринам 500 мг/кг ТАА призводило до підвищення АлАТ та ГГТ активностей у сироватці крові у 8 та 6 разів, порівняно з показниками здорових тварин (рис. 3). Водночас ці показники були зменшені у групах тварин, які отримували лікування комплексом від початку дослідження (група ОРН-D-M 0 год) та через 12 год після індукції гепатотоксичності (група ОРН-D-M 12 год). Зокрема, було виявлено зниження активності АлАТ у групах ОРН-D-M 0 год та ОРН-D-M 12 год на 53 та 36 % порівняно з групою тварин, що отримувала ТАА. Також, спостерігалось зниження ГГТ активності у сироватці крові обох досліджуваних груп тварин, які отримували лікування ОРН-D-M. Крім того показано, зниження активностей АлАТ і ГГТ на 21 та 43 % у групі ОРН 0 год порівняно з групою ТАА. І навпаки, у групах ОРН 12 год, D-M 0 год, D-M 12 год показники АлАТ та ГГТ активностей статистично достовірно ( $p < 0,05$ ) не відрізнялись від групи ТАА.



**Рис. 3.** АЛАТ і ГГТ активності у сироватці крові мишей через 48 годин після застосування ТАА та лікувального впливу ОРН-D-M, ОРН та D-M через 12 годинні інтервали при їх застосуванні від початку дослідження (0 год) та через 12 год після застосування ТАА (12 год): \* – різниця порівняно з групою NaCl,  $p < 0,05$ ; # –  $p < 0,05$  різниця порівняно з групою ТАА,  $p < 0,05$

**ОРН-D-M модулюють оксидативний стрес та роботу антиоксидантної системи при гострій гепатотоксичності.** Гепатотоксичність ТАА опосередковується його ксенобіотичною біотрансформацією з утворенням реакційноздатних інтермедіатів – сульфоксиду (TASO), діоксиду (TASO<sub>2</sub>) та АФК з вираженими прооксидантними активностями (Chilakarati J., 2005), тому наступні дослідження стосувалися вивчення впливу ОРН-D-M на інтенсивність генерації продуктів оксидативної деградації при гострій гепатотоксичності та активності ферментів антиоксидантної ланки захисту. Показано, що гостра ТАА-індукована гепатотоксичність характеризувалась високими рівнями продуктів пероксидного окислення ліпідів (у 6 разів), протеїнових карбонільних груп (у 4 рази) з одночасним зниженням рівнів протеїнових SH груп (у 12 разів) та відновленого глутатіону (на 70 %) порівняно з групою здорових тварин (рис. 4). На противагу цьому, лікування комплексом ОРН-D-M від початку ініціації гепатотоксичності (група ОРН-D-M 0 год) та через 12 год після введення токсину (група ОРН-D-M 12 год) зменшувало рівні пероксидного окислення ліпідів (на 65 та 32 % відповідно), протеїнових карбонільних груп (на 52 та 28 % відповідно) з одночасним підвищенням рівнів протеїнових SH груп (у 6 та 5 разів відповідно) та відновленого глутатіону (на 98 та 69 % відповідно) порівняно з показниками тварин, які отримували токсин. Варто зауважити, що не було виявлено оксидативного пошкодження біополімерів клітин печінки під впливом ОРН-D-M у дозі 200 мг/кг, що свідчить про не токсичність комплексу (рис. 4).



**Рис. 4.** Рівні TBK-активних продуктів (а), протеїнових карбонільних груп (б), протеїнових SH-груп (в) та відновленого глутатіону (г) у печінці мишей через 48 годин після застосування TAA та лікувального впливу ORN-D-M, ORN та D-M через 12 годинні інтервали при їх застосуванні від початку дослідження (0 год) та через 12 год після застосування TAA (12 год): \* – різниця порівняно з групою NaCl,  $p < 0,05$ ; # –  $p < 0,05$  різниця порівняно з групою TAA,  $p < 0,05$

Розвиток гострої гепатотоксичності супроводжується прооксидантно-антиоксидантним дисбалансом та зниженням активності антиоксидантної системи печінки, якій належить основна роль у знешкодженні вільних радикалів (Zhang С., 2018). Результати наших досліджень продемонстрували, що через 48 год після TAA-індукованої інтоксикації активності як глутатіон-S-трансферази (ГТ), так і глутатіонпероксидази (ГП) знижувались на 47 та 44 % порівняно з групою здорових тварин (Таблиця 1). Проте, знижена каталітична активність ГТ була значно підвищена у групах ORN-D-M 0 год, ORN-D-M 12 год та ORN 0 год на 43, 29 та 29 % порівняно з групою токсину. Аналогічна тенденція спостерігалась щодо активності

ГП у групах ОРН-D-M 0 год, ОРН-D-M 12 год та ОРН 0 год, де цей показник підвищувався на 51, 27 та 37 % порівняно з групою ТАА. І навпаки, у групах тварин ОРН 12 год, D-M 0 год та D-M 12 год активність досліджуваних ферментів залишалася незмінною. Також, незмінна активність досліджуваних ферментів порівняно з групою NaCl спостерігалась у тварин, які отримували ОРН-D-M у якості контролю (група ОРН-D-M).

Аналіз отриманих даних вказує на те, що комплекс ОРН-D-M проявляє антиоксидантні властивості та здатний ефективно підвищувати ГП та ГТ активності при гострій інтоксикації мишей ТАА.

Таблиця 1

ГП та ГТ активності в паренхімі печінки мишей при ТАА-індукованій гострій гепатотоксичності

