

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Марчишак Тетяна Вікторівна

УДК 577.213:577.216: 57.084

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.03 – молекулярна біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Марчишак Т.В.

Науковий керівник: **Ткачук Зеновій Юрійович**, кандидат біологічних
наук, старший науковий співробітник

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Марчишак Т. В. Гепатопротекторна дія комплексу олігорибонуклеотидів з D-манітолом при тіоацетамід-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 гепатопротекторної дії комплексу олігорибонуклеотидів з D-манітолом при тіоацетамід-індукованій гепатотоксичності у експериментальних моделях тварин.

Печінка виступає основним метаболічним та детоксикуючим органом, яка виконує ряд важливих функцій у підтримці, роботі та регулюванні гомеостазу організму. Крім екзокринної функції у травній системі, печінка виконує низку важливих функцій у майже всіх типах обміну речовин, зокрема, білковому, вуглеводному, ліпідному, мінеральному обмінах та обміні вітамінів. Будучи детоксикуючим органом, вона першою контактує та знешкоджує ксенобіотики. Метаболічні перетворення деяких ксенобіотиків призводять до утворення токсичних інтермедіатів, внаслідок дії яких орган піддається ураженню.

Комплекс олігорибонуклеотидів з D-манітолом (ОРН-D-M) являє собою природний препарат, отриманий із сумарної дріжджової РНК, який проявляє кардіопротекторну, протизапальну та противірусну дії. Зокрема, ОРН-D-M знижує вірусне навантаження у хворих з гепатитами В і С. Оскільки віруси гепатиту В і С є одними з основних етіологічних факторів, що призводять до гепатиту, фіброзу, цирозу та гепатоцелюлярної карциноми, перспективним є пошук препаратів, які проявляли б як противірусну, так і гепатопротекторну дії одночасно.

Метою даної роботи було дослідження гепатопротекторних молекулярних механізмів впливу ОРН-D-M на стан печінки при гострій та хронічній ТАА-індукованій гепатотоксичності у експериментальних моделях тварин.

Спочатку проводили скринінгові дослідження потенційної гепатопротекторної дії комплексу ОРН-D-M у концентраційній залежності 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 мг/кг маси тіла тварин в умовах *in vivo*. Скринінгові дослідження показали, що комплекс у дозі 50, 100, 150, 200 мг/кг маси тіла тварин знижує аланінамінотрансферазну (АлАТ), аспартатамінотрансферазну (АсАТ) та γ -глутамілтрансферазну (ГГТ) активності в сироватці крові мишей при гострій ТАА-індукованій гепатотоксичності. Крім того, ОРН-D-M у дозі 50, 100, 150, 200 мг/кг маси тіла тварин знижує інтенсивність процесів пероксидного окислення ліпідів з одночасним підвищенням вмісту основної молекули неферментативної ланки антиоксидантного захисту – відновленого глутатіону. Показано, що найбільш виражена гепатопротекторна дія комплексу при гострій гепатотоксичності проявлялась у дозі 200 мг/кг маси тіла тварин. При цьому встановлено, що наступне збільшення концентрації комплексу до 250 та 300 мг/кг маси тіла тварин не призводило до додаткового підвищення гепатопротекторної дії, яке б статистично достовірно відрізнялось від отриманих результатів при дослідженнях дози 200 мг/кг маси тіла тварин. Отримані дані обґрунтовують доцільність дослідження гепатопротекторної дії комплексу ОРН-D-M у дозі 200 мг/кг маси тіла тварин.

Проведено гістоморфологічні дослідження печінки мишей при гострій ТАА-індукованій гепатотоксичності на фоні застосування комплексу ОРН-D-M у дозі 200 мг/кг маси тіла тварин. Встановлено, що комплекс сприяє збереженню архітектури паренхіми печінки, зменшенню централь-но-лобулярного некрозу та запальної інфільтрації паренхіми клітинами імунної системи.

Досліджено вплив комплексу на пошкодження паренхіми печінки в умовах експериментальної гострої гепатотоксичності. Введення комплексу призводило

до зниження активностей АлАТ та ГГТ на 53 та 69 % ($p < 0,05$) порівняно зі значеннями групи ТАА. Це свідчить про те, що комплекс ОРН-D-M зменшує ураження паренхіми печінки при ТАА-індукованій гострій гепатотоксичності при лікувальній схемі введення у концентрації 200 мг/кг маси тіла тварин.

Досліджуваний комплекс здатен інгібувати надмірні окислювальні процеси в печінці. Зокрема, на фоні застосування ОРН-D-M вміст продуктів пероксидного окислення ліпідів та протеїнових карбонільних груп знижувався у 3 та 2 рази порівняно з показниками групи, яка отримувала лише тотоксин. Аналогічна тенденція стабілізуючої дії ОРН-D-M спостерігалась відносно порушень показників рівнів протеїнових SH-груп, відновленого глутатіону та активностей ферментів глутатіонової ланки антиоксидантного захисту – глутатіонпероксидази та глутатіон-S-трансферази.

Методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі визначено рівні відносної експресії прозапальних генів – інтерлейкіну 6 (*Il6*) та фактору некрозу пухлин α (*Tnfa*) та показано суттєве зниження гіперекспресії *Il6* та *Tnfa* на 65 та 72 % ($p < 0,05$) порівняно зі значеннями групи ТАА, за дії комплексу ОРН-D-M при гострій ТАА-індукованій гепатотоксичності. При цьому, дані зміни рівнів відносної експресії генів *Il6* та *Tnfa* узгоджуються з даними зміни рівнів відносної експресії генів транскрипційного фактору *Nfkb1* (*Nfkb1*) та інгібітору транскрипційного фактору *Nfkb1* (*Nfkbia*) за умов гострого токсичного ураження печінки. Згідно отриманих даних, рівні відносної експресії генів *Nfkb1* та *Nfkbia* після застосування комплексу з лікувальною метою знижувались на 50 та 43 % ($p < 0,05$) порівняно зі значеннями групи ТАА. Крім того, застосування комплексу сприяло зниженню мієлопероксидазної активності на 58 % ($p < 0,05$) порівняно зі значенням групи ТАА, що свідчить про зменшення запальної інфільтрації паренхіми клітинами імунної системи.

Аналіз змін рівнів відносної експресії профіброзних генів – трансформуючого ростового фактору $\beta 1$ (*Tgf β 1*), колагену A-1 (*Colla1*) та

α -актину гладеньких м'язів (*Acta 2*) показав суттєве зниження експресії дослідних генів при гострій гепатотоксичності на фоні застосування ОРН-D-M.

Досліджено також рівні відносної експресії печінкових ростових факторів – гепатоцитарного ростового фактору (*Hgf*), трансформуючого фактору росту α (*Tgfa*) та епідермального фактору росту (*Egf*) при гострому токсичному ураженні печінки. Результати отриманих даних вказують на те, що комплекс ОРН-D-M не змінює профілів відносної експресії ростових факторів при токсичному ураженні печінки ТАА.

При дослідженні впливу комплексу ОРН-D-M при хронічному токсичному ураженні печінки було показано, що комплекс ОРН-D-M знижує високі рівні продуктів пероксидного окислення ліпідів, протеїнових карбонільних груп, протеїнових SH-груп та відновленого глутатіону.

Аналіз патернів відносної експресії прозапальних та профіброзних генів на рівні мРНК за дії комплексу ОРН-D-M показав суттєве зниження надекспресії мРНК *Il6*, *Tnfa*, *Nfkb1*, *Nfkbia*, *Tgf β 1*, *Colla1* та *Acta 2* в паренхімі печінки при ТАА-індукованому хронічному ураженні печінки.

Аналіз гістопатологічних змін при хронічному ураженні печінки на фоні застосування ОРН-D-M показав більш збережену архітектуру печінки з невеликими відкладеннями сполучної тканини порівняно з групою ТАА.

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.

Список публікацій здобувача:

- 1. 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.

2. **T. 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.
3. **Т.В. Марчишак**, Т.Г. Яковенко, З.Ю. Ткачук Вплив комплексів олігорибонуклеотидів з D-манітолом на експресію генів при гострій тіоацетамід-індукованій гепатотоксичності // *Допов. Нац. Акад. Наук Укр.* – 2018. – № 7. – С. 96-102.
4. 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.
5. **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.
6. **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.
7. **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.
8. **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.

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. 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.
11. **Т. В. Марчишак**, Т. Г. Яковенко, І. О. Шмараків, 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.
12. **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.
13. **Т. В. Марчишак**, И.А. Шмараків Гепатопротекторная активность экзогенной РНК // Материалы 18 Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых. – Пушино, Россия. – 2014. – С. 149-150.

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 dissertation is devoted to the study of the hepatoprotective effect of the complex of oligoribonucleotides with D-mannitol in thioacetamide-induced hepatotoxicity in experimental animal models.

The liver is the main metabolic and detoxifying organ, which performs a number of important functions in maintaining, operating and regulating homeostasis. It plays a key role in almost every organ system of the body, providing digestion, hematopoiesis and metabolism. Being a detoxifying organ, it is the first to contact and neutralize xenobiotics. Despite the presence of the cell system of xenobiotics detoxification in hepatocytes, metabolic transformations of some of them lead to the formation of toxic intermediates resulting the body injury.

Complex of oligoribonucleotides with D-mannitol (ORN-D-M) are natural preparations based on total yeast RNA, which are able to manifest cardioprotective, proinflammatory and antiviral effects. In particular, ORN-D-M are able to reduce the viral load in patients with hepatitis B and C. Since hepatitis B and C viruses are one of the main etiological agents that lead to hepatitis, fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma, it is promising to search for drugs which would have both antiviral and hepatoprotective activities.

The aim of this study was to investigate the hepatoprotective molecular mechanisms of the effect of ORN-D-M on the liver in acute and chronic thioacetamide (TAA) -induced hepatotoxicity.

Initially, screening studies of the potential hepatoprotective effect of the ORN-D-M complex in a concentration dependence of 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 mg / kg body weight of animals *in vivo*. Screening assays have shown that complex at a dose of 50, 100, 150, 200 mg/kg on animal body weight reduce alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and γ -glutamyltransferase (GGT) activities in the serum of mice at acute TAA-induced hepatotoxicity. In addition, ORN-D-M at a dose of 50, 100, 150, 200 mg/kg of animal body weight reduced the intensity of lipid peroxidation processes while increasing the content of the main molecule of the non-enzymatic linkage of antioxidant support network - reduced glutathione. It is shown that the most pronounced hepatoprotective activity of the complex in acute hepatotoxicity manifested itself at a dose of 200 mg/kg on animal body weight. It was found that the subsequent increase in the concentration of complex to 250 and 300 mg/kg on animal body weight did not lead to an additional increase in hepatoprotective activity of complexes, which would be statistically significantly different from the results obtained in studies of doses of 50, 100, 150, 200 mg/kg on animal body weight. The obtained data substantiate the feasibility of studying the hepatoprotective activity of the complex at a dose of 200 mg/kg on animal body weight.

Histomorphologic studies of the liver of mice in acute TAA-induced hepatotoxicity against the background of the use of ORN-D-M complex at a dose of 200 mg/kg on animal body weight were carried out. It is established that the complex contribute to the preservation of the liver parenchyma architecture, reduction of centrilobular necrosis and inflammatory infiltration of the parenchyma by cells of the immune system.

The influence of complex on the integrity of hepatocyte membranes in the conditions of experimental acute hepatotoxicity was also investigated. The introduction of complexes led to a decrease in the activity of ALT and GGT by 53 and 69% ($p < 0.05$), respectively, compared with the values of the control pathology group. This indicates that the complex ORN-D-M reduces the damage to the liver parenchyma in

TAA-induced acute hepatotoxicity in the treatment regimen at a concentration of 200 mg/kg body weight of animals.

Therapeutic administration of the studied complexes also actively corrected excessive oxidative processes in the liver. In particular, against the background of the use of ORN-D-M in the liver in animals with acute hepatotoxicity, the content of TBA-active compounds and protein carbonyls decreased by 3 and 2 times, respectively, compared with the group that received hepatotoxin only. A similar trend in the stabilizing effect of ORN-D-M was observed with respect to violations of the content of protein thiols, reduced glutathione, and the activity of enzymes of the glutathione linkage of antioxidant support network - glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase.

The real-time polymerase chain reaction determined the levels of mRNA of cytokines interleukin 6 (*Il6*) and tumor necrosis factor α (*Tnfa*) and showed a significant reduction in hyperexpression of *Il6* and *Tnfa* by 65 and 72 % ($p < 0,05$), respectively, compared with the values of the control pathology group, under the action of ORN-D-M complex in acute TAA-induced hepatotoxicity. In this case, the data on changes in mRNA expression of *Il6* and *Tnfa* are consistent with data on changes in mRNA expression of transcription factor genes *Nfkb1* and transcription factor inhibitor *Nfkbia*, which were highly expressed under conditions of acute toxic liver damage. According to the obtained data, the levels of mRNA *Nfkb1* and *Nfkbia* after the use of complexes for therapeutic purposes decreased by 51 and 43 % ($p < 0,05$), respectively, compared with the values of the control pathology group. In addition, the use of the complex contributed to a decrease in myeloperoxidase activity by 58% ($p < 0,05$) compared with the value of the TAA group, which indicates a decrease in inflammatory infiltration of the parenchyma by cells of the immune system.

