

ВІДЗИВ
офіційного опонента про дисертацію
Яремчук Ольги Зеновіївни
«МЕХАНІЗМИ ДІЇ МОДУЛЯТОРІВ СИСТЕМИ НІТРОГЕН ОКСИДУ
ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АНТИФОСФОЛІПІДНОГО
СИНДРОМУ»
представлену на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук
за спеціальністю 03.00.04 - Біохімія

Антифосфоліпідний синдром (АФС) є однією з небезпечних та відносно поширених аутоімунних захворювань і частою причиною переривання вагітності. При АФС спостерігається порушення функцій внутрішніх органів, ураження центральної нервової системи. АФС виявляють у 27-42 % випадків серед пацієнток із невиношуванням вагітності, при цьому в 90 % жінок без адекватного лікування ембріон гине. Причиною патології є поява в організмі антифосфоліпідних антитіл, які взаємодіють з кислими фосфоліпідами мембран, а також зв'язаними з ними глікопротеїдами.

АФС індукує прокоагуляційний стан, спричиняє високий ризик виникнення тромбозів, прееклампсію, плацентарну недостатність, внутрішньоутробну затримку росту плода тощо. Порушення репродуктивної функції у жінок надає цій проблемі соціального значення. Втім, молекулярні механізми, які лежать в основі розвитку АФС та ураження головного мозку, печінки і нирок при цій патології, на сьогодні залишаються недостатньо з'ясованими.

Важливе значення в механізмах розвитку АФС має ендотеліальна дисфункція, яка проявляється, зокрема, порушенням антитромботичної і протизапальної активності ендотелію. В основі ендотеліальної дисфункції, в першу чергу, лежить зниження біодоступності та функціональної активності нітроген оксиду. Проте є лише поодинокі дослідження щодо порушення синтезу і біодоступності NO в ендотелії за умов АФС. Одним із важливих компонентів патогенезу АФС, що сприяє дисфункції імунокомпетентних клітин і синтезу аутоантитіл, є оксидативний стрес. При взаємодії антитіл із

фосфоліпідами мембран розвивається дисбаланс між прозапальними та антизапальними цитокінами, реалізуються процеси апоптозу та некрозу. У літературі відсутні результати досліджень функціонування системи NO, вільнорадикальних та запальних процесів у внутрішніх органах та центральній нервовій системі за АФС, зокрема під час вагітності.

Отже, вивчення молекулярних механізмів, передусім ролі системи NO у розвитку АФС, та пошук ефективних методів корекції ускладнень, які виникають при цьому, є актуальною проблемою. Вивчення біохімічних механізмів дії модуляторів системи NO за АФС, зокрема L-аргініна як попередника оксиду азоту та інгібіторів різних ізоформ NO-синтази, є важливими чинниками задля вирішення даної проблеми. Тому мета дисертаційної роботи **Яремчук Ольги Зеновіївни**, а саме - встановити роль системи нітроген оксиду в механізмах розвитку антифосфоліпідного синдрому у вагітних і невагітних мишей та з'ясувати механізми реалізації дії попередника синтезу нітроген оксиду L-аргініну та інгібітора індукційної ізоформи NO-синтази аміногуанідину за умов антифосфоліпідного синдрому, є сучасною і актуальною.

Рукопис оформлено згідно існуючих вимог за класичним зразком. У вступній частині дисертантка зупинилася на актуальності обраної теми, акцентувавши увагу на невирішених питаннях щодо біохімічних механізмів розвитку АФС, зв'язку цієї патології з ендотеліальною дисфункцією та системою оксиду азоту, порушенням системи згортання крові, оксидативним стресом, а також можливих шляхах корекції цих патологічних станів. Грамотно сформульовані мета та задачі роботи; наголошується на науковій новизні та практичному значенні одержаних результатів.

У розділі, присвяченому огляду літератури, увага зосереджена на молекулярних механізмах розвитку АФС. Зокрема, аналізується роль ендотелію та системи нітроген оксиду в патогенезі АФС. Розглядається значення антифосфоліпідних антитіл у механізмах розвитку тромбозу судин при АФС, зокрема під час вагітності, та роль антифосфоліпідних антитіл у

формуванні акушерських ускладнень при АФС. Обговорюються питання дисрегуляції цитокінового балансу як одного із факторів розвитку АФС. Авторка приділяє увагу проблемам розвитку апоптозу при АФС, а також впливу нітроген оксиду на процеси реалізації запрограмованої клітинної загибелі. Увага приділена питанням епідеміології, етіології, класифікації та діагностиці АФС і поліорганим ураженням на фоні АФС. Оглядовий розділ закінчується коротким резюме, що дозволяє дисертантці здійснити логічний перехід до експериментальної частини.