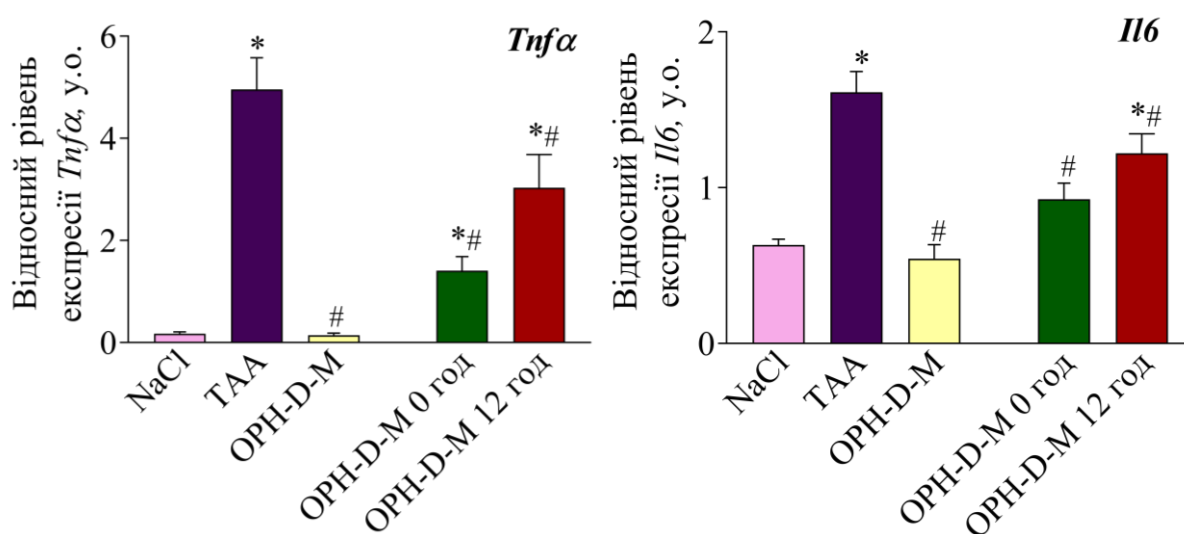
Групи	ГП активність, нмоль/хв/мг протеїну	ГТ активність, мкмоль/хв/ мг протеїну
NaCl	276,7 ± 19,7	1,2 ± 0,13
ТАА	146,6 ± 17,8 *	0,7 ± 0,15 *
ОРН-D-M	284,7 ± 20,9 #	1,2 ± 0,10 #
ОРН-D-M 0 год	221,1 ± 21,7 *#	1,0 ± 0,16 *#
ОРН 0 год	201,3 ± 13,3 *#	0,9 ± 0,08 *#
D-M 0 год	135,2 ± 7,7 *	0,6 ± 0,09 *
ОРН-D-M 12 год	186,4 ± 4,4 *#	0,9 ± 0,07 *#
ОРН 12 год	158,2 ± 17,6 *	0,6 ± 0,14 *
D-M 12 год	139,7 ± 15,9 *	0,6 ± 0,08 *

Примітка: \* –  $p < 0,05$  відмінності статистично достовірні щодо значень групи NaCl; # –  $p < 0,05$  відмінності статистично достовірні щодо значень групи ТАА

Серії отриманих результатів дисертаційного дослідження показали, що ОРН-D-M зменшують пошкодження паренхіми печінки при ТАА-індукованій гепатотоксичності, тому можна припустити, що ОРН-D-M мають гепатопротекторний потенціал при гепатотоксичності, проте молекулярні механізми їхньої дії залишаються не з'ясовані. Тому, наступні наші дослідження були направлені на пошук потенційного механізму дії ОРН-D-M при гепатотоксичності.

**Вплив комплексу ОРН-D-M на рівні відносної експресії генів ключових прозапальних цитокінів та транскрипційного фактору *Nfkb1*.** Запалення є невід'ємною частиною реакції загоєння печінки після пошкодження викликаного дією токсину. Хоч запалення є корисним і необхідним, сприяючи регенерації після масивного пошкодження, проте надмірна імунна відповідь посилює пошкодження клітин шляхом ініціювання надмірного агресивного запального процесу (Luedde, T., 2011). Раніше було показано, що комплекс ОРН-D-M має вплив на цитокіновий профіль при цукровому діабеті II типу (Зельоний, І. І., 2014), тому ми припустили, що він може зменшувати запалення і у моделі гострої гепатотоксичності.

Результати проведених досліджень засвідчили високий рівень відносної експресії прозапальних цитокінів *Tnfa* та *Il6* у 29 та 3 рази у тварин групи ТАА порівняно з групою здорових тварин (рис. 5). Після введення ОРН-D-M з лікувальною метою (група ОРН-D-M 0 год та ОРН-D-M 12 год) спостерігалось значне зниження рівня відносної експресії гена *Tnfa* на 72 та 39 % порівняно з групою тварин, що отримувала ТАА. Така сама тенденція спостерігалась щодо показника *Il6*. Застосування ОРН-D-M з лікувальною метою статистично достовірно знижувало рівень відносної експресії прозапального цитокіну *Il6* на 64 та 53 % починаючи лікування з 0 год та через 12 год, порівняно з показниками групи ТАА (рис. 5).



**Рис. 5.** Рівні відносної експресії генів *Tnfa* та *Il6* через 48 годин після застосування ТАА та лікувального впливу ОРН-D-M через 12 годинні інтервали при їх застосуванні від початку дослідження (0 год) та через 12 год після застосування ТАА (12 год): \* – різниця порівняно з групою NaCl,  $p < 0,05$ ; # –  $p < 0,05$  різниця порівняно з групою ТАА,  $p < 0,05$

Оскільки гостра ТАА-індукована гепатотоксичність характеризується надекспресією універсального транскрипційного фактору *Nfkb1*, який контролює експресію цитокінів (у тому числі *Tnfa* та *Il6*), хемокінів та прооксидантних генів (Dwivedi D., 2020), ми припустили, що ОРН-D-M реалізує свій гепатопротекторний потенціал саме через вплив на рівень відносної експресії *Nfkb1*.