Analysis of changes in the relative mRNA expression of anti-fibrotic genes - transforming growth factor $\beta 1$ (*Tgf β 1*), procollagen A-1 (*Colla1*) and α smooth muscle

actin (*Acta 2*) showed a significant decrease in the expression of experimental genes at the level of mRNA in acute hepatotoxicity.

The levels of mRNA expression of hepatic growth factors - hepatocyte growth factor (*Hgf*), transforming growth factor α (*Tgfa*) and epidermal growth factor (*Egf*) in acute toxic liver disease were also studied. The mRNA expression results of *Hgf*, *Tgfa* and *Egf* indicate that ORN-D-M complex do not change the gene expression profiles of growth factors in TAA toxic liver damage.

In the study of the effect of ORNs-D-M complex in chronic toxic liver disease, it was shown that the complexes reduce high levels of MDA, carbonyl derivatives, protein SH groups, reduced glutathione.

Analysis of patterns of expression of proinflammatory and anti-fibrotic genes at the level of mRNA under the action of ORN-D-M complex showed a significant decrease in overexpression of mRNA *Il6*, *Tnfa*, *Nfkb1*, *Nfkbia*, *Tgf β 1*, *Colla1* and *Acta 2* in the liver parenchyma in TAA-induced chronic liver disease.

Analysis of histopathological changes in chronic liver disease against the background of the use of ORN-D-M showed a preserved architecture of the liver with small connective tissue deposits.

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

List of scientific publications published on the topic of the dissertation:

1. **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.
2. **T. 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.
3. **T.V. Marchyshak**, T.G. Yakovenko, Z.Yu. Tkachuk Influence of oligoribonucleotides-D-mannitol complexes on the expression of genes under acute thioacetamide-induced hepatotoxicity // *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.* – 2018. – № 7. – P. 96-102.
 4. 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.
 5. **T.V. Marchyshak**, T.G. Yakovenko, Z.Yu. Tkachuk The effect of oligoribonucleotide complexes with D-mannitol on the expression of pro-inflammatory and profibrotic genes in thioacetamide-induced liver fibrosis // *Materials of XII Congress of Ukrainian biochemical, medical and clinical chemistry*. – Ternopil, Ukraine. – 2019. – T. 21, №3. – P. 215-216.
 6. **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.
 7. **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 // *Materials of VI scientific conference of PC "Farmak" young scientists school*. – Kyiv, Ukraine. – 2018. – P. 19-20.
 8. **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.
 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. 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.
- 11.T. V. Marchyshak**, T. G. Yakovenko, I. O. Shmarakov, Z. Yu. Tkachuk Hepatoprotective activity of oligoribonucleotide complexes with D-mannitol // Materials of V scientific conference of PC «Farmak» young scientists school. – Kyiv, Ukraine. – 2017. – P. 53.
- 12.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.
- 13.T. V. Marchyshak**, I. O. Shmarakov Hepatoprotective activity of exogenous RNA // Materials of the 18th International Pushchino School-Conference of Young Scientists. – Pushchino, Russia. – 2014. – P. 149-150.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	16
ВСТУП	18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	25
1.1. Роль біоактивації ксенобіотиків у розвитку гепатотоксичності	26
1.2. Оксидативний стрес як універсальний механізм ушкодження печінки.....	29
1.3. Розвиток запалення в умовах гепатотоксичності	31
1.4. Роль універсального транскрипційного фактору NF- κ B та цитокінів у розвитку запалення при гепатотоксичності	33
1.5. Активація стелатних клітин печінки при гепатотоксичності.....	37
1.6. Роль регенеративних процесів у відновленні печінки після токсичного ураження.....	39
1.7. Тіоацетамід-індукована гепатотоксичність.....	42
1.8. Нуклеїнові кислоти як терапевтичні молекули.....	44
1.8.1. Синтетичні нуклеїнові кислоти.	44
1.8.2. Природні нуклеїнові кислоти.....	46
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	51
2.1. Об'єкт дослідження	51
2.2. Реактиви та обладнання, використані в роботі	51
2.3. Моделювання токсичних уражень печінки	53
2.3.1. Скринінгове дослідження потенційної протекторної активності комплексу ОРН-D-M.....	53
2.3.2. Гостра ТАА-індукована гепатотоксичність.	55
2.3.3. Хронічна ТАА-індукована гепатотоксичність.....	56
2.4. Методи досліджень	57
2.4.1. Гістологічна оцінка токсичного ураження печінки.....	57
2.4.2. Дослідження цілісності мембран гепатоцитів.	58

2.4.3. Оцінка запальної інфільтрації та оксидативної деструкції біомолекул паренхіми печінки.	58
2.4.4. Оцінка антиоксидантної ланки захисту клітин.	60
2.4.5. Дослідження експресії мРНК прозапальних, профіброзних генів і ростових факторів.	61
2.5. Статистичний аналіз	63
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	65
3.1. Скринінгове дослідження потенційної гепатопротекторної дії ОРН-D-M при гострій гепатотоксичності	65
3.2. Дослідження впливу комплексу ОРН-D-M на морфологічні зміни та показники ураження паренхіми при гострій гепатотоксичності	68
3.3. Дослідження показників оксидативного стресу та антиоксидантної системи при гострій гепатотоксичності.....	73
3.4. Вплив комплексу ОРН-D-M на рівні відносної експресії генів ключових прозапальних цитокінів та транскрипційного фактору <i>Nfkb1</i>	80
3.5. Вплив комплексу ОРН-D-M на активацію стелатних клітин печінки при гострій гепатотоксичності	85
3.6. Вивчення експресії основних мітогенів печінки при ТАА-індукованій гепатотоксичності за дії ОРН-D-M.....	87
3.7. Вплив комплексу ОРН-D-M на розвиток патологічних процесів при хронічному токсичному гепатоураженні.....	89
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	101
ВИСНОВКИ.....	109
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	111

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

COL1A1	–	Колаген А-1
EGF	–	Епідермальний фактор росту
HGF	–	Гепатоцитарний ростовий фактор
IL-1	–	Інтерлейкін 1
IL-6	–	Інтерлейкін 6
IL-8	–	Інтерлейкін 8
IκB	–	Інгібітор транскрипційного фактору NF-κB1
NF-κB1	–	Транскрипційний фактор NF-κB1
TGF-α	–	Трансформуючий фактор росту α
TGF-β1	–	Трансформуючий ростовий фактор β1
TNF-α	–	Фактор некрозу пухлин α
АлАТ	–	Аланінамінотрансфераза
АсАТ	–	Аспартатамінотрансфераза
АФК	–	Активні форми кисню
АФН		Активні форми нітрогену
ГГТ	–	γ-глутамілтранснпептидаза
ГП	–	Глутатіон пероксидаза
ГТ	–	Глутатіон-S-трансфераза
МПО	–	Мілопероксидаза

- ОРН – Олігорибонуклеотиди
- ОРН-D-M – Комплекс олігорибонуклеотидів з D-манітолом
- ПОЛ – Пероксидне окислення ліпідів
- ПЦР-РЧ – Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі
- ТАА – Тіоацетамід

ВСТУП

Актуальність теми. 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 [1]. Згідно з останніми даними смертність від хвороб печінки становить більше 2 мільйонів смертей у рік у всьому світі, з них 1 мільйон через цироз печінки та 1 мільйон через вірусний гепатит і гепатоцелюлярну карциному [2]. Провідними етіологічними чинниками захворювань печінки прийнято вважати: зловживання алкоголем, інтоксикація забруднювачами навколишнього середовища та лікарськими засобами, ожиріння та вірусні інфекції [3]. Незалежно від природи пошкоджуючого агента, захворювання печінки супроводжуються окислювальним стресом, який призводить до деградації білків, ліпідів і нуклеїнових кислот [4]. При цьому, активні форми кисню та нітрогену беруть участь у фіброгенній реакції печінки та сприяють некрозу та апоптозу клітин, що в свою чергу призводить до змін патерну експресії генів і прогресуючого пошкодження печінки [5].

Сучасні підходи для лікування хвороб печінки направлені на усунення або ослаблення пошкоджуючого агента з наступною патогенетичною гепатотропною терапією – шляхом застосування протекторних препаратів [6]. Тому особливої уваги в цьому питанні заслуговують дослідження терапевтичних сполук природного походження, які б проявляли гепатопротекторні властивості та не призводили до серйозних побічних ефектів при тривалому застосуванні [7].

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, протизапальна дія і вплив на конформацію рецепторів вірусів [8–10]. Крім того, препарати на основі олігорибонуклеотидів знайшли своє застосування в корекції неалкогольного

стеатогепатиту та лікуванні хронічних вірусних гепатитів, викликаних вірусами В і С [11–13].

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 володіли б як противірусною, так і гепатопротекторною діями одночасно. Тому, дослідження потенційних гепатопротекторних молекулярних механізмів впливу ОРН-D-M за умов гострої та хронічної гепатотоксичності є предметом наукового інтересу, що робить дану тему дослідження цілком актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках наукової тематики групи молекулярної фармакології відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України: «Вивчення впливу олігонуклеотидів на сигнальні білки та експресію генів вродженого імунітету», 2014-2018 рр. (номер державної реєстрації – 0113U002779).

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 наступні 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. У роботі використані наступні методи дослідження: методи експериментальної патології (індукція гострої та хронічної гепатотоксичності), гістологічний (аналіз архітектури паренхіми печінки та відкладень сполучної тканини), спектрометричний (визначення АлАТ, ГГТ активностей в сироватці крові, рівня продуктів пероксидного окислення ліпідів, протеїнових карбонільних груп, протеїнових SH-груп, відновленого глутатіону, мієлопероксидазної, глутатіонпероксидазної, глутатіон-S-трансферазної

активностей у паренхімі печінки), електрофоретичний (дослідження цілісності тотальної РНК), полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (визначення рівнів відносної експресії досліджуваних генів), статистичного аналізу.

Наукова новизна отриманих 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 α (*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 α -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 β 1*) та колагену A-1 (*Colla1*) при гострому токсичному ураженні печінки. Встановлено, що препарат не змінює профілів відносної експресії ростових факторів – гепатоцитарного ростового фактору (*Hgf*), трансформуючого фактору росту α (*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 (*Tgfβ1*, *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. Шмаракову 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. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися 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 Пущинська 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.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

На сьогоднішній день гепатотоксичність є однією з основних цілей біомедичних досліджень через постійно зростаючий токсичний тиск на печінку як органу, що відповідає за гомеостаз та детоксикацію ксенобіотиків [14]. Гепатотоксичність являє собою багатокомпонентний процес, який зумовлений патологічною дією ксенобіотиків на паренхіму печінки [15]. В основі розвитку гепатотоксичності лежать процеси біоактивації чужорідних для організму речовин, що у більшості випадків призводить до утворення їх активних метаболітів, які здатні викликати ряд патологічних змін у печінці [16,17].

Токсичне ураження печінки при дії ксенобіотиків найчастіше відбувається через їх поглинання в шлунково-кишковому тракті [18,19]. Найчастіше гепатотоксинами виступають хімічні сполуки, які широко використовуються в різних галузях промисловості. Серед ксенобіотиків, які викликають гепатотоксичність чільне місце займають і лікарські засоби. Деякі препарати (ацетамінофен, серцеві глікозиди, бромфенак, троглітазон, тровафлоксацин, толкапон, фелбамат, пропілтіоурацил, телітроміцин) при передозуванні, а іноді навіть при застосуванні терапевтичних доз можуть спричинювати гепатотоксичність [20–22]. Більше 900 фармацевтичних препаратів мають причетність до розвитку гострих і хронічних токсичних уражень печінки і це найпоширеніша причина виведення препарату з ринку [23].

Механізми пошкодження печінки різноманітні, але всі вони проявляються розвитком оксидативного стресу, пошкодженням та значною загибеллю гепатоцитів, інфільтрацією паренхіми клітинами імунної системи, запаленням та активацією стелатних клітин печінки з надпродукцією ними компонентів позаклітинного матриксу (рис. 1.1) [24].

