

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Яремчук Ольги Зеновіївни «Механізми дії модуляторів системи нітроген оксиду за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому» подану до захисту у спеціалізовану вчену раду Д 26.004.08 Національного університету біоресурсів і природокористування України на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – «біохімія».

### **Актуальність обраної теми.**

Дисертаційна робота присвячена з'ясуванню біохімічних механізмів дії модуляторів системи нітроген оксиду L-аргініну та аміногуанідину при ураженні головного мозку, печінки та нирок вагітних та невагітних мишей за умов антифосфоліпідного синдрому. Антифосфоліпідний синдром (АФС), як дифузне захворювання сполучної тканини, характеризується пошкодженням інтими судин мікроциркуляторного русла внаслідок утворення аутоімунних антитіл до фосфоліпідів мембран клітин. Одними із важливих клінічних критеріїв АФС є судинні тромбози та патологія вагітності. При вагітності на фоні захворювань, що перебігають із порушенням системи гемостазу, ризик тромбоутворення в судинах організму вагітної та фетоплацентарного комплексу зростає. Зміни в системі гемостазу у вагітних жінок насамперед пов'язані з появою нового кола кровообігу – матково-плацентарного, необхідного для повноцінного забезпечення плода киснем і поживними речовинами. У період вагітності в системі гемостазу відбуваються зміни, спрямовані на посилення активності факторів згортання крові. Однак, відомо, що нітроген оксид, який продукується у судинному ендотелії, є одним із визначальних факторів, які забезпечують нормальний тонус судин і запобігають процесам згортання крові. Тому встановлення механізмів виникнення антифосфоліпідного синдрому, в

тому числі під час вагітності, та ролі системи нітроген оксиду у виникненні цієї патології є актуальним завданням.

Дисертаційна робота є фрагментом міжкафедральних комплексних науково-дослідних тем кафедри медичної біохімії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України «Біохімічні механізми токсичності наночастинок різної природи та інших антропогенних та біогенних токсикантів в біологічних системах» (№ держреєстрації 0112U000542) та «Біохімічні механізми порушень метаболізму за умов надходження до організму токсикантів різного генезу» (№ держреєстрації 0116U003353).

Метою роботи було встановити роль системи нітроген оксиду в механізмах розвитку антифосфоліпідного синдрому у вагітних і невагітних мишей та з'ясувати механізми реалізації дії попередника нітроген оксиду L-аргініну та інгібітора індукцибельної ізоформи синтази нітроген оксиду аміногуанідину за умов антифосфоліпідного синдрому. Завдання досліджень сформульовані методично грамотно, вони побудовані з урахуванням показників, які в повній мірі відображають суть роботи, що дозволило автору досягти поставленої мети.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків, рекомендацій, сформульованих у дисертації.**

Основні наукові положення дисертації випливають з отриманих результатів експериментальних досліджень, вони ґрунтуються на глибокому аналізі та узагальненні одержаних результатів. Зокрема, дисертанткою з'ясовані механізми впливу L-аргініну та аміногуанідину на розвиток ендотеліальної дисфункції у вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому. Досліджено роль системи нітроген оксиду в механізмах ураження головного мозку, печінки і нирок вагітних та невагітних