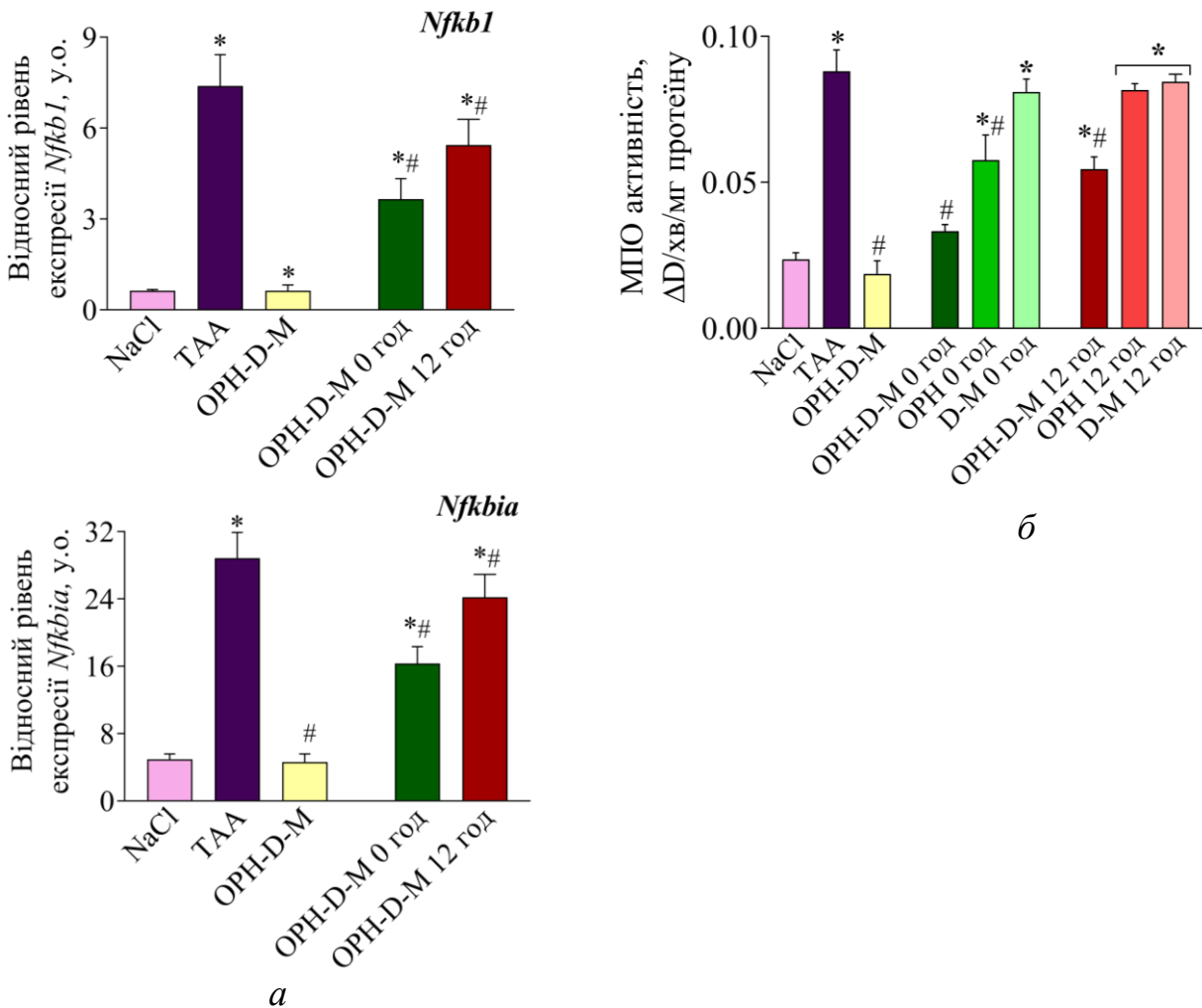
Згідно отриманих нами даних, у тварин групи ТАА рівень відносної експресії *Nfkb1* та *Nfkbia* був значно підвищений у 12 та 6 разів відповідно ( $p < 0,05$ ) порівняно з групою тварин NaCl. На противагу цьому, лікування комплексом ОРН-D-M у дозі 200 мг/кг маси тіла тварин через 12-годинні інтервали (групи ОРН-D-M 0 год, ОРН-D-M 12 год) знижувало рівні відносної експресії гену *Nfkb1* на 51 та 27 % порівняно з групою ТАА. Аналогічна тенденція спостерігалась щодо рівня відносної експресії *Nfkbia*. У групах ОРН-D-M 0 год та ОРН-D-M 12 год рівень відносної експресії гена *Nfkbia* був знижений на 43 та 16 % порівняно з групою тварин, що отримувала токсин. Варто зауважити, що введення ОРН-D-M здоровим тваринам не



призводило до зміни профілів відносної експресії досліджуваних генів (рис. 6 а).

Крім того, рекрутинг нейтрофілів у паренхіму печінки, який викликаний запаленням, був знижений у печінці мишей, які тримували лікування комплексом ОРН-D-M. У групах лікування ОРН-D-M 0 год та ОРН-D-M 12 год виявлено зниження рівня мієлопероксидазної (МПО) активності на 58 та 39 % порівняно з групою тварин, яка отримувала ТАА (рис. 6 б).

Таким чином, аналіз отриманих даних показав, що комплекс ОРН-D-M, впливаючи на профіль відносної експресії транскрипційного фактору *Nfkb1*, знижує розвиток запалення, що корелює з низькою МПО активністю в паренхімі печінки.

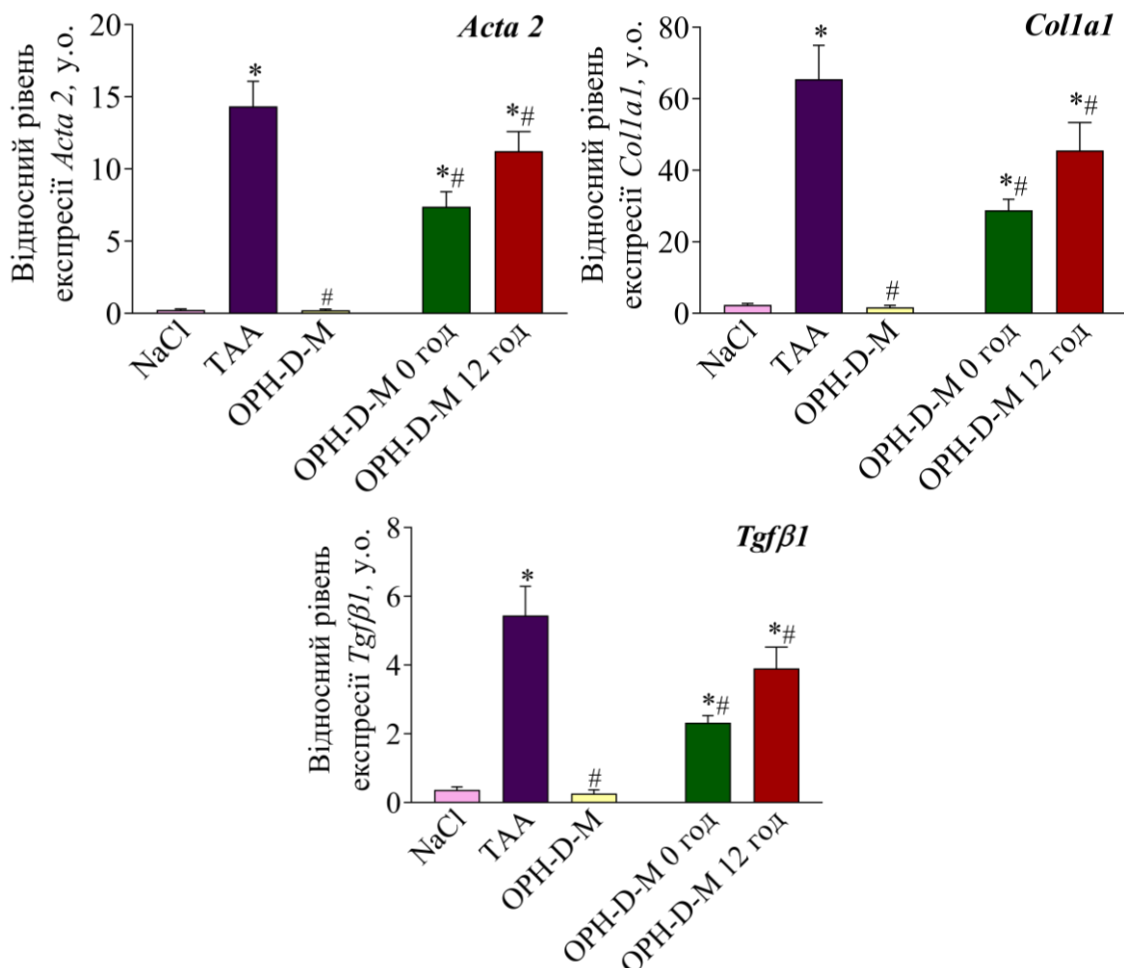


**Рис. 6.** а – рівні відносної експресії генів *Nfkb1*, *Nfkb1a* та б – МПО активність в паренхімі печінки через 48 годин після застосування ТАА та лікувального впливу ОРН-D-M через 12 годинні інтервали при їх застосуванні від початку дослідження (0 год) та через 12 год після застосування ТАА (12 год): \* – різниця порівняно з групою NaCl,  $p < 0,05$ ; # –  $p < 0,05$  різниця порівняно з групою ТАА,  $p < 0,05$