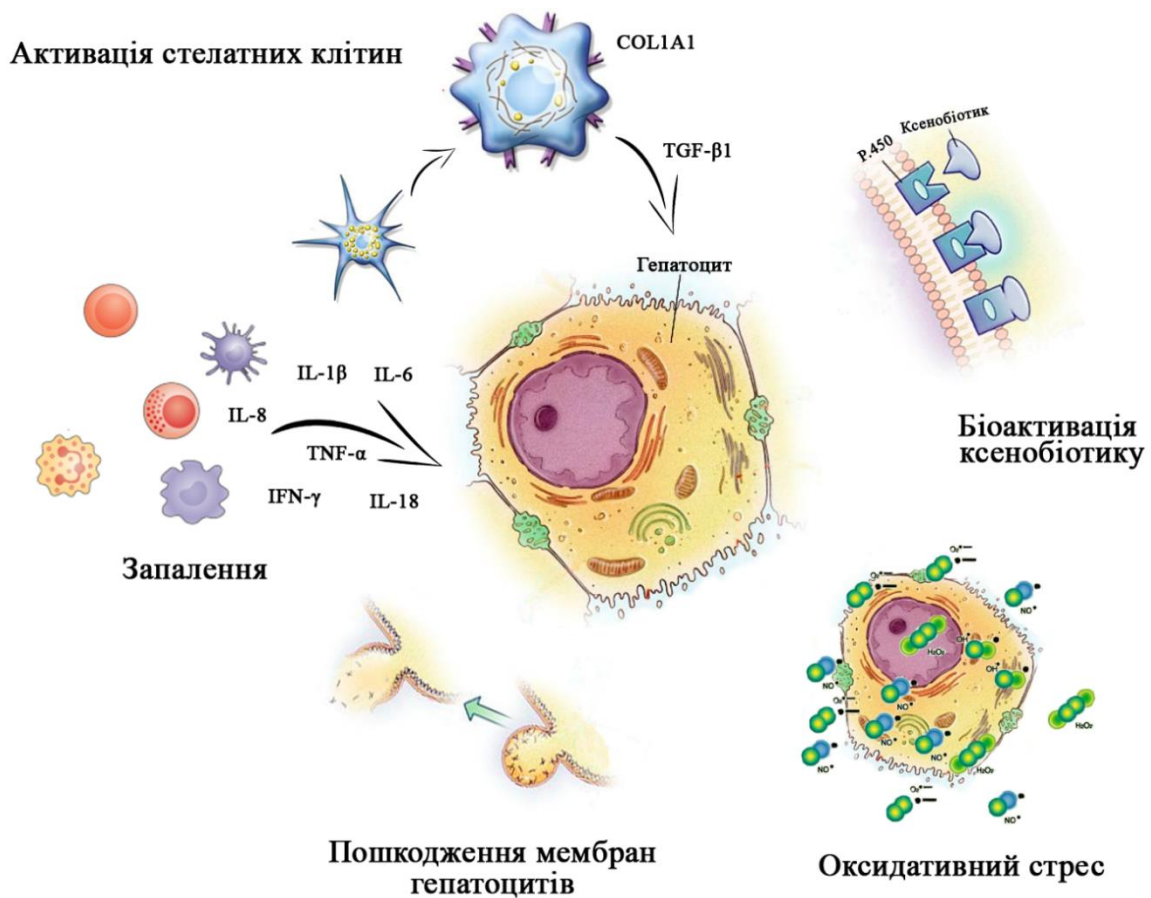


Рис. 1.1. Механізми пошкодження печінки, адаптовано за [24]

1.1. Роль біоактивації ксенобіотиків у розвитку гепатотоксичності

Ксенобіотична біотрансформація є головним механізмом збереження гомеостазу організму від дії ліків, промислових токсичних речовин, радіонуклідів, поліамінів та інших ксенобіотиків [25]. Незважаючи на високоефективні механізми детоксикації та елімінації ксенобіотиків у гепатоцитах, метаболічні перетворення деяких із них призводять до утворення більш токсичних інтермедіатів [26–28], які пошкоджують печінку.

Характерною тенденцією обміну всіх ксенобіотиків є прискорення їх елімінації із внутрішнього середовища шляхом введення полярних груп і

збільшення гідрофільності хімічних сполук [29,30]. Перша фаза біотрансформації ксенобіотиків опосередковує реакції окислення, відновлення або гідролізу за участі мультиферментних систем, які розміщуються в ендоплазматичному ретикулумі [16,31]. Основними ензимами, які входять до мультиферментних систем, є цитохроми P450 (EC 1.14), флавінвмісні монооксигенази (EC 1.14.13.8) та ксантинооксидази (EC 1.17.3.2), які каталізують окисно-відновні реакції та реакції ізомеризації в присутності молекулярного кисню [32]. У більшості випадків, в процесі I фази біотрансформації ксенобіотиків утворюються проміжні високореакційні метаболіти, які виступають пусковою ланкою в розвитку гепатотоксичності, індукуючи експресію біотрансформуючих ензимів (наприклад цитохромів P450 та флавінвмісних монооксигеназ) [33]. Надмірна кількість даних ензимів призводить до збільшення утворення токсичних метаболітів. Крім того, окисно-відновний цикл біотрансформації ксенобіотиків завжди супроводжується генеруванням активних форм кисню – гідроксильного радикалу $\bullet\text{OH}$, супероксид аніон радикалу $\text{O}_2^{\cdot-}$, пероксиду водню H_2O_2 (рис. 1.2) [24].

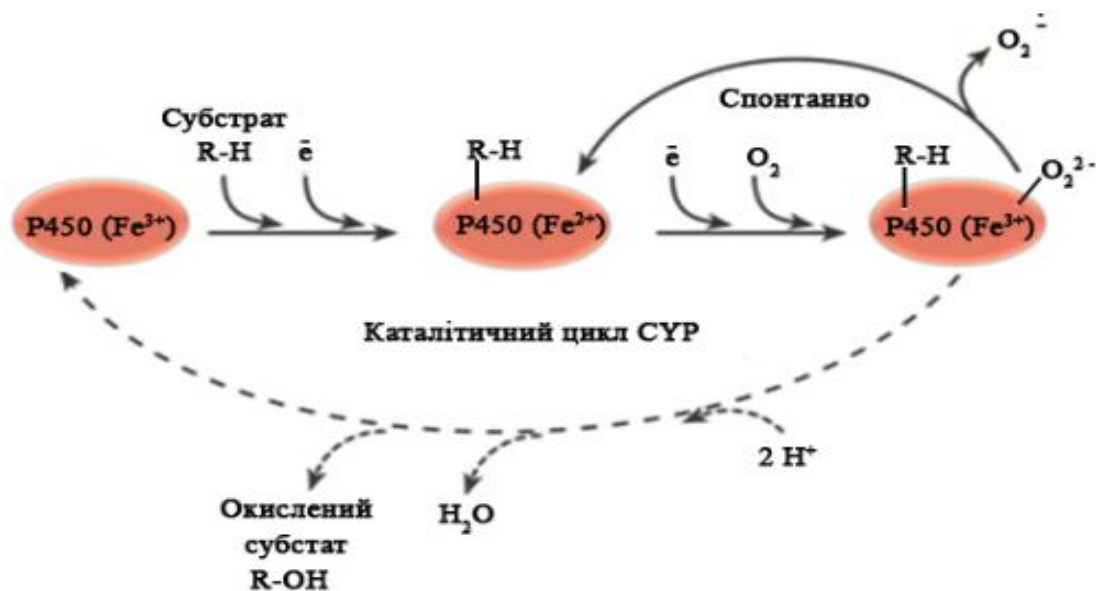


Рис. 1.2. Утворення супероксид аніон радикалу в реакціях мікросомного окислення ксенобіотику цитохромом P450

Наступним етапом біотрансформації ксенобіотиків є реакції кон'югації проміжних продуктів метаболізму, що утворились в процесі I фази ксенобіотичної трансформації з ендogenousними молекулами або фрагментами (наприклад, у формі кофактора). Реакції кон'югації призводять до значного збільшення гідрофільності проміжного продукту метаболізму ксенобіотиків та здійснюються широким набором клітинних UDP-глюкуронілтрансфераз (EC 2.4.1), сульфотрансфераз (EC 2.8.2), глутатіон-S-трансфераз (EC 2.5.1) та ацилтрансфераз (EC 2.3) [31,34–37]. Реакції кон'югації охоплюють в себе широкий спектр реакцій: глюкуронування, сульфатування, ацетилювання, метилювання, кон'югацію з глутатіоном та деякими амінокислотами (Gly, Tau та Glu) [38–41].

Особлива роль у II фазі детоксикації належить групі ферментів суперсімейства глутатіон-S-трансфераз (EC 2.5.1), які забезпечують каталіз реакції глутатіон-кон'югації [37]. Вони беруть участь у детоксикації кетонів, хінонів, сульфоксидів, пероксидів, хіміотерапевтичних засобів (бусульфан, циклофосфамід), пестицидів (акролеїн, малатіон, тридифан) та інших високореактивних проміжних речовин, що утворилися в ході метаболізму іншими ксенобіотико-метаболізуючими ферментами [42–44]. Загалом, глутатіон-S-трансферази каталізують нуклеофільну атаку відновленого глутатіону на електрофільні зони ксенобіотиків (C–, N–, O– або S–), внаслідок чого утворюються нетоксичні кон'югати. Крім цього, дані ферменти відіграють важливу роль у боротьбі з продуктами оксидативного стресу, які пошкоджують ліпіди клітинної мембрани, ДНК та білки. Вони активно каталізують реактивні проміжні речовини, які утворюються внаслідок пероксидного окислення ліпідів (4-гідроксиноненал), пероксидного окислення нуклеотидів (аденін пропеналь) або пероксидації катехоламінів (амінохром, допахром, адренохром) [45,46].

Завершальним етапом у метаболізмі ксенобіотиків є їх елімінація, яка забезпечується за дії білків, що належать до суперсімейства АТФ-зв'язувальних касетних транспортерів. Важлива роль у виведенні продуктів біотрансформації належить переважно рецепторам Р-глікопротеїну, MRP1, MRP2, BCRP/ABCG2. Субстратами для АТФ-зв'язувальних касетних транспортерів здебільшого є ліпофільні некон'юговані сполуки, тоді як водорозчинні кон'югати ксенобіотиків (глюкуронізовані, сульфатовані, кон'юговані з глутатіоном) транспортуються в печінці мультирезистентними білками MRP1 та MRP2 [47,48].

Печінкові АТФ-зв'язувальні касетні транспортери розміщуються в ключових місцях, які пов'язані з виведенням ксенобіотиків, а саме, на апікальних мембранах гепатоцитів, клітинах слизової оболонки кишечника та клітинах проксимальних каналців нирок [49]. Таке розміщення транспортерів дозволяє спрямовувати виведення кінцевих продуктів біотрансформації до жовчі, калу та сечі [50].

1.2. Оксидативний стрес як універсальний механізм ушкодження печінки

Підвищені рівні активних форм кисню (гідроксидного радикалу $\bullet\text{OH}$, гідропероксидного радикалу $\text{HO}_2\bullet$, пероксиду водню H_2O_2 , супероксид аніон радикалу $\text{O}_2\bullet^-$, синглетного кисню O_2^*), активних форм нітрогену (нітроксиду $\bullet\text{NO}$, пероксинітриту ONOO^- , діоксид нітрогену NO_2^-) та реакційноздатних метаболітів, які утворились у ході біотрансформації ксенобіотиків призводять до порушення окисно-відновного стану та розвитку оксидативного стресу [51,52]. При цьому, оксидативний стрес є ключовою частиною ланцюгу подій, які призводять до безповоротних змін структури ліпідів, білків та ДНК у клітинах печінки. Першими мішенями активних форм кисню (АФК) та нітрогену (АФН) при оксидативному стресі виступають поліненасичені жирні кислоти клітинних мембран, оскільки вони мають подвійні вуглецеві зв'язки, запускаючи каскад

пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) [53,54]. ПОЛ є наслідком саморозмножувальних ланцюгових реакцій та проходить у три етапи (рис. 1.3) [55]. На першому етапі ініціації пероксидного окислення ліпідів, прооксидант забирає водень, що призводить до утворення ліпідного радикалу [56]. Після ініціації відбувається ріст ланцюгових реакцій (другий етап ПОЛ) завдяки приєднанню кисню, в результаті чого утворюється новий ліпідний радикал та гідропероксид ліпиду [57]. Ріст ланцюгових реакцій припиняється при взаємодії ліпідних радикалів між собою або при взаємодії з різними антиоксидантами (вітаміном Е, відновленим глутатіоном) [55].