мишей при антифосфоліпідному синдромі. Доведено, що комбіноване застосування L-аргініну та аміногуанідину переважає за своїм позитивним впливом на стан системи нітроген оксиду їх окреме введення вагітним та невагітним мишам за антифосфоліпідного синдрому. Дисертанткою показано, що у сироватці крові та печінці тварин зростає вміст ендотеліальної синтази нітроген оксиду з одночасним зниженням вмісту індукційної ізоформи даного ензиму, що супроводжувалося нормалізацією рівня стабільних метаболітів нітроген оксиду у мозочку, півкулях великого мозку, печінці й нирках. Відзначено нормалізацію кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів у крові тварин із антифосфоліпідним синдромом, яким вводили окремо L-аргінін і при комбінованому застосуванні з аміногуанідином. Відмічено покращення ультраструктури синусоїдних гемокапілярів печінки, зменшення пошкодження ядерних і плазматичних мембран ендотеліоцитів при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину за умов антифосфоліпідного синдрому. Також досліджено механізми впливу L-аргініну та аміногуанідину на показники реалізації апоптозу (за вмістом каспази-3 та  $\beta$ -актину), на вміст активних форм кисню в лейкоцитах крові, вміст нейроспецифічних протеїнів гліального фібрилярного кислого протеїну й основного протеїну мієліну у мозочку і півкулях великого мозку, показники системи прооксиданти-антиоксиданти у вагітних та невагітних мишей за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому. Дисертанткою доведено, що при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину проявляються виражені нейропротекторні, антиоксидантні, гепато- та нефропротекторні властивості за умов антифосфоліпідного синдрому у вагітних та невагітних мишей.

Основні положення дисертації науково обґрунтовані, достовірність яких підтверджена експериментальними даними і висновками, що приведені у дисертації та авторефераті.

Загальна структура роботи побудована згідно вимог МОН України і містить усі необхідні структурні елементи: анотацію, вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів дослідження, три розділи результатів експериментальних досліджень, розділ з аналізом та обговоренням результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел та чотирьох додатків. Дисертацію викладено на 392 сторінках. Робота містить 29 таблиць та 72 рисунки.

На початку роботи представлена **анотація** на українській (2-12 ст.) та англійській мовах (12-19 ст.), де стисло викладені основні результати досліджень, їх наукова новизна та практичне значення. Наводиться список публікацій здобувача, опублікованих за темою дисертації, який включає 40 праць (20-28ст.).

У **вступній частині дисертації** (36-44 ст.) дисертації автор представляє науковий аналіз та обґрунтування вибраної теми, її актуальність, наводить зв'язок роботи з державною науковою тематикою, ставить мету і завдання досліджень, розкриває наукову новизну одержаних результатів, їх практичне значення, висвітлює особистий внесок здобувача та апробацію матеріалів дисертації, їх публікацію, обсяг і структуру дисертації.

У **розділі 1.** Огляд літератури (45-89 ст.), який включає чотири підрозділи, дисертантка представила та глибоко проаналізувала літературні джерела, що стосуються епідеміології, етіології, класифікації та діагностики антифосфоліпідного синдрому, молекулярних механізмів його розвитку, ролі антифосфоліпідних антитіл у формуванні акушерських ускладнень при антифосфоліпідному синдромі, а також поліорганних уражень при антифосфоліпідному синдромі.

Літературні публікації проаналізовані та викладені у списку використаних джерел дисертації. Наукова оцінка проведеного аналізу літературного огляду дає підстави вважати, що Яремчук О.З. добре володіє сучасною науковою

літературою та здобула достатній обсяг знань з наряду досліджень за темою дисертаційної роботи.

Проведений аналіз **розділу 2** «Матеріали та методи дослідження» (90-114 ст.) показав, що дослідження проведені на мишах самках лінії BALB/c масою 25–30 г, яких утримували у стандартних умовах віварію відповідно до санітарно-гігієнічних норм. АФС моделювали за допомогою кардіоліпіну, який вводили внутрішньом'язово чотири рази через кожні 14 діб (30 мкг на 1 ін'єкцію). АФС формувався через 14 діб після останньої ін'єкції кардіоліпіну. Дослідних тварин поділили на 10 груп, з яких 5 – невагітні і 5 – вагітні тварини (а): I, Ia (контроль) – тварини без АФС; II, IIa – тварини з експериментальним АФС, III, IIIa – тварини з АФС, яким вводили L-аргінін, IV, IVa – тварини з АФС, яким вводили аміногуанідин, V, Va – тварини з АФС, яким вводили L-аргінін в комбінації з аміногуанідинам. L-аргінін (25 мг/кг) та аміногуанідин (10 мг/кг) вводили внутрішньоочеревинно один раз на день, повторно, упродовж 10 діб після формування АФС і 17 діб вагітності. Тварини контрольних груп отримували внутрішньоочеревинно ідентичні об'єми розчинника. Через 10 діб з моменту підтвердження АФС тварин I, II, III, IV та V груп виводили з експерименту в умовах тіопентал-натрієвого наркозу. Через 10 діб після початку введення коригуючих чинників проводили спарювання самок Ia, IIa, IIIa, IVa та Va груп із самцями та виводили з експерименту на 18-й день вагітності в умовах тіопентал-натрієвого наркозу. Для дослідження використовували сироватку крові, плазму, популяцію лейкоцитів крові, гомогенати мозочка, півкуль великого мозку, печінки та нирок.