**Вплив комплексу ОРН-D-M на активацію стелатних клітин печінки при гострій гепатотоксичності.** Гостра гепатотоксичність індукує активацію стелатних клітин печінки та ремоделювання позаклітинного матриксу, тому дослідження впливу комплексу ОРН-D-M на рівні відносної експресії генів *Acta 2*, *Tgfβ1* та

*Coll1a1* є важливими для розуміння можливого механізму дії препарату.

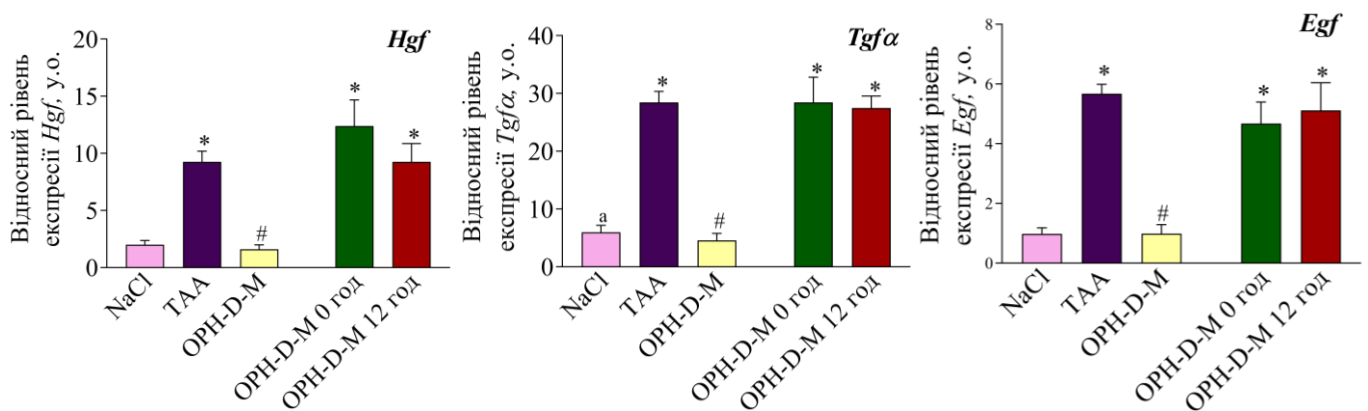
Аналіз експериментальних даних показав значний рівень відносної експресії гена *Acta 2* в паренхімі печінки тварин, які отримали 500 мг/кг ТАА, у 60 разів порівняно з групою здорових тварин (рис. 7). Це свідчить про значну активацію спокійних стелатних клітин печінки та їх перехід до міофібробластичного типу, оскільки *Acta 2* виступає репрезентативним геном активованих стелатних клітин. На противагу цьому, за умов лікування ОРН-D-M, рівень відносної експресії гена *Acta 2* був знижений на 48 та 22 % у групах тварин ОРН-D-M 0 год і ОРН-D-M 12 год (рис. 7). Крім того, ТАА значно підвищував рівень відносної експресії гена *Coll1a1* у 28 разів порівняно з групою тварин NaCl (рис. 7). І навпаки, у групах ОРН-D-M 0 год та ОРН-D-M 12 год цей показник був значно ( $p < 0,05$ ) нижчим на 56 та 30 % порівняно з групою тварин, що отримувала гепатотоксин. Аналогічна тенденція спостерігалась щодо рівня відносної експресії профіброгенного цитокіну *Tgfβ1*. У групах лікування ОРН-D-M 0 год та ОРН-D-M 12 год рівень відносної експресії *Tgfβ1* знижений - на 57 та 28 % порівняно з групою ТАА (рис. 7).



**Рис. 7.** Рівні відносної експресії генів *Acta 2*, *Tgfβ1* та *Coll1a1* через 48 годин після застосування ТАА та лікувального впливу ОРН-D-M через 12 годинні інтервали при їх застосуванні від початку дослідження (0 год) та через 12 год після застосування ТАА (12 год): \* – різниця порівняно з групою NaCl,  $p < 0,05$ ; # –  $p < 0,05$  різниця порівняно з групою ТАА,  $p < 0,05$

**Вивчення експресії основних мітогенів печінки при ТАА-індукованій гепатотоксичності за дії ОРН-D-M.** Печінка володіє унікальною здатністю до регенерації, що полягає у відновленні архітектури та маси органу за відносно короткий проміжок часу, навіть коли велика частина органу зруйнована (Gilgenkrantz H., 2018). На молекулярному рівні регенерація печінки потребує залучення основних мітогенів (HGF, EGF, TGF $\alpha$ ), які забезпечують перехід «спокійних» клітин печінки до інтенсивного поділу при пошкодженні органу (Yagi S., 2020). Тому ми припустили, що комплекс ОРН-D-M може реалізовувати свою гепатопротекторну дію шляхом індукції основних мітогенів.

Результати зміни рівнів відносної експресії генів *Hgf*, *Tgfa* та *Egf* при гострій гепатотоксичності показали значне підвищення рівнів відносної експресії генів *Hgf*, *Tgfa* та *Egf* у 5, 5 та 6 разів порівняно з групою здорових тварин (рис. 8). Аналіз патернів відносної експресії *Hgf*, *Tgfa* та *Egf* при лікуванні комплексом від початку дослідження (група ОРН-D-M 0 год) також показав підвищення досліджуваних показників у 6, 5 та 5 разів порівняно з групою тварин NaCl. Проте отримані результати статистично достовірно не відрізнялись від показників групи тварин, які отримували ТАА. Аналогічна тенденція спостерігалась щодо рівнів відносної експресії основних мітогенів і у групі лікування ОРН-D-M через 12 год після ініціації гепатотоксичності (група ОРН-D-M 12 год). Рівні відносної експресії досліджуваних генів у даній групі були підвищеними у 5, 5 та 6 разів порівняно з групою здорових тварин і в той же час залишались статистично незмінними відносно групи тварин, які отримували токсин (рис. 8).