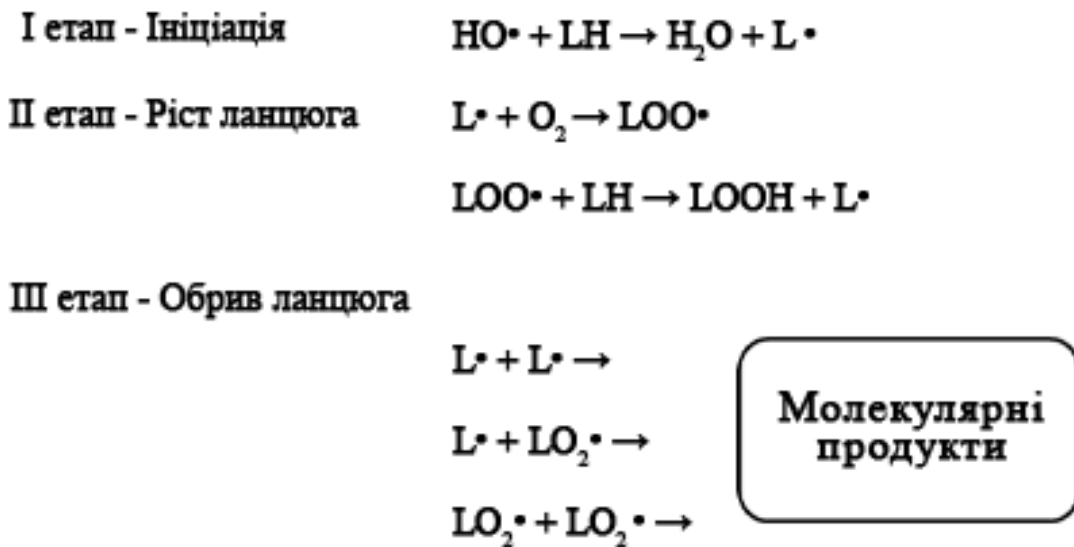


Рис. 1.3. Коротка схема стадій пероксидного окислення ліпідів

Патогенна роль ПОЛ полягає у пошкодженні мембран, що призводить до порушення іонного обміну гепатоцитів [58,59]. Крім того, реакційноздатні продукти ПОЛ (гідропероксиди ліпідів, малоновий диальдегід, пропанал, 4-гідроксиноненал тощо) можуть брати участь у внутрішньомолекулярному або міжмолекулярному зшиванні білків або ДНК [60]. Це сприяє глибокій зміні біохімічних властивостей біомолекул [61,62]. Крім того, малоновий диальдегід,

взаємодіючи з білками, утворює гібридні білкові адукти, які розпізнаються резидентними макрофагами печінки та сприяють продукції цитокінів, хемокінів та збільшення експресії молекул адгезії [63,64].

Білки гепатоцитів теж виступають мішенями дії АФК та АФН у клітині, через їх велику кількість та різноманітність амінокислотних залишків (які виступають акцепторами). SH-групи та первинні аміногрупи білків легко реагують з електрофілами [65–67]. Окислення білків за дії АФК та АФН сприяє ковалентним, незворотним модифікаціям бічних ланцюгів залишків амінокислот (Cys, Lys, His), утворенню зшивок між білками і окисленню білкового скелету, що призводить до фрагментації молекули [68,69]. Міжмолекулярні реакції білкових карбонілів, які утворились при окисленні білків, можуть призвести до пошкодження ДНК (утворення 8-оксо-2'-дезоксигуанозину), формування адуктів типу білок-ДНК [62,70,71].

Наслідками оксидативного стресу у печінці при гепатотоксичності є пошкодження органел (мітохондрій, ендоплазматичного ретикулуму, рибосом), порушення трансмембранного потенціалу, збільшення проникності мембран, набухання клітин, їх масова загибель, індукція імунної відповіді та рекрутинг клітин імунної системи до місця запалення.

1.3. Розвиток запалення в умовах гепатотоксичності

Запалення є складною біологічною реакцією на дію гепатотоксину, яке необхідне для усунення пошкоджених клітин та ініціювання відновлення паренхіми органу. Розвиток запалення при гепатотоксичності є результатом реакції резидентних макрофагів печінки (клітини Купфера), гепатоцитів, ендотеліальних та стелатних клітин печінки на вивільнення внутрішньоклітинного вмісту гепатоцитів при некрозі [72]. Даний набір клітин печінки розпізнає ендогенні молекули, які утворились внаслідок

пошкодження/загибелі клітин за допомогою рецепторів розпізнавання патерну. До цих рецепторів належать Toll-подібні рецептори, NOD-подібні рецептори, рецептори лектинів С-типу та інші [73]. Ендогенні молекули, які ініціюють запуск запальної сигналізації дуже різноманітні і не мають спільної будови між собою. Такими молекулами можуть виступати АФК, гібридні білкові адукти, які утворились при оксидативному стресі, фрагменти ядерної та мітохондріальної ДНК, РНК, сечова кислота, АТФ та інші [74,75]. Рецептори розпізнавання патерну розпізнають ендогенні молекули, які перебувають в позаклітинному просторі та активують універсальний транскрипційний фактор NF- κ B [76]. Активованій NF- κ B сприяє продукції великої кількості цитокінів, хемокінів та факторів росту [77].

Після масової загибелі гепатоцитів при гепатотоксичності клітини Купфера першими реагують на значне пошкодження паренхіми органу. Вони сприяють видаленню уламків та частин загиблих клітин (шляхом фагоцитозу), вивільненню прозапальних цитокінів, хемокінів та стимулу імунної відповіді [78,79].

Клітини Купфера як початкові сенсори пошкодження печінки вивільняють різні прозапальні цитокіни та хемокіни, які необхідні для рекрутингу клітин імунної системи до місця ураження [80]. Клітини Купфера є основним джерелом IL-6, TNF- α , IL-1 β , CXCL1, CXCL2 і CXCL8, які необхідні для рекрутування моноцитів, лімфоцитів, нейтрофілів, надлишок яких у місці ураження сприяє ішемії/реперфузії та пошкодженню печінки [81–84].

Крім того, деякі цитокіни (наприклад IFN- γ , TNF- α) призводять до зміни експресії молекул клітинної адгезії (ICAM-1, VCAM-1) на клітинах синусоїдального ендотелію, що полегшує рекрутування клітин імунної системи до місця подразника [85,86]. У місці ураження, запальні клітини вивільняють хімічні медіатори (ейкозаноїди, цитокіни, хемокіни, оксид азоту, мієлопероксидазу, NADPH-оксидазу та інші), які індукують пошкодження клітин печінки, посилюють оксидативний стрес і виробництво вільних радикалів. Таким

чином, надекспресія прозапальних генів провокує внутрішньоклітинні каскади, що сприяють виробленню АФК, внаслідок чого виникає порочний цикл, де посилений оксидативний стрес і запалення сприяють системному запаленню та патогенезу захворювання (рис. 1.4) [87–89].

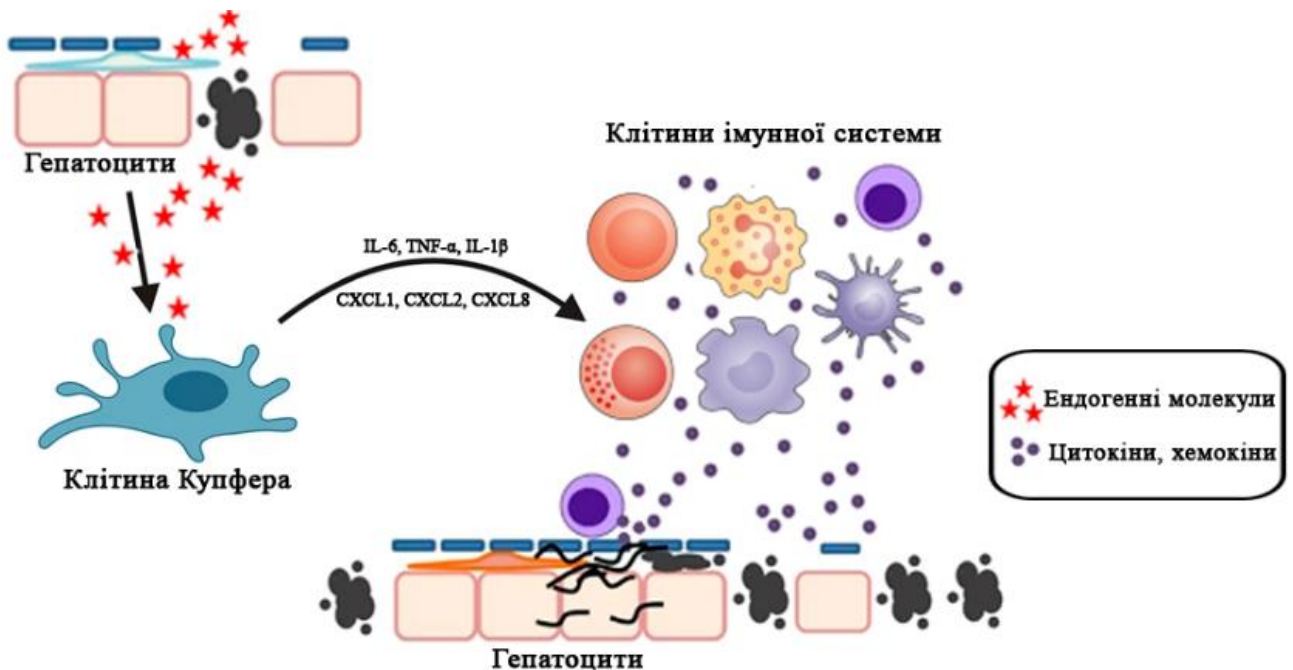


Рис. 1.4. Схематичне зображення розвитку запалення на пошкодження гепатоцитів при гепатотоксичності, адаптовано за [90,91]

1.4. Роль універсального транскрипційного фактору NF- κ B та цитокінів у розвитку запалення при гепатотоксичності

У відповідь на пошкодження біомолекул клітин, у гепатоцитах активуються транскрипційні фактори NF- κ B, STAT3 та AP-1, які індукують експресію цільових генів та беруть участь у внутрішньоклітинній передачі сигналу при пошкодженні печінки [92–94].

Універсальний фактор транскрипції NF- κ B виступає головним координатором імунної реакції, запалення та апоптозу клітин [95]. NF- κ B являє собою гомо- або гетеродимерний комплекс, що складається з 2 субодиниць. До складу родини NF- κ B входить 5 гомологів: p50 (і його попередник p105), p52 (і його попередник p100), p65 (RelA), c-Rel і RelB. Всі ці білки мають в своєму складі Rel домен – висококонсервативну N-кінцеву послідовність з 300 амінокислот – який необхідний для димеризації, зв'язування з ДНК і асоціації з білками родини I κ B – цитоплазматичними інгібіторами NF- κ B. Крім Rel домену білки родини NF- κ B мають спеціальні NLS послідовності, які необхідні для транспорту даних білків з цитоплазми в ядро [96–98].

За відсутності стимулів NF- κ B знаходиться в цитоплазмі в неактивному стані, будучи в комплексі з білками родини I κ B. Родина I κ B налічує 6 окремих білків: I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ , I κ B- δ , I κ B- ϵ і Bcl-3 [99]. Всі білки даної родини містять у своїй послідовності анкіріновий повтор, який дозволяє їм зв'язуватися з NF- κ B, підтримувати його у неактивному стані і забезпечувати цитоплазматичну локалізацію. За наявності стимулів (цитокіни, АФК, фактори росту) відбувається фосфорилування та протеасомна деградація I κ B та вивільнення димерного комплексу NF- κ B (рис. 1.5) [100,101].

При гепатотоксичності NF- κ B виконує подвійну функцію – з одного боку опосередковує антиапоптичну реакцію, забезпечуючи захист гепатоцитів від загибелі, тоді як з іншого боку – ініціює запальну реакцію на уже загиблі гепатоцити [76]. Загалом активація сигнального шляху NF- κ B є вирішальною умовою у контролі апоптозу, проліферації та диференціації гепатоцитів шляхом індукції мітоген-активованих протеїнкіназ, або фосфатидилінозитол-3-кінази та її мішені, протеїнкінази Akt [102,103]. З іншого боку, надмірна активація NF- κ B у відповідь на стимули призводить до індукції генів, які кодують цитокіни (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α , GM-CSF), хемокіни (MIP1, CCL11, CCL5), білки гострої

фази, молекули адгезії та індукційні ферменти (індукційну NO-синтазу, циклооксигеназу-2) [104–107].

Така подвійна функція транскрипційного фактору вимагає тонкого балансу, оскільки занадто низька або висока активація NF- κ B може мати негативний вплив на печінку внаслідок посилення запалення або недостатнього захисту від загибелі клітин [108,109].