У процесі виконання роботи використані сучасні біохімічні та оптичні (спектрофотометрія, фотоелектроколориметрія, протокова цитометрія, світлова й електронна мікроскопія), фізико-хімічні (диск-електрофорез), імунохімічні (Вестерн-блот аналіз, ELISA), статистичні методи.

У 3, 4 і 5 розділах представлені результати досліджень отримані

дисертанткою.

**Розділ 3** «Зміни метаболічних процесів у вагітних та невагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі» (ст. 115-147) включає 7 підрозділів. У ньому представлені результати досліджень, що свідчать про збільшення вмісту антитіл (з молекулярною масою приблизно 120 kDa, 150 kDa та >170 kDa) до власних протеїнів головного мозку у невагітних та вагітних мишей BALB/c із АФС порівняно до контролю. Встановлене зниження кількості тромбоцитів, підвищення концентрації фібриногену, скорочення протромбінового часу, підвищення протромбінового індексу та зниження міжнародного нормалізованого відношення свідчить про гіперкоагуляцію та ризик тромбоутворення у вагітних та невагітних самок з антифосфоліпідним синдромом. Встановлено, що при АФС у сироватці крові та печінці вагітних та невагітних мишей виникає відносна недостатність NO, який синтезується під впливом eNOS, на фоні загальної гіперпродукції NO, який синтезується під впливом iNOS. Встановлено підвищення рівня синтезу NO у мозочку та нирках невагітних та вагітних мишей з АФС. У півкулях великого мозку невагітних тварин з АФС встановлено зростання вмісту  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  і зниження вмісту  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  у вагітних мишей з АФС. Встановлено, що у сироватці крові вагітних та невагітних мишей за умов АФС відбувається зростання концентрації прозапальних цитокінів (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) та зниження концентрації протизапальних цитокінів (IL-4 та IL-10), порівняно із показниками контролю. Експериментально встановлено, що у вагітних та невагітних мишей при АФС відбувається перерозподіл між гранулоцитами та агранулоцитами із збільшенням кількості гранулоцитів. Крім цього, розвиток АФС супроводжується дефіцитом продукування АФО в гранулоцитах та агранулоцитах у мишей. Доведено, що при АФС знижується життєздатність лейкоцитів крові вагітних та невагітних мишей, порівняно з контролем. Ймовірно, що смерть клітин при АФС частково зумовлена активацією апоптозу,

про що свідчить і зростання вмісту активної форми каспази-3 та  $\beta$ -актину у печінці вагітних та невагітних тварин. За умов АФС у тканині мозочка, півкуль великого мозку, печінки та нирок мишей до вагітності та на 18-й день вагітності відбувається розвиток оксидативного стресу, порушення рівноваги у системі прооксиданти-антиоксиданти, що супроводжується накопиченням продуктів ПОЛ, дискоординацією активності ензимів антиоксидантного захисту та електронотранспортного ланцюга мітохондрій. Встановлено зростання вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну та основного протеїну мієліну в мозочку та півкулях великого мозку вагітних та невагітних мишей за умов АФС, що вказує на розвиток реактивного астрогліозу, активацію процесів ремієлінізації.