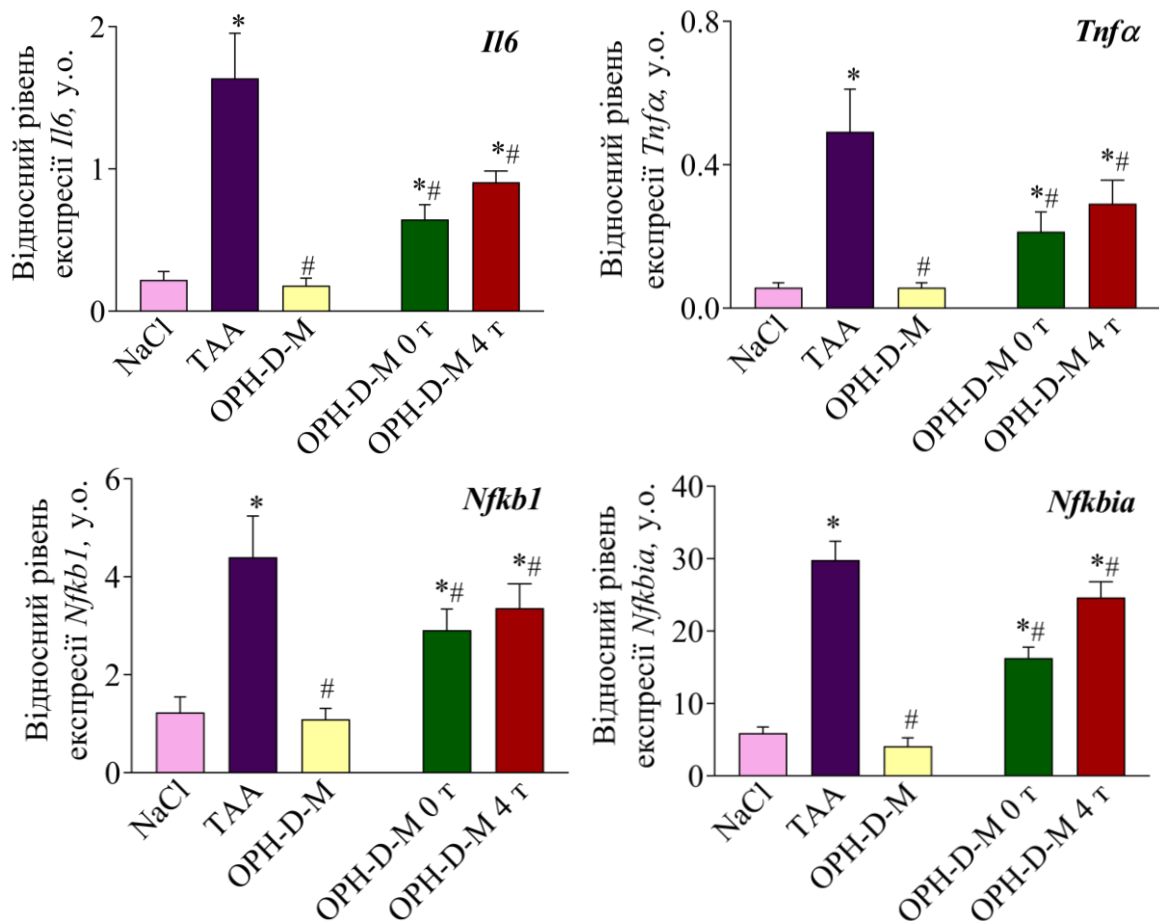


**Рис. 8.** Рівні відносної експресії генів *Hgf*, *Tgfa* та *Egf* через 48 годин після застосування ТАА та лікувального впливу ОРН-D-M через 12 годинні інтервали при їх застосуванні від початку дослідження (0 год) та через 12 год після застосування ТАА (12 год): \* – різниця порівняно з групою NaCl,  $p < 0,05$ ; # –  $p < 0,05$  різниця порівняно з групою ТАА,  $p < 0,05$

**Експресія прозапальних та профіброзних генів за дії комплексу ОРН-D-M при хронічному ураженні печінки.** Для підтвердження отриманих ефектів комплексу ОРН-D-M в умовах гострої гепатотоксичності наступним етапом дисертаційної роботи було вивчення впливу ОРН-D-M на рівні відносної експресії



прозапальних та профіброзних генів з тривалою в часі експозицією токсину. Відомо, що тривала дія гепатотоксину призводить до стійкого запального процесу та руйнування клітин печінки (Koyama Y., 2017). Тому, нами досліджено вплив комплексу ОРН-D-M на рівні відносної експресії генів *Il6* та *Tnfa*, як медіаторів запального процесу, та універсального транскрипційного фактору *Nfkb1* при хронічному ураженні печінки. Проведені дослідження показали значний рівень відносної експресії *Il6* та *Tnfa* у 8 та 10 разів при довготривалому застосуванні ТАА порівняно з групою NaCl, що свідчить про запальний процес у паренхімі печінки (рис. 9). Однак, введення ОРН-D-M від початку дослідження (група ОРН-D-M 0 т) знижувало рівні відносної експресії *Il6* та *Tnfa* на 61 та 34 % порівняно з групою ТАА. Варто зауважити, що аналогічна тенденція зберігалася у групі ОРН-D-M 4 т. Рівні відносної експресії *Il6* та *Tnfa* були на 44 та 42 % нижчими порівняно з показниками тварин, що отримували лише ТАА. При цьому, самі ОРН-D-M не змінювали патерни експресії досліджених генів при довготривалому застосуванні (рис. 9).

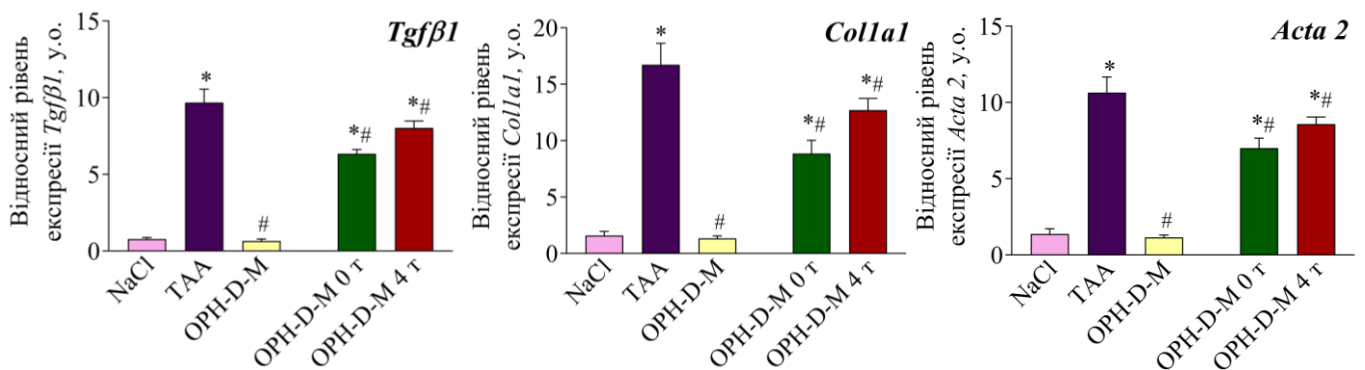


**Рис. 9.** Рівні відносної експресії генів *Il6*, *Tnfa*, *Nfkb1* та *Nfkbia* через 8 тижнів після застосування ТАА та щоденного лікувального впливу ОРН-D-M при їх застосуванні від початку дослідження (ОРН-D-M 0 т) та через 4 тижні після індукції хронічного токсичного гепатотоксичного ураження (ОРН-D-M 4 т): \* – різниця порівняно з групою NaCl,  $p < 0,05$ ; # –  $p < 0,05$  різниця порівняно з групою ТАА,  $p < 0,05$