В «Матеріалах та методах досліджень» достатньо повно описуються методики, використані для досягнення поставлених задач. Слід підкреслити різноманітність методів і підходів, які застосовує Яремчук О.З. при вирішенні мети дисертаційної роботи, а саме біохімічних, імуноензимних, гістологічних, електронної мікроскопії, статистичних тощо, що зробило висновки з представленої роботи цілком обґрунтованими.

Послідуючи розділи присвячено результатам експериментальних досліджень у відповідності із метою і основними завданнями дисертаційної роботи. Доречними є проміжні висновки після кожного розділу, які дозволяють систематизувати одержані результати та обґрунтувати доцільність послідуєчої експериментальної роботи, а також заключний розділ, де наводяться узагальнення одержаних результатів і їх аналіз із використанням даних літератури. Закінчують рукопис висновки і список використаних джерел.

Ольгою Зеновіївною встановлено, що АФС супроводжується збільшенням вмісту аутоантитіл до протеїнів головного мозку. Виявлено, що у невагітних мишей лінії BALB/c з АФС L-аргінін спричиняє подальше збільшення вмісту аутоантитіл, проте у вагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом під впливом попередника NO знижується вміст аутоантитіл з молекулярною масою 120 та 150 kDa і зростає вміст аутоантитіл з молекулярною масою вище за 170 kDa. Аміногуанідин, у разі його окремого

введення і при комбінованому застосуванні з L-аргініном, сприяє зменшенню вмісту досліджуваних антитіл в усіх експериментальних групах.

У сироватці крові вагітних та невагітних мишей BALB/c за умов АФС відбувається зростання вмісту прозапальних цитокінів (IL-1 β , IL-6, TNF- α) на фоні зниження вмісту протизапальних цитокінів (IL-4 та IL-10). При застосуванні L-аргініну в цих експериментальних моделях встановлено часткову нормалізацію балансу досліджуваних сполук. Введення аміногуанідину мало наслідком зниження лише концентрації TNF- α у вагітних та невагітних тварин з АФС й зростання концентрації IL-4 у вагітних самок з АФС. Комбіноване застосування попередника NO та аміногуанідину супроводжувалось збереженням позитивного впливу L-аргініну на цитокіновий профіль.

Дисертанткою експериментально доведено, що у випадку АФС у невагітних та вагітних мишей лінії BALB/c знижується вміст eNOS у сироватці крові та у печінці. Поряд з цим встановлено зростання вмісту iNOS у цих тканинах невагітних та вагітних тварин з АФС. Також встановлено зростання кількості десквамованих ендотеліоцитів. Отже, АФС супроводжується розвитком ендотеліальної дисфункції. Встановлено також підвищення рівня синтезу NO у мозочку та нирках мишей із АФС до вагітності та на 18-й день вагітності. У півкулях великого мозку тварин з АФС до вагітності зареєстровано зростання вмісту NO $_2^-$ та NO $_3^-$, тоді як у вагітних тварин за цих умов спостерігається зниження вмісту цих стабільних метаболітів NO. За введення L-аргініну тваринам з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності відбувається зростання протеїну eNOS у сироватці крові та печінці, що супроводжується збільшенням вмісту NO $_2^-$ та NO $_3^-$ у сироватці крові, мозочку, півкулях великого мозку, печінці та нирках. При введенні аміногуанідину знижується рівень iNOS у сироватці крові та печінці і вміст стабільних метаболітів NO у досліджуваних органах. Використання аміногуанідину не впливає на вміст eNOS у сироватці крові та печінці. При комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину встановлено зростання вмісту

eNOS та зниження iNOS у досліджуваних тканинах, а також нормалізація рівня стабільних метаболітів NO в експериментальних групах. При введенні L-аргініну спостерігається зниження кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів у крові. Комбіноване використання попередника NO та аміногуанідину супроводжувалось нормалізуючим впливом на NO-синтазну систему.