**У 4 розділі** «Вплив модуляторів синтезу нітроген оксиду на стан мозку, печінки та нирок при еспериментальному антифосфоліпідному синдромі» (ст.148-217) представлені результати досліджень впливу L-аргініну та аміногуанідину на досліджувані біохімічні показники. Зокрема, введення L-аргініну мишам лінії BALB/c із АФС супроводжувалося зростанням вмісту аутоантитіл до протеїнів головного мозку в трьох поліпептидних зонах (120 kDa, 150 kDa та >170 kDa), які зв'язували молекули IgG, що містилися у сироватці крові мишей до вагітності, та вмісту аутоантитіл з молекулярною масою більше 170 kDa на 18-й день вагітності. У сироватці крові вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін, знижувався вміст аутоантитіл 120 kDa та 150 kDa. При введенні аміногуанідину, окремо та у комбінації з L-аргініном, встановлено зниження вмісту антитіл до власних протеїнів головного мозку у тварин з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності. L-аргінін сприяв відновленню показників системи гемостазу, нормалізації кількості тромбоцитів у вагітних та невагітних мишей за умов АФС. Введення аміногуанідину мишам з АФС призводило до прогресування змін коагулограми, які свідчать про зростання схильності до тромбоутворення. Встановлено позитивний вплив

застосування L-аргініну та аміногуанідину при їх комбінованому введенні на показники системи гемостазу в невагітних та вагітних мишей за умов АФС. За введення L-аргініну тваринам з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності відбувалося зростання вмісту eNOS у сироватці крові та печінці, що супроводжувалося зростанням вмісту  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  у сироватці крові, мозочку, півкулях великого мозку, печінці та нирках. При введенні аміногуанідину тваринам з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності знижувався вміст iNOS у сироватці крові та печінці та вміст стабільних метаболітів NO у досліджуваних органах. При комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину встановлено зростання вмісту eNOS та зниження вмісту iNOS у сироватці крові та печінці, що привело до нормалізації вмісту  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  при експериментальному АФС до вагітності та на 18-й день вагітності, порівняно з показниками у мишей з АФС. При застосуванні L-аргініну у вагітних та невагітних мишей з АФС відбувалось зниження концентрації прозапальних цитокінів та зростання концентрації протизапальних цитокінів. Введення аміногуанідину супроводжувалося зниженням лише концентрації TNF- $\alpha$  у вагітних та невагітних тварин з АФС й зростанням концентрації IL-4 у вагітних самок з АФС. Найефективнішим виявилось комбіноване застосування L-аргініну та аміногуанідину для корекції порушень балансу про- та протизапальних цитокінів, які виникають у вагітних та невагітних мишей при АФС. Також комбіноване застосування даних чинників вагітним та невагітним мишам з АФС більшою мірою, ніж їх окреме введення, супроводжується відновленням рівноваги між кількістю гранулоцитів та агранулоцитів до рівня контролю та нормалізацією показників вмісту АФО у лейкоцитах. Комбіноване введення L-аргініну та аміногуанідину при АФС та на 18-й день вагітності у тварин з АФС супроводжується нейропротекторним, гепатопротекторним та нефропротекторним впливом, що проявляється зниженням активності процесів пероксидного окиснення ліпідів, підвищенням активності та вмісту компонентів



антиоксидантної системи та ензимів електронотранспортного ланцюга мітохондрій у мозочку, півкулях великого мозку, печінці та нирках. Введення модуляторів синтезу NO впливає на вміст GFAP у мозочку та півкулях великого мозку мишей за умов АФС, що опосередковано може підтверджувати роль NO у регулюванні експресії GFAP в астроцитах при АФС. Встановлено, що при окремому та комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину вміст субодиниці MBP (18,4 kDa) зростає у зразках півкуль великого мозку. Підсилення деградації MBP у тварин з АФС на фоні розвитку реактивного астрогліозу може бути одним із шляхів активної перебудови компонентів пошкоджених мієлінових оболонок.