Аналіз профілів відносної експресії генів *Nfkb1* та *Nfkbia* показав, що лікування комплексом ОРН-D-M як від початку дослідження так і через 4 тижні після ініціації хронічного токсичного ураження знижувало рівень відносної експресії *Nfkb1* на 34 та 24 % порівняно з групою тварин, що отримувала ТАА. Тотожні результати спостерігалися при дослідженні рівня відносної експресії *Nfkbia*. Застосування комплексу призводило до зниження рівня мРНК *Nfkbia* в обох дослідних групах тварин, які отримували препарати з лікувальною метою (рис. 9).

Тривалий оксидативний стрес та хронічне запалення призводить до стійкої реакції загосення печінки, активації фіброгенезу печінки та надмірного накопичення компонентів позаклітинного матриксу (Parola M., 2019). Тому, наступним етапом наших досліджень, було визначення рівнів відносної експресії фіброз-асоційованих генів (*Tgfb1*, *Acta 2*, *Colla1*) для оцінки ефекту лікування комплексом ОРН-D-M на ТАА-індукований фіброгенез печінки у мишей.

Виявлено значне підвищення рівнів відносної експресії генів *Tgfb1*, *Acta 2* та *Colla1* у 12, 8 та 11 разів у тварин з хронічним токсичним ураженням печінки (рис. 10). Лікувальне введення ОРН-D-M від початку дослідження (група ОРН-D-M 0 т) та через 4 тижні після початку ініціації хронічного токсичного ураження ТАА (група ОРН-D-M 4 т) знижувало рівень відносної експресії гена *Tgfb1* на 43 та 26 % порівняно з групою тварин, яка отримувала токсин. Слід зазначити, що застосування ОРН-D-M також знижувало підвищені рівні відносної експресії *Colla1* та *Acta 2* (рис. 10).

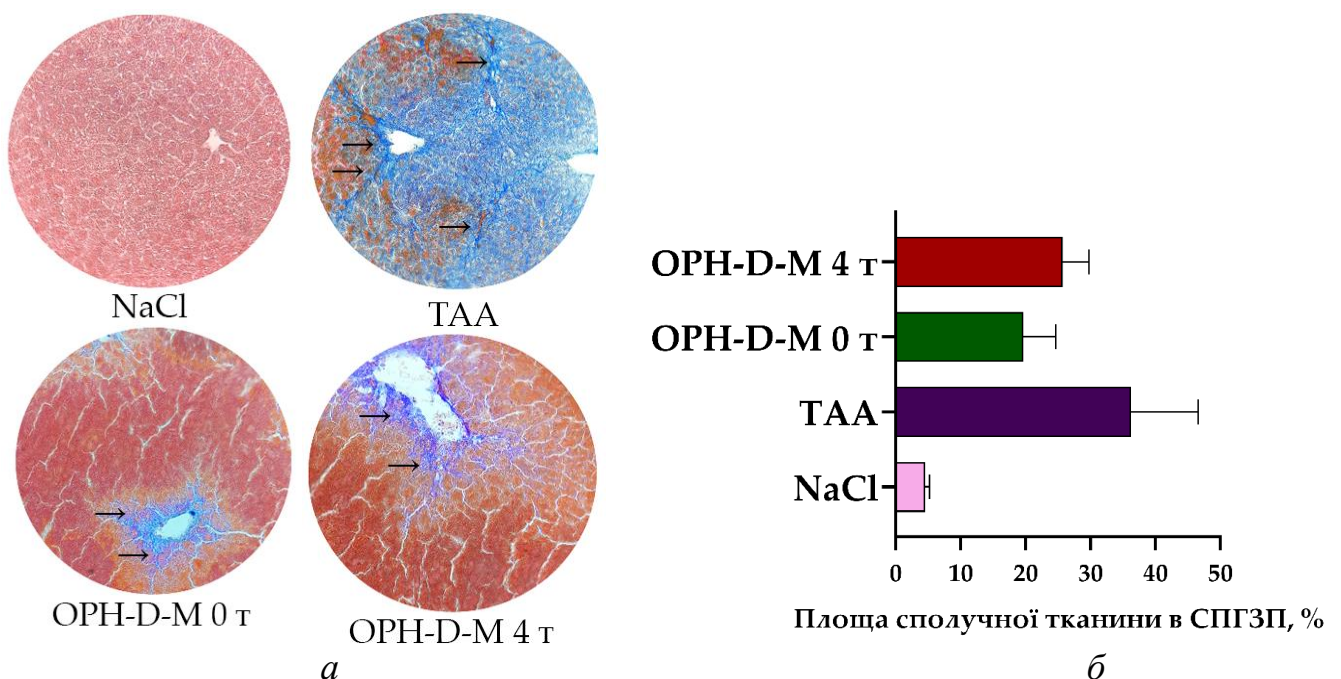


**Рис. 10.** Рівні відносної експресії генів *Tgfb1*, *Colla1* та *Acta 2* через 8 тижнів після застосування ТАА та щоденного лікувального впливу ОРН-D-M при їх застосуванні від початку дослідження (ОРН-D-M 0 т) та через 4 тижні після індукції хронічного токсичного гепатоураження (ОРН-D-M 4 т): \* – різниця порівняно з групою NaCl,  $p < 0,05$ ; # –  $p < 0,05$  різниця порівняно з групою ТАА,  $p < 0,05$

Отримані результати щодо інгібування експресії фіброз-асоційованих генів за дії комплексу спонукали нас провести гістологічні дослідження для ідентифікації колагенових волокон сполучної тканини в паренхімі печінки мишей при ТАА-індукованому хронічному ураженні.