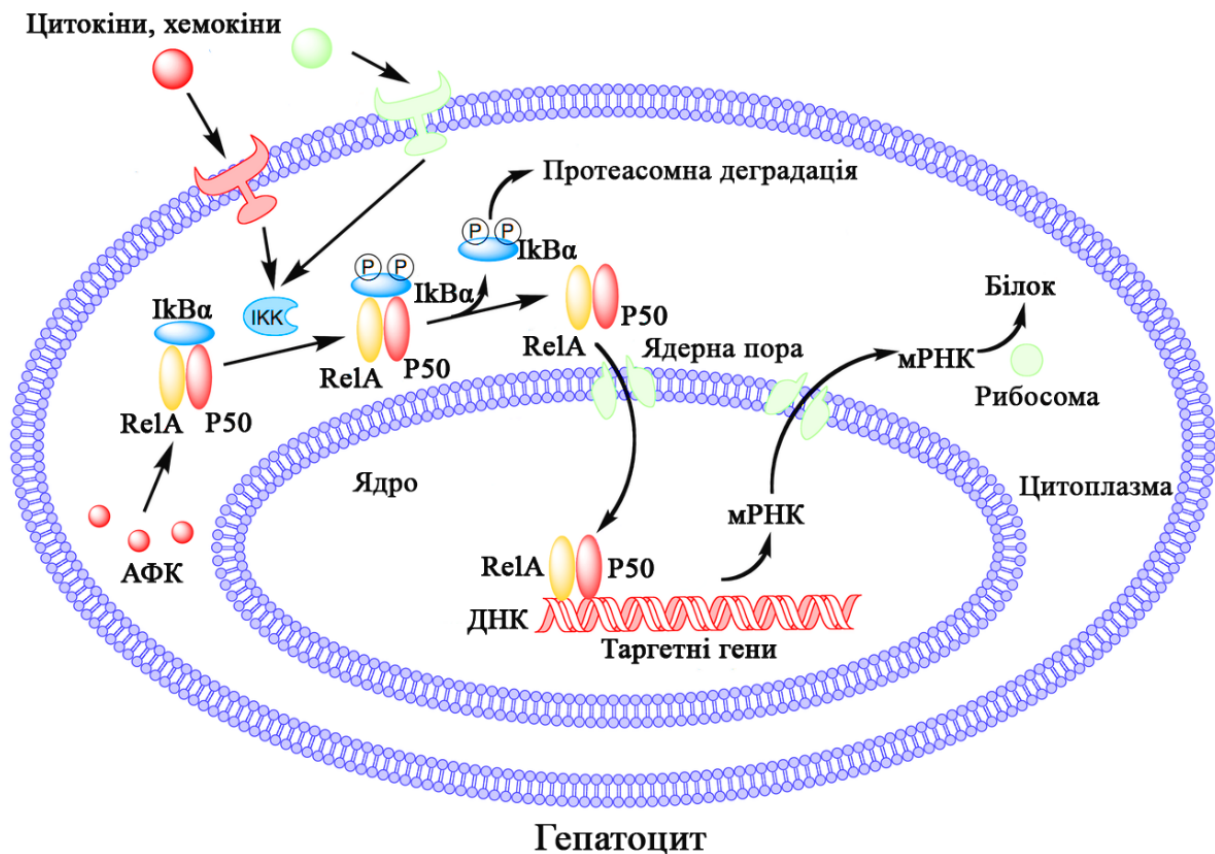


Рис. 1.5. Схематичне зображення активації сигнального шляху NF- κ B

Не менш важливу роль у розвитку запалення відіграють цитокіни, надмірна кількість яких призводить до цитокінового шторму та є вирішальною у розвитку хронічного запалення та ураження паренхіми органу [110].

Родина інтерлейкінів 1 (IL-1) являє собою групу з 11 цитокінів, які відіграють центральну роль в регуляції імунних і запальних реакцій на інфекції. IL-1 інтенсивно продукуються клітинами Купфера, макрофагами, моноцитами та дендритними клітинами [111,112]. Крім того, некротичні гепатоцити пасивно вивільняють IL-1, що призводить до швидкої інфільтрації нейтрофілів та моноцитів до місця ураження. Цитокіни даної родини індукують також експресію молекул адгезії на ендотеліальних клітинах для міграції фагоцитів та лімфоцитів до місця запалення [113,114].

Інший прозапальний цитокін інтерлейкін 6 (IL-6) експресується переважно макрофагами, лімфоцитами та ендотеліальними клітинами та стимулює синтез білків гострої фази, сприяє диференціюванню моноцитів, інфільтрації нейтрофілів, активації NF- κ B та бере участь у ремоделюванні позаклітинного матриксу [115,116].

Інтерлейкін 8 (IL-8) належить до родини хемокінів, який надмірно секретується при оксидативному стресі. IL-8 відповідає за хемотаксис нейтрофілів до місця запалення та їх дегрануляцію [117,118].

Фактор некрозу пухлин α (TNF- α) – плеїотропний цитокін, який виробляється переважно клітинами Купфера, Т- та В-лімфоцитами [119,120]. TNF- α здійснює свої біологічні функції завдяки взаємодії з двома спорідненими мембранними рецепторами, TNF-R1 та TNF-R2 [121]. TNF- α може виступати потужним активатором як прозапальних, так і проапоптотичних шляхів, причому ці сигнальні шляхи взаємодіють у складній мережі на декількох рівнях, і активація одного шляху часто залежить від інактивації іншого шляху. Загалом підвищена індукція TNF- α сприяє стимуляції гострофазної відповіді та системного запалення [122–124].

1.5. Активація стелатних клітин печінки при гепатотоксичності

Масова загибель гепатоцитів та рекрутинг клітин імунної системи до місця запалення при гепатотоксичності забезпечують вивільнення величезної кількості ефекторних молекул, що призводить до ремоделювання позаклітинного матриксу опосередкованого активацією стелатних клітин печінки [125]. За нормальних фізіологічних умов стелатні клітини печінки являють собою веретеноподібні клітини з наявністю у цитоплазмі множинних ліпідних крапель з ретиноїдами. У результаті дії різних факторів стелатні клітини печінки, які знаходяться у безпосередній близькості до гепатоцитів переходять до активованого стану [126,127]. Стимулами для активації стелатних клітин печінки при гепатотоксичності виступають АФК, продукти ПОЛ (малоновий диальдегід, дієнові кон'югати, основи Шиффа тощо), прозапальні цитокіни (TNF- α , PDGF, IL-1, IL-6), які індукують вивільнення трансформуючого ростового фактору β (TGF- β) клітинами Купфера та рекрутованими макрофагами [128]. Цьому профіброгенному цитокіну належить ключова роль у активації стелатних клітин печінки. Дослідниками показано, що стелатні клітини печінки здатні не лише реагувати на TGF- β , але й самі його секретувати, тим самим створюючи аутокринну петлю, за допомогою якої клітини самі себе стимулюють до активації та проліферації [129,130]. TGF- β також здійснює вплив на експресію матриксних генів – знижує синтез матричних металопротеїназ та підвищує вироблення їх інгібіторів [131,132]

Процес активації стелатних клітин печінки передбачає їх фенотипову трансформацію у міофібробластичний тип та втрату ретиноїд-вмісних ліпідних крапель. Викид ретиноїдів в позаклітинний простір відіграє важливу роль у розвитку гепатотоксичності. Встановлено, що вивільнені ретиноїди беруть участь у індукції індукцибельних ферментів I фази біотрансформації

ксенобіотиків, виступаючи лігандами факторів транскрипції PPAR α -RXR α , PXR-RXR α та CAR-RXR α [133–135].

Відомо, що у здоровій печінці білки позаклітинного матриксу становлять приблизно 7-10 % від загального об'єму та значною мірою розміщуються в порталних трактах, синусоїдальних стінках та в області центральних вен. До білків позаклітинного матриксу здорової печінки належать: різноманітна кількість колагенів (трансмембранні, мережеутворюючі, фібрилярні), глікопротеїни (фібриногени, фібронектини), матрицелюлярні білки, протеоглікани (біглікан, декорин, люмікан) та білки, які утворюють еластичні волокна [136,137].

При пошкодженні печінки спостерігається активне ремоделювання позаклітинного матриксу за дії активованих стелатних клітин, що має вирішальне значення у відновленні маси та сполучнотканинного каркасу печінки. Кількість білків позаклітинного матриксу безперервно контролюється за рахунок балансу між його синтезом та деградацією [53,138]. Ключову роль у підтриманні балансу відіграють матричні металопротеїнази (матрична металопротеїназа 1, 13) та їх інгібітори [139].

Постійне пошкодження печінки за дії гепатотоксинів сприяє безперервному оксидативному стресу, мобілізації клітин імунної системи та активації стелатних клітин печінки, що тягне за собою розвиток фіброгенезу [140]. Характерною особливістю фіброгенезу є каскадний характер процесу завдяки різноспрямованості (одна клітина виробляє декілька цитокінів) та поліпотентності (різні клітини впливають на одну і ту ж функцію) клітин печінки [141]. Крім того, дисбаланс між синтезом та деградацією білків позаклітинного матриксу за рахунок зниження експресії матричних металопротеїназ та підвищення вмісту їх інгібіторів призводить до надмірного накопичення білків позаклітинного матриксу (переважно фібрилярних колагенів I та III типу,

фібронектину, еластину та ламініну) та формуванню сполучнотканинних волокон у осередках ураження паренхіми органу (рис. 1.6) [142].

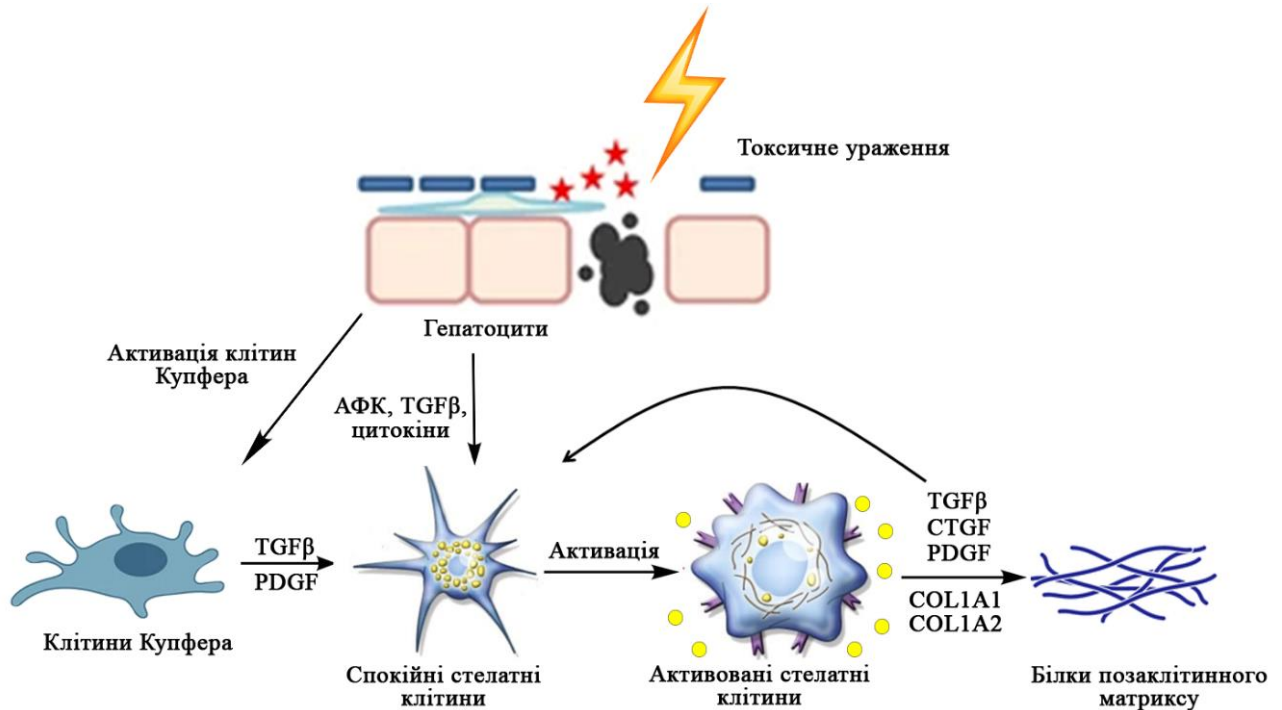


Рис. 1.6. Схематична модель активації стелатних клітин печінки, адаптовано за [139]

1.6. Роль регенеративних процесів у відновленні печінки після токсичного ураження

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. Під регенерацією розуміють комплекс жорстко регульованих фізіологічних процесів правильної проліферації гепатоцитів, непаренхіматозних клітин і відновлення порушених функцій органу після його пошкодження [143–145]. Регенеративний процес включає 3 важливі фази: фазу первинного зародження, фазу проліферації та фазу термінації [146].

Цитокіни (TNF- α , IL-6) та фактори росту, які вивільняються резидентними макрофагами печінки та рекрутованими клітинами імунної системи при запаленні індукують першу фазу регенерації печінки (фазу первинного зародження) через активацію сигнальних шляхів JAK/STAT, MAPK та PI3K/AKT[147]. Фаза первинного зародження характеризується переходом спокійних гепатоцитів, які знаходяться у G0 фазі до G1 фази клітинного циклу. У свою чергу, фаза проліферації сприяє переходу клітин з G1 фази у S фазу. Це забезпечується роботою основних (HGF, EGF, TGF- α) та допоміжних мітогенів, які прискорюють регенеративний процес [148].

Важливим ініціатором регенерації печінки є гепатоцитарний ростовий фактор (HGF), який синтезується стелатними та ендотеліальними клітинами печінки. HGF синтезується у вигляді неактивного поліпептиду і для активації та виконання своїх функцій потребує протеолітичного розщеплення. Мітоген здійснює свою дію завдяки активації рецептору тирозинкінази c-MET, що призводить до інтенсивного синтезу ДНК у гепатоцитах та їх проліферації [149].

Інший основний мітоген – трансформуючий ростовий фактор α (TGF- α) виступає індуктором регенерації шляхом зв'язування з рецептором епідермального фактору росту (EGFR) [150]. Він виступає мітогеном для гепатоцитів (діє аутокринно), стелатних клітин печінки та епітеліальних клітин жовчних проток. TGF- α інтенсивно продукується уже через 2-3 год після пошкодження печінки та підтримується на високому рівні більше 48 год [151,152].