Ольгою Зеновійвною виявлена активація процесів вільнорадикального окиснення та порушення рівноваги у прооксидантних–антиоксидантних процесах в тканинах мозочка, півкуль великого мозку, печінки та нирок за АФС як у вагітних та невагітних тварин. Це підтверджується накопиченням продуктів пероксидного окиснення ліпідів, дискоординацією активності антиоксидантних ензимів (супероксиддисмутази, каталази) та зниженням вмісту відновленого глутатіону. Посилення перебігу прооксидантних процесів має наслідком зниження активності електронно-транспортного ланцюга мітохондрій (сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази). При введенні L-аргініну невагітним мишам з АФС у мозочку спостерігали поглиблення оксидативного стресу, проте за вагітності відбувалося пригнічення активності процесів пероксидного окиснення ліпідів. У печінці та нирках мишей з АФС на фоні застосування аміногуанідину спостерігалася подальша інтенсифікація вільнорадикального окиснення, що водночас поєднувалось із активацією систем антирадикального та антиоксидантного захисту. Нейропротекторна дія аміногуанідину при АФС проявлялась зменшенням оксидативного стресу в мозочку та півкулях великого мозку. Комбіноване введення L-аргініну та аміногуанідину супроводжувалось нормалізуючим впливом на прооксидантно–антиоксидантні процеси.

Під час АФС дисертанткою встановлена загибель лейкоцитів крові вагітних та невагітних мишей за типом апоптозу та некрозу. У досліджуваних тварин спостерігається перерозподіл між основними типами лейкоцитів із збільшенням кількості гранулоцитів. Виявлено зниження продукування активних форм кисню в гранулоцитах та агранулоцитах вагітних та

невагітних мишей за умов АФС. Застосування L-аргініну та аміногуанідину окремо та при комбінованому введенні приводить до нормалізації показників життєздатності лейкоцитів. Зокрема відновлюється рівновага між кількістю гранулоцитів та агранулоцитів та спостерігається нормалізація рівня генерації активних форм кисню у гранулоцитах та агранулоцитах вагітних і невагітних мишей за умов АФС. Комбіноване застосування препаратів виявилось більш ефективним. У печінці вагітних та невагітних мишей при АФС відбувається активація процесів апоптозу, про що свідчить зростання вмісту активної форми каспази-3. Під впливом L-аргініну за цих умов встановлено зниження вмісту цього маркерного ензиму. Введення аміногуанідину вагітним мишам з АФС також супроводжувалось зниженням вмісту каспази-3. На фоні комбінованого застосування цих сполук відбувалась нормалізація вмісту каспази-3 в печінці.

Антифосфоліпідний синдром має наслідком зниження кількості тромбоцитів, підвищення концентрації фібриногену, вкорочення активованого часткового тромбопластинового часу та протромбінового часу, підвищення протромбінового індексу та зниження міжнародного нормалізованого відношення. У вагітних мишей з АФС встановлено подальші зміни досліджуваних показників. Отримані результати свідчать про гіперкоагуляцію та ризик тромбоутворення у вагітних та невагітних самок з АФС. В дисертаційній роботі встановлено позитивний вплив комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину у вагітних та невагітних мишей за умов АФС на систему гемостазу.

Виявлено зростання вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну та основного білка мієліну в мозочку та півкулях великого мозку вагітних та невагітних мишей за умов АФС, що вказує на розвиток реактивного астрогліозу та активацію процесів ремієлінізації. На фоні комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину у мозочку вагітних та невагітних тварин з АФС встановлено зниження загального вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну. На 18-й день вагітності у мозочку тварин з

АФС при введенні аміногуанідину, а також комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину встановлено зниження вмісту основного білка мієліну, що може бути одним із шляхів перебудови компонентів пошкоджених мієлінових оболонок.

Виявлено протекторний вплив L-аргініну та аміногуанідину, особливо при їх комбінованому введенні, за умов АФС, що супроводжується відновленням процесів мікроциркуляції в печінці та нирках, структурних компонентів часточок печінки, ниркових тілець та епітеліоцитів каналців нефрона нирки, зменшенням ушкодження мембранних органел, мембран ендотеліоцитів, гепатоцитів та нефроцитів.

Таким чином, Яремчук О.З. отримано нові дані про роль системи NO і механізми дії модуляторів синтезу NO за умов АФС до та під час вагітності в мишей. Розширення існуючих уявлень про молекулярні чинники розвитку експериментального АФС у вагітних та невагітних тварин дозволять здійснювати цілеспрямований пошук ефективних засобів лікувально-профілактичної дії серед модуляторів синтезу NO для корекції функціональних та структурних змін різних тканин при АФС, в тому числі за вагітності. Новизну дослідження підтверджено патентом України на корисну модель. Отже, як фундаментальне, так і практичне значення представленої дисертації не викликає сумнівів.