Результати наших досліджень показали, що довготривале застосування гепатотоксину призвело до руйнування структури печінки та спричинило значні відкладення пучків колагенових волокон в портальних зонах (забарвлені темно-

синім кольором), які утворили внутрішньочасточкові фіброзні септи (рис. 11 *а*). Крім того, спостерігалась запальна інфільтрація в портальній зоні та прилеглих областях. Підрахунок площі сполучної тканини в досліджуваній групі показав, що новоутворена сполучна тканина складає 35 % від загальної площі паренхіми печінки (рис. 11 *б*). На противагу, у групі тварин ОРН-D-M 0 т архітектура печінки була збереженою і ділянки явного пошкодження були невеликі. Кількість відкладень сполучної тканини була на 46 % менше порівняно з групою ТАА, проте навколо судин виявлялись колагенові пучки. Лікування комплексом ОРН-D-M через 4 тижні після індукції хронічного токсичного гепатоураження (ОРН-D-M 4 т) теж проявляло захисний ефект, проте спостерігалась більша кількість фіброзних септ порівняно з групою ОРН-D-M 0 т. Площа сполучної тканини у досліджуваній групі тварин була на 29 % менше порівняно з групою тварин, яка отримувала токсин.



**Рис. 11.** *а* – Приклади гістологічних препаратів фрагментів печінки здорових тварин (група NaCl), тварин з хронічним токсичним ураженням (група ТАА) та тварин, які отримували лікування ОРН-D-M від початку дослідження (ОРН-D-M 0 т) та через 4 тижні після індукції хронічного токсичного гепатоураження (ОРН-D-M 4 т). Колагенові волокна (→). Зabarвлення за Маллорі, x200; *б* – площа сполучної тканини у гістологічних препаратах фрагментів печінки, визначена методом Маллорі в % стандартизованої площі гістологічного зрізу печінки (СПГЗП) у здорових тварин (група NaCl), тварин з хронічним токсичним ураженням (група ТАА) та тварин, які отримували лікування ОРН-D-M від початку дослідження (ОРН-D-M 0 т) та через 4 тижні після індукції хронічного токсичного гепатоураження (ОРН-D-M 4 т)

## ВИСНОВКИ

У результаті комплексного дослідження потенційної гепатопротекторної дії препарату ОРН-D-M та можливих молекулярних механізмів його дії показано пригнічення оксидативного стресу, запалення та активації стелатних клітин печінки при гострій та хронічній гепатотоксичності.

1. Застосування ОРН-D-M при гострій гепатотоксичності призводить до збереження архітектури печінки, зниження розвитку центрально-лобулярного некрозу та показників ураження паренхіми печінки.

2. Введення ОРН-D-M призводить до зменшення ТAA-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 при гострому токсичному ураженні печінки.

3. При гострій гепатотоксичності у печінці тварин показано, що зниження рівня відносної експресії транскрипційного фактору *Nfkb1* за дії ОРН-D-M призводить до пригнічення рівнів відносної експресії генів *Il6*, *Tnfa* та зменшення запальної інфільтрації нейтрофілами.

4. Введення комплексу ОРН-D-M за умов гострої гепатотоксичності призводить до зниження рівнів відносної експресії генів *Tgfb1*, *Colla1* та *Acta 2* в паренхімі печінки мишей.

5. За умов ТAA-індукованого гострого ураження печінки показано, що комплекс ОРН-D-M не впливає на профілі відносної експресії ростових генів *Hgf*, *Tgfa* та *Egf*, які залучені у регенерації печінки.

6. Застосування комплексів ОРН-D-M на фоні ТAA-індукованого хронічного токсичного ураження призводить до зниження підвищених рівнів відносної експресії генів *Nfkb1*, *Nfkbia*, прозапальних цитокінів (*Il6*, *Tnfa*) та профіброзних генів (*Tgfb1*, *Colla1*, *Acta 2*) в паренхімі печінки, що призводить до зменшення відкладень сполучної тканини та зменшення розвитку фіброзу печінки.

## СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. I. O. Shmarakov, T. V. Marchyshak, V. L. Borschovetska, M. M. Marchenko, Z. Yu. Tkachuk Hepatoprotective activity of exogenous RNA // Ukr. Biochem. J. – 2015. – V. 87. – № 4. – P. 37-44. (*Особистий внесок дисертанта – разом із співавторами підбір методів дослідження та проведення експерименту, обробка та аналіз отриманих результатів, написання та підготовка публікації до друку*).

2. Т. В. Марчишак, Т. Г. Яковенко, З. Ю. Ткачук Вплив комплексів олігорибонуклеотидів з D-манітолом на експресію генів при гострій тїоацетамід-індукованій гепатотоксичності // Допов. Нац. Акад. Наук Укр. – 2018. – № 7. – С. 96-102. (*Особистий внесок дисертанта – планування експерименту, проведення гострої гепатотоксичності, проведення ПЛР-аналізу експресії генів, обробка та аналіз отриманих результатів, написання та підготовка публікації до друку*).

3. Т. Marchyshak, T. Yakovenko, I. Shmarakov, Z. Tkachuk The Potential Protective Effect of Oligoribonucleotides-D-Mannitol Complexes against Thioacetamide-

Induced Hepatotoxicity in Mice // *Pharmaceuticals*. – 2018. – V. 11. – № 77. – P. 1-14. (Особистий внесок дисертанта – постановка та проведення експерименту, обробка та аналіз отриманих результатів, написання та підготовка публікації до друку).

4. **T. Marchyshak**, T. Yakovenko, Z. Tkachuk Effect of oligoribonucleotides with D-mannitol complexes on oxidative stress indicators against thioacetamide-induced liver fibrosis // *ScienceRise: Biological Science*. – 2020. – V. 10. – № 3. – P. 35-40. (Особистий внесок дисертанта – разом із співавторами проведення хронічної гепатотоксичності, визначення показників оксидативного пошкодження біомолекул, статистичний аналіз даних, написання та підготовка публікації до друку).

5. **Т. В. Марчишак**, И. А. Шмаракоев Гепатопротекторная активность экзогенной РНК // *Материалы 18 Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых*. – Пущино, Россия. – 2014. – С. 149-150.

6. **T. Marchyshak**, I. Shmarakov, Z. Tkachuk Hepatoprotective effect of oligoribonucleotides-D-mannitol complexes under thioacetamide-induced hepatotoxicity // *Materials of XI annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Biopolym. Cell*. – Kyiv, Ukraine. – 2017. – № 3. – P. 228.

7. **Т. В. Марчишак**, Т. Г. Яковенко, І. О. Шмаракоев, З. Ю. Ткачук Гепатопротекторна активність комплексів олігорибонуклеотидів з D-манітолом // *Матеріали V науково-практичної конференції школи молодих науковців ПАТ «Фармак»*. – Київ, Україна. – 2017. – С. 53.

8. **T. Marchyshak**, I. Shmarakov, Z. Tkachuk Hepatoprotective Effect of Oligoribonucleotides-D-mannitol Complexes under Thioacetamide-induced Hepatotoxicity // *In Proceedings of the 3rd Int. Electron. Conf. Med. Chem. Sciforum Electronic Conference Series*. – 2017. – Vol. 3. – P.1-12.