EGF виступає ще одним основним мітогеном, який стимулює проліферацію гепатоцитів через сигнальний шлях Ras-MAPK, зв'язуючись з рецептором EGFR. Основним місцем вивільнення EGF є Бруннерові залози дванадцятипалої кишки, де його синтез стимулюється катехоламіни при гепатотоксичності [153].

Допоміжні мітогени, хоч і не мають прямого мітогенного впливу, здатні підсилювати роботу основних мітогенів та прискорювати регенеративний процес у печінці. До них належать: жовчні кислоти, норадреналін, ендотеліальний фактор росту, інсулін, естроген та серотонін (Таблиця 1.1) [154–157]

Таблиця 1.1

Характеристика деяких допоміжних мітогенів, які синтезуються при гепатотоксичності

Допоміжний мітоген	Походження	Біологічний ефект
Жовчні кислоти	Гепатоцити, холангіцити	Стимуляція регенерації через сигнальний шлях за дії на фарнезоїдний рецептор (FXR), підвищення експресії транскрипційного фактору FOXM1
Норадреналін	Гіпоталамус, мозкова речовина наднирників	Підсилення роботи EGF і HGF через вплив на $\alpha 1$ -адренергічний рецептор, стимуляція експресії SMAD7
Ендотеліальний фактор росту	Гепатоцити	Проліферація синусоїдальних ендотеліальних клітин та гепатоцитів
Інсулін	β -клітини острівців Лангерганса підшлункової залози	Активація фосфоліпази C - InsP3-сигнального шляху

продовження Таблиця 1.1

Естроген	Репродуктивна система	Стимуляція регенерації через взаємодію з естрогеновим рецептором (ER)
Серотонін	Ентерохромафінні клітини	Стимуляція регенерації через взаємодію з серотоніновим рецептором (HTR2)

Після відновлення паренхіми печінки настає завершальний етап регенерації – фаза термінації. Вона опосередковується антипроліферативними факторами, такими як TGF- β та активін, які забезпечують зниження проліферації гепатоцитів та синтезу ДНК [146].

1.7. Тіоацетамід-індукована гепатотоксичність

Тіоацетамід (ТАА) являє собою сульфурвмісною сполуку, яка розчинна у воді та етанолі та використовується як джерело сульфід-іонів при синтезах органічних та неорганічних сполук (хімічний синтез каучуку, виробництво пестицидів, фармацевтичних препаратів) та як зшиваючий агент [158,159]. Дослідження ТАА як гепатотоксину розпочалися в 1945 році, коли його велика кількість була виявлена в апельсиновому соці (тоді ТАА використовувався як фунгіцид), що склало потенційну небезпеку для здоров'я людей [158]. Пізніше було показано, що одноразове застосування ТАА в дозі 1-2 мМ/кг викликає класичний центролобулярний некроз, який супроводжується підвищенням рівнів сироваткових трансаміназ і білірубину [160]. На теперішній час, ТАА широко використовують для моделювання гострих та хронічних токсичних уражень печінки. Як і більшість гепатотоксичних агентів, ТАА метаболізується шляхом каталітичної дії мікросомальних монооксигеназ і CYP P450 2E1 до активних

метаболітів. Біотрансформація ТАА відбувається в результаті двох реакцій окислення, що призводить до утворення S-оксиду –TASO, а потім до хімічно реактивного S, S-діоксиду – TASO₂ (рис. 1.7):

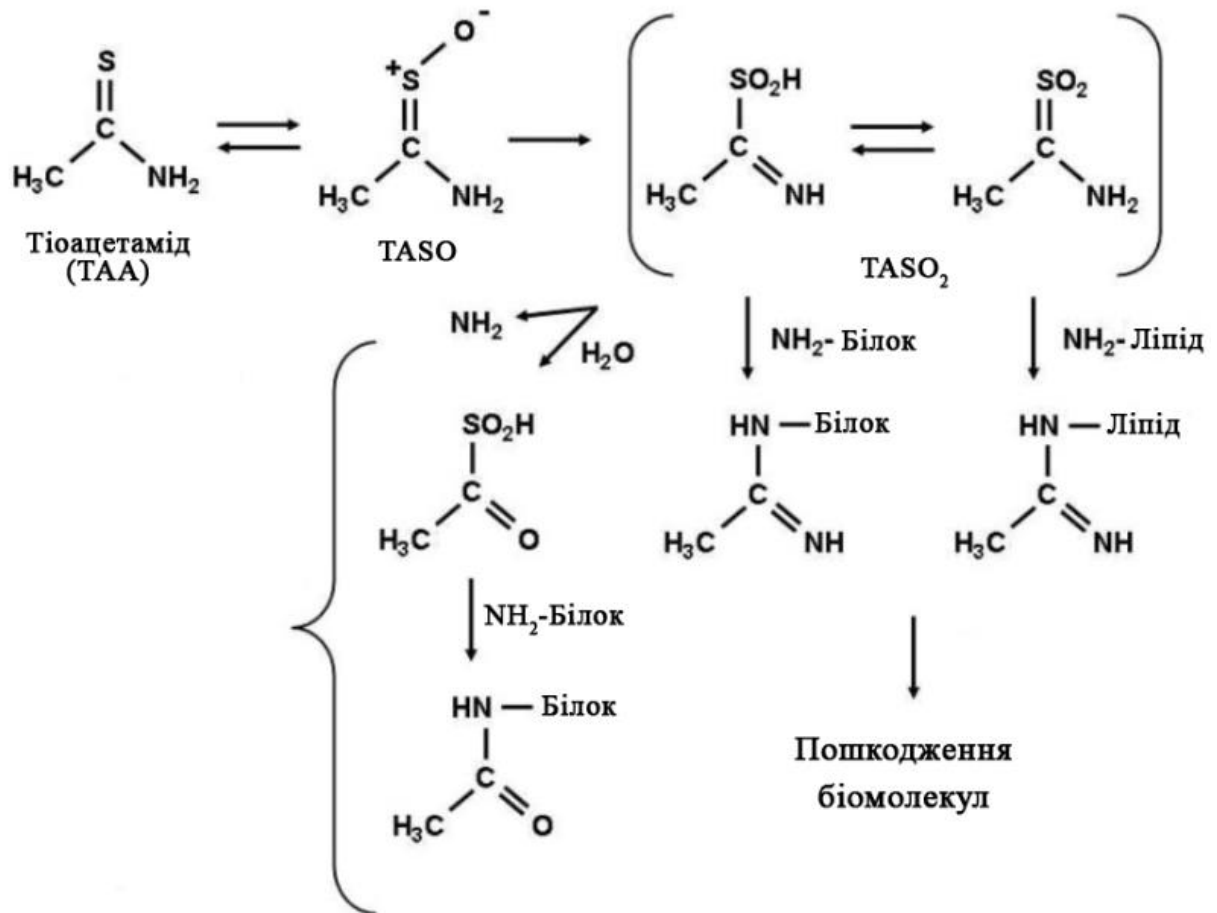


Рис. 1.7. Схема біотрансформації ТАА в гепатоцитах печінки, адаптовано за [161]

На клітинному рівні гепатотоксичність ТАА проявляється у центрально-лобулярному некрозі та значній лімфо-макрофагальній інфільтрації зони ураження. TASO в клітинах печінки призводить до зміни проникності цитоплазматичної мембрани, збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca²⁺ та інгібування мітохондріальної активності [162]. У той же час, TASO₂,

існуючи у двох таутомерних формах, може взаємодіяти з бічними ланцюгами білків ендоплазматичного ретикулулу, мітохондрій, а також білків теплового шоку через залишки Pro, Arg, Lys, і Thr, змінюючи їх заряд, конформацію та функціональну активність [163]. Також, TASO₂ порушує цикл сечовини, активність орнітин-карбамоїл-трансферази та індукує синтез індукцибельної NO-синтази та універсального фактору транскрипції NF-κB [164].

1.8. Нуклеїнові кислоти як терапевтичні молекули

1.8.1. Синтетичні нуклеїнові кислоти. В усіх живих організмах нуклеїнові кислоти виконують роль зберігання, передачі та реалізації генетичної інформації. Вони є невід'ємною частиною багатьох біологічних процесів, починаючи з синтезу білків і закінчуючи вузькоспеціалізованими регуляторними та каталітичними функціями. Без перебільшення, можна сказати, що нуклеїнові кислоти є одними з основоположних елементів живих систем. Тому, не дивно, що інтерес до нуклеїнових кислот з часом їх дослідження став не лише фундаментальний, але й прикладний, що призвело до розробки нового класу потенційних терапевтичних агентів на основі нуклеїнових кислот [165,166].

Препарати на основі нуклеїнових кислот досить різноманітні: вони відрізняються за механізмом і тривалістю дії, типом використовуваної молекули нуклеїнових кислот і локалізації мішені.

До основних синтетичних терапевтичних агентів належать:

- Аптамери;
- Короткі інтерферуючі РНК (РНК-інтерференція);
- Антисмислові олігонуклеотиди;
- Імуномодуючі олігонуклеотиди [167,168].

Аптамери являють собою синтетичні одноланцюгові олігонуклеотиди ДНК або РНК довжиною 30-100 пар нуклеотидів, які формують складні тривимірні структури в результаті взаємодії комплементарних ділянок ланцюга [169]. Просторовий розподіл заряджених фосфатних груп і неспарених основ утворює унікальний розподіл функціональних груп, здатних до електростатичних і ван-дер-ваальсових взаємодій із утворенням водневих зв'язків із відповідними функціональними групами молекулярної мішені, що і визначає здатність аптамера до специфічного зв'язування [170].

Функціонально аптамери являють собою аналоги природніх антитіл, які володіють рядом переваг (в силу своїх фізико-хімічних властивостей) – високою специфічною стабільністю та слабкою імуногенністю. Вони відбираються з великого пулу рандомізованих послідовностей шляхом експоненціального збагачення (SELEX), що дозволяє проводити скринінг аптамерів на зв'язування з молекулами-мішенями. Такий підхід дозволяє відібрати високоафінні аптамери, націлені на широкий профіль родин білків, включаючи цитокіни, протеази, кінази, клітинні рецептори та молекули клітинної адгезії [171,172].

Першими ліками на основі аптамерів був препарат «Пегаптаніб» – пегільований аптамер, блокуючий фактор росту ендотелію судин, дозволений з 2004 року Управлінням з продовольства і медикаментів США для застосування в офтальмології для лікування макулодистрофії сітківки ока [173].

Досить перспективною є стратегія придушення експресії певних генів, заснована на явищі РНК-інтерференції [174]. У процесі даного явища, яке запускається при введенні в клітину специфічної дволанцюгової РНК (короткі інтерферуючі РНК і малі шпилькові РНК), відбувається руйнування мРНК послідовності до якої комплементарна специфічна дволанцюгова РНК. Ефективність дії препаратів коротких дволанцюгових РНК надзвичайно висока і вже отримані позитивні дані в досліджах на тваринах, в тому числі, з придушення вірусних інфекцій. Розробки систем транспортування та стабільності коротких

дволанцюгових РНК призведе до отримання препаратів, здатних тривалий час інактивувати цільові гени в організмі й пригнічувати розмноження інфекційних агентів [175–177].

Імуномодулюючі олігонуклеотиди – це молекули РНК або ДНК визначеної будови, які містять неметильовані по цитозину CpG мотиви (CpG-олігонуклеотиди), які стимулюють імунні реакції Т-клітинного імунітету. Вони здатні активувати В-лімфоцити, Т1-хелпери, плазматичні дендритні клітини, макрофаги, натуральні кілери та інші типи клітин, що призводить до збільшення рівня секреції таких цитокінів, як ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-12, ІЛ-18, TNF- α , IFN- α , β , γ , які координують місцевий і системний запальні процеси й продукцію імуноглобулінів [178].

1.8.2. Природні нуклеїнові кислоти. Застосування природних олігорибонуклеотидів із терапевтичною метою на сьогодні виявляється одним із провідних напрямків у корекції метаболічних порушень і супутніх патологічних станів і розглядається як унікальне підґрунтя у створенні інноваційної біомедицини [179].

Впродовж останніх років лікувальні препарати на основі рибонуклеїнових кислот активно впроваджуються в практичну медицину. Вони є високоефективними, нетоксичними, з широким спектром біологічної дії. Зокрема, РНК-вмісні препарати підвищують імунну реактивність організму, мають противірусну та протизапальну активності, регулюють основні метаболічні шляхи при різних патологічних станах [180].

Олігорибонуклеотиди (ОРН) становлять собою молекули довжиною 4-7 нуклеотидів, виділені з тотальної дріжджової РНК без домішок білків та вуглеводів [181,182]. У ОРН переважаючою фракцією є олігонуклеотиди з великою кількістю мінорних основ [181].