Позитивними рисами роботи вважаю велику кількість досліджених біохімічних і морфологічних показників, а також використання сучасних методів і підходів для вирішення поставлених задач. Все відмічене робить дисертацію високою мірою наукоємною, а її положення цілком аргументованими.

Наведені в кінці роботи висновки впливають із завдань і є правомірними. Рисунки демонстративні, наведена коректна статистична обробка одержаних даних.

Результати досліджень, які викладено в дисертації Яремчук Ольги Зеновіївни, опубліковані у відкритому друці у вигляді 40 публікацій, серед них

13 статей – у фахових виданнях України, 8 – у журналах, що входять до наукометричних баз Scopus та Web of Science, 4 – у закордонних виданнях, 1 – патент на корисну модель, 14 – у матеріалах конференцій, з'їздів, конгресів.

Структура і написання дисертації відповідають вимогам ДАК МОН України. Результати досліджень ілюстровані 72 рисунками і 29 таблицями. Список літератури містить значну кількість сучасних посилань. Автореферат відображає основний зміст дисертації.

Під час аналізу роботи виникли окремі зауваження та запитання.

Зауваження.

1. Аміногуанідин не є абсолютно специфічним інгібітором iNOS. Він розглядається також як синтетичний антиоксидант і сполука, що знижує рівень прозапальних цитокінів. Не виключений інгібіторний вплив аміногуанідину на конститутивні ізоформи NOS. Ваші результати щодо зниження наслідків окисного стресу за дії аміногуанідину можна також пояснити інгібіторним впливом на конститутивні NOS. Наприклад, за умов антифосфоліпідного синдрому може відбуватися перемикання NO-синтазної активності конститутивних ізоформ на оксидазну. Тоді інгібування eNOS приведе до зниження генерації активних форм кисню. Згідно Ваших результатів, аміногуанідин впливає більшою мірою не на активність, а на рівень експресії ізоформ NOS.

2. Доречно було б співставити NO-синтазну та аргіназну активності за умов експерименту.

3. На мій погляд, більше уваги слід було приділити обговоренню проблеми зниження біодоступності NO на фоні його гіперпродукції iNOS за рахунок утворення пероксинітриту – продукту взаємодії NO з $O_2^{\cdot-}$. Прозапальні цитокіни посилюють експресію iNOS, але поряд з цим викликають гіперпродукцію АФО, наприклад, шляхом зростання активності NOX. Підвищення вмісту NO_3^- в тканинах, зареєстроване в Ваших

дослідженнях, може свідчити про посилення генерації пероксинітрида за умов антифосфоліпідного синдрому.

4. В назву роботи слід було включити термін «вагітність».

5. В авторефераті була б доречна узагальнююча схема (и) проведених досліджень на кшталт тих, які наведені в розділі 6.

6. В літогляді інформація стосовно біохімії оксиду азоту доволі лаконічна.

7. Як для спеціальності 03.00.04-біохімія бажано бачити більшу кількість публікацій в Українському біохімічному журналі.

Запитання.

1. Зворотне пригнічення активності цитохром-с оксидази оксидом азоту розглядається як регулятор окисного фосфорилування та дихання, а також як механізм захисту мітохондрій від надмірної поляризації внутрішньої мембрани та гіперпродукції активних форм кисню. За якими механізмами в Ваших дослідженнях аргінін в ряді випадків стимулює цитохром-с оксидазу?

2. Як пояснити зниження генерації активних форм кисню та одночасне посилення апоптотичної загибелі лейкоцитів за АФС?

Наведені зауваження не знижують науково-практичну цінність проведеного дослідження. Характеризуючи роботу в цілому можна стверджувати, що вона відповідає профілю 03.00.04 - Біохімія. За актуальністю досліджуваної теми, науковою новизною, теоретичною і практичною цінністю, об'ємом експериментального матеріалу, самостійного внеску авторки і зроблених висновків дисертація є окремим завершеним дослідженням, яке **вирішує наукову проблему**, і відповідає вимогам п.п. 11, 13 "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого постановою Кабінету Міністрів в Україні № 567 від 24.07.2013 зі змінами, внесеними згідно з постановою Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015. Вважаю, що

Вважаю, що Яремчук Ольга Зеновіївна заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - Біохімія.

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник,
провідний науковий співробітник
відділу біохімії м'язів
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України

24.02.21 р.



Данилович Ю.В.