**У 5 розділі «Морфологічні та субмікроскопічні зміни у печінці та нирках при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та застосуванні модуляторів синтезу нітроген оксиду» (ст. 218-251) у результаті проведених мікроскопічних досліджень печінки встановлено, що за умов АФС в печінці наявні значні гемодинамічні розлади, що призводять до деструктивно-дегенеративних змін паренхіми органа. За використання L-аргініну та аміногуанідину при АФС, особливо за умов їх комбінованого введення, часточково-балкова організація печінки відновлюється. Встановлено протекторний ефект досліджуваних модуляторів системи NO на мікроциркуляцію, що свідчить про відновлення функціонування печінки мишей з АФС. У результаті проведеного ультраструктурного дослідження встановлено, що за умов АФС у печінці тварин розвиваються суттєві розлади мікроциркуляції і порушення транскапілярного обміну, а також значні деструктивні пошкодження гепатоцитів, що значно погіршує стан метаболічних процесів у печінці та її детоксикаційні можливості. Покращення ультраструктури і нормалізація синусоїдних гемокапілярів печінки та гепатоцитів особливо яскраво проявляється за умов комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину.**

При мікроскопічному дослідженні нирки за умов АФС у відбуваються істотні судинні порушення, які призводять до значних деструктивних змін нефронів. Порушуються загальна гемодинаміка органа та мікроциркуляція у ниркових тільцях і перитубулярній кровоносній сітці, розвиваються деструктивні й дистрофічні зміни епітеліоцитів проксимальних і дистальних канальців. L-аргінін та аміногуанідин, особливо за умов їх комбінованого введення, зменшують патологічні зміни компонентів нефрона, порівняно з групою тварин із АФС, що проявляється відновленням мікроциркуляції в органі, покращенням структури ниркових тілець та епітеліоцитів канальців нефрона. Проведенні ультраструктурні дослідження нирки показали, що при експериментальному АФС на фоні порушення мікроциркуляції у нирковому тільці та перитубулярній сітці розвиваються пошкодження структури епітеліоцитів проксимальних і дистальних канальців. Дослідження ультраструктурного стану компонентів нефронів тварин при застосуванні L-аргініну і аміногуанідину за умов АФС виявили менший ступінь їх пошкодження, ніж у нирках тварин без корекції.

**Розділ 6 «Аналіз та обговорення результатів дослідження» (ст. 252-297)** містить аналіз одержаних результатів власних досліджень з обговоренням виявлених змін основних показників. Дисертанткою експериментально обґрунтовано доцільність використання попередника нітроген оксиду L-аргініну в комбінації із інгібітором індукцибельної ізоформи синтази нітроген оксиду аміногуанідином з метою корекції виявлених порушень при антифосфоліпідному синдромі. Оцінюючи матеріали цього розділу необхідно відзначити наукову глибину аналізу отриманих даних, викладені в дисертаційній роботі результати достатньо науково опрацьовані у порівнянні з даними літератури. Проведений аналіз результатів власних досліджень та їх узагальнення у цьому розділі дало можливість дисертантці зробити науково-обґрунтовані висновки.

**Дванадцять висновків**, що приведені у дисертації (ст. 298-303) та авторефераті (ст. 33-36) узагальнюють і достатньо повно висвітлюють одержані результати та основні положення дисертації.

**Список використаних джерел** (ст. 304-349) містить 422 публікації (277 джерел латиницею).

Є чотири **додатки**, що включають: А – список праць, опублікованих за темою дисертації, Б – апробацію результатів дослідження, В – 24 акти впровадження та Г – патент на корисну модель.

### **Повнота викладу результатів досліджень в опублікованих працях.**

Детальний аналіз дисертаційних матеріалів, проведений у період їх рецензування, свідчить, що наукова робота Яремчук Ольги Зеновіївни є підсумком завершених досліджень, які впродовж періоду їх виконання всебічно аналізувалися і висвітлені у 40 наукових працях, серед яких 13 статей у наукових фахових виданнях України, 8 статей у наукових виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних Scopus/Web of Science, 4 статті у наукових виданнях інших держав, патент України на корисну модель, 14 тез наукових доповідей.