На моделі стабілізації мембран еритроцитів *in vitro* та карагеніновій моделі запалення *in vivo* показано, що ОРН володіють мембраностабілізуючою та

протизапальною діями. Крім того, було показано, що попереднє введення ОРН пригнічувало активність індукцйбельної NO-синтази в плазмі крові, що свідчить про інгібіторну дію ОРН на активацію окислювального шляху метаболізму L-аргініну на моделі локального запалення в мишей. Ці властивості дають змогу використовувати ОРН при патологічних процесах, які супроводжуються індукцією NO-синтази: діабет, рак, гепатит, інфекційні хвороби, нейродегенеративні хвороби (хвороби Паркінсона, Альцгеймера, розсіяний склероз, енцефаліт) [8,183].

При дослідженнях впливу ОРН на моделі агрегації тромбоцитів, індукованих арахідоною кислотою, показано, що ОРН володіють вираженими антиагрегатними властивостями з широкою межею оптимальної концентрації [182].

Відомо, що ОРН мають імуномодулюючу активність. Зокрема, ОРН стимулюють міграцію стовбурових клітин із кісткового мозку та збільшують утворення клітин імунної пам'яті. Крім того, ОРН нормалізують рівні Т- і В-клітин при їх зниженому вмісті, їх функціональну активність, стимулюють продукцію Т-хелперів і Т-супресорів, усувають дисбаланс популяції лімфоцитів, нормалізують вміст антиген-реактивних клітин і сироваткових імуноглобулінів класів G, A, M, індукують вироблення ендogenous інтерферону [184].

Істотним недоліком природних препаратів на основі дріжджових РНК є відсутність у їхньому складі модифікацій від дії нуклеаз, які могли б збільшити їх період напіввиведення з організму. На відміну від мікроорганізмів для яких передача генетичної інформації є ефективним і значущим процесом, багатоклітинний організм володіє рядом захисних механізмів, які перешкоджають проникненню екзогенних нуклеїнових кислот. Оскільки природні нуклеїнові кислоти не мають у своєму складі трансфікуючих агентів, їх захоплення клітинами є менш ефективним, що обумовлено фізико-хімічними властивостями клітинної мембрани та самих нуклеїнових кислот. Тому, з метою

підвищення стабільності та розчинності препаратів на основі дріжджової РНК було проведено дослідження комплексоутворення між ОРН і D-манітолом, D-сорбітолом і лактозою для визначення оптимального співвідношення молекула-ліганд, яке буде забезпечувати максимальну біологічну активність створених лікарських засобів. За допомогою ІЧ фур'є-спектрального аналізу та Раманівського фур'є-спектрального аналізу було показано, що найефективніша взаємодія була в парі ОРН-D-M [185].

ОРН-D-M являє собою комплекс, який формується з ОРН та D-манітолу, за допомогою утворення водневих зв'язків між паралельними гідроксильними ОН-групами D-манітолу та центрами генерування водневих зв'язків у гетероциклах нуклеозидів [186]. Оптимальне співвідношення при якому ОРН-D-M володіють біологічною активністю складає: ОРН:D-M – 2,5:1 [180].

Показано, що комплекс має широкий спектр біологічної активності. Зокрема, ОРН-D-M володіє противірусною активністю проти вірусів простого герпесу 1-го типу, Епштейна-Барр, H1N1, H5N2, PIV3, HCV [187,188].

У дослідженнях протигрипозної дії комплексу показано, що ОРН-D-M знижує підвищені рівні мРНК Toll-подібних рецепторів, NF-kB, цитокінів, хемокінів, IFN-стимульованих генів. На додаток, ОРН-D-M перешкоджає утворенню гемаглютинін-гліканової взаємодії та зменшує цитопатичний ефект вірусу грипу H1N1 [9,189].

У клінічній практиці показано ефективність застосування комбінації ОРН-D-M і препарату на основі есенціальних фосфоліпідів у лікуванні неалкогольного стеатогепатиту, сполученого з синдромом хронічної втоми. А саме, було показано, що комплексне лікування нормалізувало підвищені рівні циркулюючих імунних комплексів і дисбаланс їхнього фракційного складу [190]. Застосування комплексної терапії сприяло практично повній нормалізації показників, які характеризують активність процесів ліпопероксидації, що проявлялося зменшенням у сироватці крові концентрації дієнових кон'югатів і

малонового диальдегіду, а також зниженням до норми показника перекисного гемолізу еритроцитів [191]. Комплексна терапія ОРН-D-M і есенціальними фосфоліпідами призводила до нормалізації інтерферонового статусу організму при неалкогольному стеатогепатиті [13].

ОРН-D-M є ефективним при монотерапевтичному лікуванні хронічних вірусних гепатитів В і С з низьким рівнем вірусного навантаження ($\leq 800\ 000$ МО/л). Застосування ОРН-D-M призводить до суттєвого зниження вірусного навантаження (у 79% пацієнтів) або відсутності вірусу (у 11 % пацієнтів). На додаток, монотерапевтичне застосування ОРН-D-M нормалізує активність макрофагальної фагоцитуючої системи, що призводить до прискорення досягнення стійкої клініко-біохімічної ремісії хронічної патології печінки [192]. Комплексне лікування хронічного вірусного гепатиту С комплексом ОРН-D-M та $\alpha-2\beta$ рекомбінантним інтерфероном сприяє ліквідації Т-лімфопенії, підвищенню рівню циркулюючих $CD4^+$ -лімфоцитів, нормалізації імунорегуляторного індексу $CD4/CD8$, що свідчить про оптимізацію співвідношення кількості Т-клітин з Т-хелперною та Т-супресорною активністю [12].

Експериментальні дані широкого спектру біологічної активності комплексу ОРН-D-M свідчать про доцільність його вивчення в якості гепатопротекторного препарату, що може бути провідним напрямком у корекції патологічних станів печінки. Враховуючи патогенез гепатотоксичності, доцільним буде комплексне вивчення патологічних процесів печінки та дії ОРН-D-M на молекулярному, морфологічному та біохімічному рівнях організації тканини. Тому, нами висунуто робочу гіпотезу дослідження потенційної гепатопротекторної дії комплексу ОРН-D-M при токсичному ураженні печінки. Відповідно до літературних даних та попередніх досліджень нашої лабораторії ми припускаємо можливість системної гепатопротекторної дії ОРН-D-M шляхом нормалізації показників ураження печінки, оксидативного стресу та

антиоксидантної системи, яка захищатиме паренхіму печінки від пошкодження при гепатотоксичній дії ТАА. Наше припущення системної дії даного препарату включає можливість ОРН-D-M нормалізувати запалення та блокувати розвиток фібротичних процесів. В рамках нашої гіпотези ми припускаємо також здатність комплексу впливати на регенерацію печінки при її токсичному ураженні. Така мультитаргетна дія потенційних препаратів на різні системи захисту печінки є основною метою створення сучасних гепатопротекторів. Ми припускаємо, що на молекулярному рівні об'єктами такої гепатопротекторної дії ОРН-D-M є цитокіни, хемокіни, ростові фактори і фактори транскрипції. Схематично нашу гіпотезу представлено на рис. 1.8.

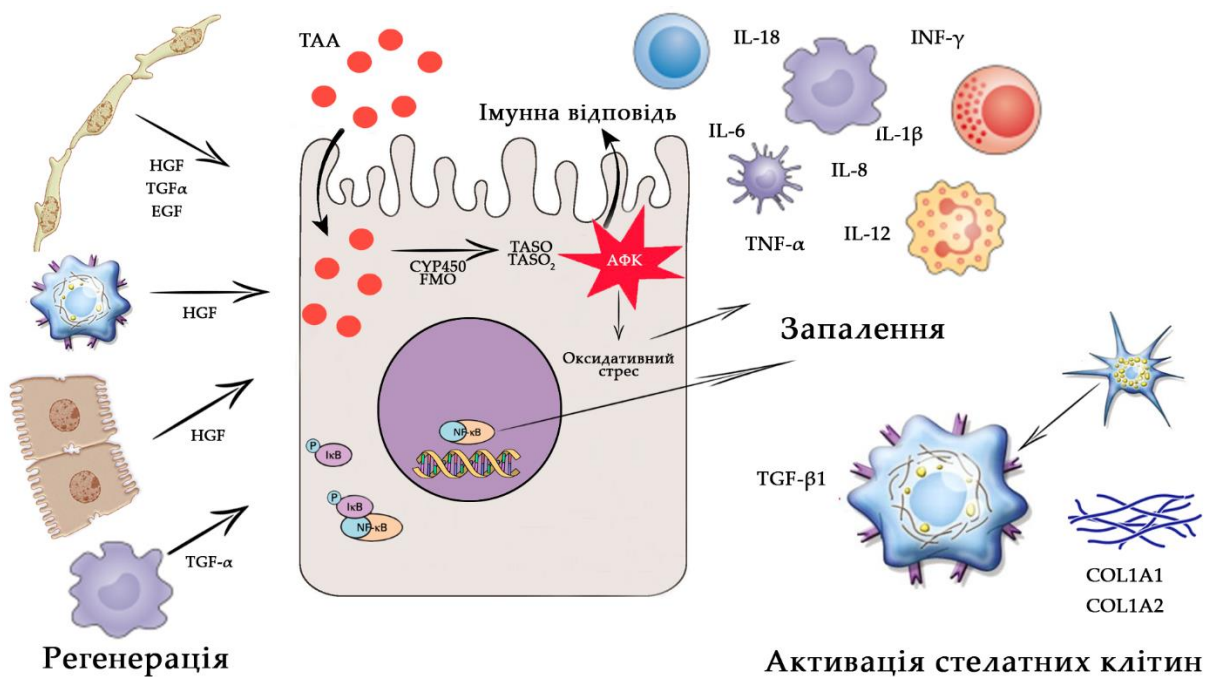


Рис. 1.8. Схема робочої гіпотези дослідження гепатопротекторної дії комплексу ОРН-D-M при токсичному ураженні печінки

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт дослідження

Об'єктом досліджень була печінка після її гострого та хронічного ТАА-індукованого ураження. У досліджах використовували мишей (самок) лінії C57 BL6/J із початковою масою 18-22 г і віком 2-2,5 місяці.

Експериментальні дослідження проводилися на базі віварію Інституту молекулярної біології та генетики НАН України (ІМБіГ) відповідно до вимог комісії з біоетики ІМБіГу (Federalwide Assurance № 00019663 та протокол № 16 від 3 грудня 2018 року). 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).

2.2. Реактиви та обладнання, використані в роботі

Використані реактиви. Під час дослідження було використано гепатотоксин – ТАА; кислоти – трихлороцтова, тіобарбітурова, хлоридна, 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойна, метафосфатна, ортофосфатна, етилендіамінтетраоцтова (EDTA); солі – калію фосфат одно- та двозаміщений, натрію фосфат двозаміщений, KCl, NaCl, азид натрію; пероксид водню, бромід гексадецилтриметламонію, о-діанізид дигідрохлорид, трис-HCl, 2,4-динітрофенілгідразин, етанол, етилацетат, сечовина, відновлений глутатіон, 1-хлор-2,4-динітробензол, гідроксид натрію, гідроксид калію.

Для дослідження активності ензимів (АлАТ, АсАТ, ГГТ) у сироватці крові було використано стандартні набори НВП «Філісіт-Діагностика» (Дніпро).

Для виділення РНК застосували набір «NucleoMag® RNA» (MACHEREY-NAGEL, Німеччина).

Для електрофорезу використовували: RNA reagent kit for MultiNA (SHIMADZU, Німеччина), барвник для забарвлення нуклеїнових кислот SYBR Green II RNA gel stain (Life Technologies, США), маркер молекулярних мас РНК (Life Technologies, США), деіонізовану воду вільну від РНКаз, реагент RNaseZap RNase Decontamination Solution (Thermo Scientific, США).

Для проведення реакції зворотної транскрипції було застосовано набір «Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific, США).

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі використовували «maxima SYBR Green/Fluorescein PCR master mix» (Thermo Scientific, США), ген-специфічні праймери та деіонізовану воду вільну від РНКаз.

Під час дослідження також застосовували наступне обладнання:

- рН-метр Orion™ Versa Star Pro™ рН/LogR™ (Thermo Scientific, США);
- Шейкер Vortex V-1 plus (Biosan, Латвія);
- Магнітна мішалка Thermo Cimatec Magnetic Stirrer (Thermo Scientific, США);
- Центрифуги MicroCL 17 Centrifuge, Eppendorf™ Minispin™ Benchtop Centrifuge (Thermo Scientific, США);
- Термостат Dry block thermostat TDB-120 (Biosan, Латвія);
- Світловий мікроскоп Olympus C011 (Olympus, Японія);
- Спектрофотометр SPECORD 200/210/250 PLUS (Analytik Jena, Німеччина);
- Система BeadRetriever system (Invitrogen, Фінляндія);
- MaestroNano Pro Micro-Volume MN-913 spectrophotometer (MAESTROGEN, Тайвань);

- обладнання для електрофорезу Microchip electrophoresis system (MCE-202/MultiNA SHIMADZU, Німеччина);
- Thermal Cycler CFX96 Real-Time system (BIO-RAD, Сінгапур);

2.3. Моделювання токсичних уражень печінки

В експерименті використано 2 моделі гепатотоксичності: гостре та хронічне ураження печінки. Тварини залучалися в експеримент після проходження карантину та акліматизації (вологість 50-70%, 12-годинний цикл світла/темряви, вільний доступ до їжі та води).