9. **T. V. Marchyshak**, T. G. Yakovenko, L. I. Semernikova, Z. Yu. Tkachuk Effect of oligoribonucleotides-D-mannitol complexes on the expression of pro-inflammatory and profibrotic genes at the thioacetamide induced liver fibrosis // *Materials of XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Biopolym. Cell*. – Kyiv, Ukraine. – 2018. – № 2. – P. 145.

10. **T. V. Marchyshak**, T. G. Yakovenko, L. I. Semernikova, Z. Yu. Tkachuk The Potential Protective Effect of Oligoribonucleotides-D-Mannitol Complexes against Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis // *Abstracts of XI Parnas Conference, Ukr. Biochem. J*. – Kyiv, Ukraine. – 2018. – V. 90. – P. 111.

11. **T. Marchyshak**, Z. Tkachuk Effect of oligoribonucleotides-D-mannitol complexes on the expression of pro-inflammatory and profibrotic genes at the thioacetamide-induced liver fibrosis // *Матеріали VI науково-практичної конференції школи молодих науковців ПАТ «Фармак»*. – Київ, Україна. – 2018. – С. 19-20.

12. **T. Marchyshak**, T. Yakovenko, Z. Tkachuk Hepatoprotective and antioxidant effects of oligoribonucleotides-D-mannitol complexes against thioacetamide-induced liver fibrosis // *In Proceedings of the 4th Int. Electron. Conf. Med. Chem. Sciforum Electronic Conference Series*. – 2018. – Vol. 4. – P.1-11.

13. **Т. В. Марчишак**, Т. Г. Яковенко, З. Ю. Ткачук Вплив комплексів олігорибонуклеотидів з D-манітолом на експресію прозапальних та профіброзних генів при тіоацетамід-індукованому печінковому фіброзі // *Матеріали XII*

українського біохімічного конгресу, Медична та клінічна хімія. – Тернопіль, Україна. – 2019. – Т. 21, №3. – С. 215-216.

### АНОТАЦІЯ

**Марчишак Т. В. Гепатопротекторна дія комплексу олігорибонуклеотидів з D-манітолом при тїоацетамід-індукованій гепатотоксичності у експериментальних моделях тварин.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.03 «Молекулярна біологія». – Інститут молекулярної біології та генетики Національної Академії Наук України, Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню впливу комплексу ОРН-D-M на інтенсивність вільнорадикальних процесів, зміни профілів відносної експресії прозапальних, профіброзних генів та ростових факторів при гепатотоксичності та вивченню потенційної взаємодії ОРН-D-M з ТАА.

Показано, що ОРН-D-M сприяє збереженню архітектури паренхіми печінки, зменшенню центрально-лобулярного некрозу та запальної інфільтрації паренхіми клітинами імунної системи при гострій гепатотоксичності. З'ясовано, що комплекс зумовлює зниження оксидативного пошкодження біополімерів печінки, вираженого у зниженні рівнів продуктів пероксидного окислення ліпідів та білків з одночасним підвищенням роботи антиоксидантної системи при токсичному ураженні печінки. Встановлено, що застосування ОРН-D-M з лікувальною метою при гострій гепатотоксичності знижує надекспресію генів *Nfkb1*, *Il6*, *Tnfa*, *Tgfb1*, *Colla1* та *Acta 2* в паренхімі печінки мишей. Отримані результати гепатопротекторної дії комплексу ОРН-D-M зберігаються з тривалою в часі експозицією токсину.

**Ключові слова:** комплекс ОРН-D-M, ТАА, гепатопротекторна дія, гостра ТАА-індукована гепатотоксичність, хронічне токсичне ураження печінки, оксидативний стрес, рівні відносної експресії прозапальних та профіброзних генів.

### АННОТАЦИЯ

**Марчишак Т. В. Гепатопротекторная действие комплекса олигорибонуклеотидов с D-маннитолом при тїоацетамид-индуцированной гепатотоксичности в экспериментальных моделях животных.** – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.03 «Молекулярная биология». - Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2021.

Диссертационная работа посвящена исследованию влияния комплекса ОРН-D-M на интенсивность свободнорадикальных процессов, изменения профилей относительной экспрессии провоспалительных, профиброзных генов и ростовых факторов при гепатотоксичности и изучению потенциального взаимодействия ОРН-D-M с ТАА.

Показано, что ОРН-D-M способствует сохранению архитектуры паренхимы печени, уменьшению центрально-лобулярного некроза и воспалительной

инфильтрации паренхимы клетками иммунной системы при острой гепатотоксичности. Установлено, что комплекс приводит к снижению оксидативного повреждения биополимеров печени, выраженного в снижении уровней продуктов перекисного окисления липидов и белков с одновременным повышением работы антиоксидантной системы при токсическом поражении печени. Установлено, что применение ОРН-D-M с лечебной целью при острой гепатотоксичности снижает надэкспрессию генов *Nfkb1*, *Il6*, *Tnfa*, *Tgfb1*, *Colla1* и *Acta 2* в паренхиме печени мышей. Полученные результаты гепатопротекторного действия комплекса ОРН-D-M хранятся с длительной во времени экспозицией токсина.

**Ключевые слова:** комплекс ОРН-D-M, ТАА, гепатопротекторное действие, острая ТАА-индуцированная гепатотоксичность, хроническое токсическое поражение печени, оксидативный стресс, уровень относительной экспрессии провоспалительных и профиброзных генов.

## SUMMARY

**Marchyshak T.V. Hepatoprotective effect of oligoribonucleotide complex with D-mannitol in thioacetamide-induced hepatotoxicity in experimental animal models.**  
– Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, speciality 03.00.03 – Molecular Biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

The manuscript is dedicated to the study of the influence of the ORN-D-M complex on the intensity of free radical processes, changes in the profiles of relative expression of proinflammatory, pro-fibrous genes, and growth factors in hepatotoxicity, and the study of the potential interaction of ORN-D-M with TAA.

It is established that the complex contributes to the preservation of the liver parenchyma architecture, reduction of centrilobular necrosis, and inflammatory infiltration of the parenchyma by cells of the immune system in acute hepatotoxicity. It was also found that the complex causes a decrease in oxidative damage to liver biopolymers, expressed in a decrease in the levels of products of peroxidation of lipids and proteins with a simultaneous increase in the antioxidant system in toxic liver damage. It was found that the use of ORN-D-M for therapeutic purposes in acute hepatotoxicity reduces the overexpression of genes *Nfkb1*, *Il6*, *Tnfa*, *Tgfb1*, *Colla1*, and *Acta 2* in the liver parenchyma of mice. The obtained results of hepatoprotective action of the ORN-D-M complex are preserved with long-term exposure to the toxin.

**Key words:** ORN-D-M complex, TAA, hepatoprotective action, acute TAA-induced hepatotoxicity, chronic toxic liver damage, oxidative stress, levels of relative expression of proinflammatory and pro-fibrous genes.