Основні положення дисертації науково аргументовані та в повній мірі відображені в наукових статтях.

Дисертація та автореферат оформлені на належному науковому рівні, написані державною мовою. Автореферат дисертації за змістом ідентичний дисертаційній роботі та висвітлює основні її положення.

Висловлюючи позитивну оцінку дисертаційної роботи в цілому, необхідно зробити **окремі зауваження**, що були виявлені в період її аналізу:

1. У розділі 5 дисертації на рисунках 5.1-5.9. та в авторефераті на рисунку 2 відсутні позначення основних гістологічних і ультраструктурних змін тканин мишей, які описані у тексті.

2. У розділі 6 «Аналіз та обговорення результатів дослідження», на мій

погляд, зайвим є повторення цифрових даних, які вже були представлені у попередніх трьох розділах результатів досліджень.

У процесі аналізу дисертаційної роботи виникли **деякі запитання** до здобувача:

1. У розділі 6 представлені дві схеми «Механізми реалізації дії L-аргініну та аміногуанідину при ураженні печінки мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому» (рис.6.1.) та «Механізми реалізації дії аміногуанідину при ураженні головного мозку мишей лінії BALB/c за умов АФС» (рис.6.2.). Поясніть, будь ласка, чому саме зупинилися на представленні механізмів дії досліджуваних чинників лише у печінці і головному мозку?
2. Чи контролювали Ви вплив L-аргініну та аміногуанідину на запліднюваність, відтворювальну здатність самок та на ембріотоксичність?
3. Як Ви вважаєте чи не доцільно було б провести дослідження змін гормонального фону у вагітних мишок за АФС та дії L-аргініну та аміногуанідину?
4. Чому визначали не активність, а вміст NO-синтаз? Оскільки визначення ензимів в біологічному матеріалі розраховують по швидкості реакції, що каталізує досліджуваний ензим. Тобто визначається не концентрація самого ензиму, а його активність.
5. Чи можна на основі результатів Ваших досліджень рекомендувати модулятори системи нітроген оксиду для використання у медичній практиці при лікуванні АФС? Які вам відомі сучасні способи лікування АФС та корекції його ускладнень, крім антикоагулянтів і антиагрегантів?

Виявлені недоліки та упущення суттєво не впливають на науковий і методичний рівень дисертаційної роботи, а тому не зменшують теоретичного і практичного значення одержаних результатів та дисертації в цілому.

### **Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.**

Підсумовуючи проведений аналіз та оцінку дисертаційної роботи й автореферату Яремчук Ольги Зеновіївни на тему «Механізми дії модуляторів системи нітроген оксиду за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому» необхідно відзначити, що робота є самостійною завершеною науковою працею, в якій викладене нове вирішення актуальної наукової проблеми, що полягає у встановленні механізмів розвитку антифосфоліпідного синдрому у тварин, в тому числі під час вагітності, й ефективності застосування модуляторів синтезу нітроген оксиду L-аргініну та аміногуанідину з метою корекції виявлених порушень. Дисертаційна робота за актуальністю тематики досліджень, обсягом і науково-методичним рівнем їх виконання, новизною, практичним значенням і науковою обґрунтованістю одержаних результатів та викладених положень відповідає п.10 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24.07.2013 року, що ставляться до докторських дисертацій, а її автор Яремчук Ольга Зеновіївна заслуговує здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – «біохімія».

### **Офіційний опонент**

Доктор біологічних наук, ст. н. співробітник,  
завідувач лабораторії біохімії  
адаптації та онтогенезу тварин  
Інституту біології тварин НААН

Р. Я. Іскра

Підпис Р. Я. Іскри засвідчую:  
головний фахівець ВК  
Інституту біології тварин НААН,  
канд. с.-г. наук

І. В. Невоструєва

3.03.2021р.