2.3.1. Скринінгове дослідження потенційної протекторної активності комплексу ОРН-D-M. З метою виявлення найбільш ефективної концентрації ОРН-D-M було проведено скринінгові дослідження потенційної гепатопротекторної активності комплексу ОРН-D-M у концентраційній залежності 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 мг/кг маси тіла тварин в умовах гострої гепатотоксичності.

Гостру гепатотоксичність індукували однократним інтраперитонеальним введенням ТАА у дозі 500 мг/кг маси тіла тварини [193].

На початку дослідження тварини були поділені на групи (n=6):

- група I – NaCl – тварини, які отримували фізіологічний розчин (0,4 % NaCl) кожні 12 годин на протязі 48 годин;
- група II – ТАА – тварини, яким вводили однократно внутрішньочеревно розчин ТАА у дозі 500 мг/кг маси тіла;
- група III – ОРН-D-M 10 – тварини, яким вводили однократно внутрішньочеревно розчин ТАА у дозі 500 мг/кг маси тіла та ОРН-D-M у дозі 10 мг/кг кожні 12 годин на протязі 48 годин;

- група IV – ОРН-D-M 25 – тварини, яким вводили однократно внутрішньочеревно розчин ТАА у дозі 500 мг/кг маси тіла та ОРН-D-M у дозі 25 мг/кг кожні 12 годин на протязі 48 годин;
- група V – ОРН-D-M 50 – тварини, яким вводили однократно внутрішньочеревно розчин ТАА у дозі 500 мг/кг маси тіла та ОРН-D-M у дозі 50 мг/кг кожні 12 годин на протязі 48 годин;
- група VI – ОРН-D-M 100 – тварини, яким вводили однократно внутрішньочеревно розчин ТАА у дозі 500 мг/кг маси тіла та ОРН-D-M у дозі 100 мг/кг кожні 12 годин на протязі 48 годин;
- група VII – ОРН-D-M 150 – тварини, яким вводили однократно внутрішньочеревно розчин ТАА у дозі 500 мг/кг маси тіла та ОРН-D-M у дозі 150 мг/кг кожні 12 годин на протязі 48 годин;
- група VIII – ОРН-D-M 200 – тварини, яким вводили однократно внутрішньочеревно розчин ТАА у дозі 500 мг/кг маси тіла та ОРН-D-M у дозі 200 мг/кг кожні 12 годин на протязі 48 годин;
- група IX – ОРН-D-M 250 – тварини, яким вводили однократно внутрішньочеревно розчин ТАА у дозі 500 мг/кг маси тіла та ОРН-D-M у дозі 250 мг/кг кожні 12 годин на протязі 48 годин;
- група X – ОРН-D-M 300 – тварини, яким вводили однократно внутрішньочеревно розчин ТАА у дозі 500 мг/кг маси тіла та ОРН-D-M у дозі 300 мг/кг кожні 12 годин на протязі 48 годин.

Через 48 годин після введення гепатотоксину тварин піддавали анестезії за дії кетаміну/ксилазину (100/15 мг/кг відповідно), проводили забір крові через нижню порожнисту вену та видаляли печінку. Сироватку крові отримували шляхом центрифугування при 2000 g протягом 15 хв.

2.3.2. Гостра ТАА-індукована гепатотоксичність. Гостру гепатотоксичність індукували згідно методики [193]. Дослідні групи становили тварини, які отримували лікування комплексом ОРН-D-M (200 мг/кг), ОРН (143 мг/кг) та D-M кожні 12 годин.

На початку дослідження тварини були поділені на групи (n=12):

- група I – NaCl – тварини, які отримували фізіологічний розчин (0,4 % NaCl) кожні 12 годин на протязі 48 годин;
- група II – ТАА – тварини, яким вводили однократно внутрішньочеревно розчин ТАА у дозі 500 мг/кг маси тіла;
- група III – ОРН-D-M – тварини, яким вводили ОРН-D-M у дозі 200 мг/кг кожні 12 годин на протязі 48 годин;
- група IV – ОРН-D-M 0 год – тварини, яким вводили однократно внутрішньочеревно розчин ТАА у дозі 500 мг/кг маси тіла та ОРН-D-M у дозі 200 мг/кг кожні 12 годин (починаючи з моменту введення гепатотоксину) на протязі 48 годин;
- група V – ОРН 0 год – тварини, яким вводили однократно внутрішньочеревно розчин ТАА у дозі 500 мг/кг маси тіла та ОРН у дозі 143 мг/кг кожні 12 годин (починаючи з моменту введення гепатотоксину) на протязі 48 годин;
- група VI – D-M 0 год – тварини, яким вводили однократно внутрішньочеревно розчин ТАА у дозі 500 мг/кг маси тіла та D-M у дозі 57 мг/кг кожні 12 годин (починаючи з моменту введення гепатотоксину) на протязі 48 годин;
- група VII – ОРН-D-M 12 год – тварини, яким вводили однократно внутрішньочеревно розчин ТАА у дозі 500 мг/кг маси тіла та ОРН-D-M у дозі 200 мг/кг через 12 годин після введення ТАА кожні 12 годин на протязі 48 годин;

- група VIII – ОРН 12 год – тварини, яким вводили однократно внутрішньочеревно розчин ТАА у дозі 500 мг/кг маси тіла та ОРН у дозі 143 мг/кг через 12 годин після введення ТАА кожні 12 годин на протязі 48 годин;
- група IX – D-M 12 год – тварини, яким вводили однократно внутрішньочеревно розчин ТАА у дозі 500 мг/кг маси тіла та D-M у дозі 57 мг/кг через 12 годин після введення ТАА кожні 12 годин на протязі 48 годин.

Через 48 годин після введення гепатотоксину тварин піддавали анестезії за дії кетаміну/ксилазину (100/15 мг/кг відповідно), проводили забір крові через нижню порожнисту вену та видаляли печінку. Сироватку крові отримували шляхом центрифугування при 2000 g протягом 15 хв.

2.3.3. Хронічна ТАА-індукована гепатотоксичність.

Для моделювання хронічного токсичного ураження застосовували модель ТАА-індукованого хронічного ураження печінки [161].

Після 1 тижня акліматизації тварини були поділені на 5 груп (n=12):

- група I – NaCl – тварини, які внутрішньочеревно отримували 0,4% розчин NaCl тричі на тиждень протягом 8 тижнів;
- група II – ТАА – тварини, які отримували внутрішньочеревно розчин ТАА у дозі 150 мг/кг маси тіла мишей тричі на тиждень упродовж 8 тижнів;
- група III – ОРН-D-M – тварини, які отримували щоденно ОРН-D-M (*per os*) у дозі 200 мг/кг маси тіла протягом 8 тижнів;
- група IV – ОРН-D-M 0 т – тварини, які отримували внутрішньочеревно розчин ТАА у дозі 150 мг/кг маси тіла мишей тричі на тиждень упродовж 8 тижнів і щоденно ОРН-D-M (*per os*) у дозі 200 мг/кг маси тіла протягом 8 тижнів;
- група V – ОРН-D-M 4 т – тварини, які отримували внутрішньочеревно розчин ТАА у дозі 150 мг/кг маси тіла мишей тричі на тиждень протягом 8 тижнів і

через 4 тижні після початку експерименту щоденне лікування ОРН-D-M (*per os*) у дозі 200 мг/кг маси тіла до кінця експерименту.

Через 3 дні після останнього введення токсину тварин піддавали анестезії за дії кетаміну/ксилазину (100/15 мг/кг відповідно), проводили забір крові через нижню порожнисту вену та видаляли печінку. Сироватку крові отримували шляхом центрифугування при 2000 g протягом 15 хв.

2.4. Методи досліджень

2.4.1. Гістологічна оцінка токсичного ураження печінки. Після евтаназії тварин печінку вирізали, промивали в фізіологічному розчині від залишків крові та фіксували у 10% водному розчині нейтрального формаліну. Після фіксації відібраний матеріал промивали водопровідною водою та зневоднювали у водних розчинах етилового спирту зростаючої концентрації. Після зневоднення шматочки матеріалу спочатку переносили у суміш абсолютного спирту і ксилолу (1:1) на 1 год, а згодом — у чистий ксилол. Отриманий матеріал ущільнювали парафіном і виготовляли гістологічні зрізи завтовшки 4 μm , які забарвлювали гематоксиліном-еозином. Зафарбовані та імпрегновані зрізи оцінювали на наявність запальної інфільтрації, дистрофічних змін, некрозу, поліморфізму ядер за допомогою світлового мікроскопа. Зрізи розглядали при $\times 400$ збільшенні, при якому могла бути проаналізована загальна морфологічна картина та фотографували за допомогою CCD-камери.

Для дослідження наявності компонентів позаклітинного матриксу зрізи печінки, отримані відповідно вище описаної методики, фарбували методом Маллорі з використанням анілінового синього у комбінації з кислим фуксином і оранж G [194]. На одержаних гістопрепаратах оцінювали зміни морфології сполучної тканини в паренхімі печінки. Площу сполучної тканини в

досліджуваних зрізах визначали за допомогою мікроскопа та вимірювальної сітки, яка входить до його комплексу.

2.4.2. Дослідження цілісності мембран гепатоцитів. Активність ферментів АлАТ і АсАТ у сироватці крові визначали методом Райтмана-Френкеля [195] за допомогою стандартних біохімічних наборів.

Для визначення ГГТ активності як біохімічного маркера ураження паренхіми печінки використовували стандартний набір для визначення активності ферменту в сироватці крові.

2.4.3. Оцінка запальної інфільтрації та оксидативної деструкції біомолекул паренхіми печінки. Мієлопероксидазну (МПО) активність як показник інфільтрації паренхіми нейтрофілами, проводили шляхом визначення H_2O_2 -залежного окислення о-діанізид дигідрохлориду. Для цього печінку гомогенізували в калій фосфатному буфері (рН 7,4) та центрифугували при 15 000 g протягом 15 хв при 4°C. Отриманий осад знову промивали в калій фосфатному буфері (рН 6,0), що містив у своєму складі 0,5% бромід гексадецилтриметламонію і інкубували протягом 2-х годин при 60°C. Після інкубації отримані зразки піддавали трьом циклам заморожування-розморожування й обробляли ультразвуком протягом 10 хв. Отримані зразки центрифугували при 15 000 g при 4°C протягом 15 хв. Супернатант (300 мкл) змішували з 300 мкл о-діанізид дигідрохлориду (10 мг/мл калій фосфатного буфера), 300 мкл 0,3% H_2O_2 . Зміну адсорбції вимірювали при довжині хвилі 405 нм. МПО активність виражали у $\Delta D/\text{хв}/\text{мг}$ протеїну (де ΔD – зміна поглинання за хв нормована на концентрацію протеїну у дослідній пробі) [196].

Для визначення вмісту ТБК-активних продуктів (продукти пероксидного окислення ліпідів, що реагують із тіобарбітуровою кислотою(ТБК)) печінку гомогенізували в 50 мМ калій фосфатному буфері (рН 7,4). У гомогенат вносили

розчин трихлороцтової кислоти (20%) та буферний розчин трис-НСІ (рН 7,4) і центрифугували (4 000 g, 10 хв); для дослідження використовували надосадову рідину. Реакційна суміш містила 2 мл зразку та 1 мл розчину тіобарбітурової кислоти. Інкубацію проводили протягом 15 хв при 95-100°C. До контрольної проби замість надосадової рідини додавали буферний розчин трис-НСІ (рН 7,4). Адсорбцію дослідних проб вимірювали проти контрольної проби при довжині хвилі 532 нм. Рівень ТБК-активних сполук виражали у нмоль/мг протеїну [197].

Для визначення вмісту протеїнових карбонільних груп до 0,1 мл гомогенату вносили розчин трихлороцтової кислоти (20%). У дослідні проби додавали 1 мл 0,1 М розчину 2,4-динітрофенілгідразину. Водночас контрольні проби містили 1 мл 2М НСІ. Інкубацію проводили 1,5 год при 37°C і потім центрифугували (3 000 g, 10 хв). Отриманий осад промивали розчином етанол-етилацетату (1:1). До нього додавали 3 мл 8М сечовини й витримували на водяній бані до розчинення. Адсорбцію дослідних проб вимірювали проти контрольних при довжині хвилі 370 нм. Рівень протеїнових карбонільних груп виражали у нмоль/мг протеїну [198].

Для визначення вмісту протеїнових SH-груп до 0,1 мл гомогенату вносили 1 мл розчину трихлороцтової кислоти (20 %) та центрифугували (3 000 g, 10 хв). До осаду додавали 2 мл 0,3 М НСІО₄ (з 5 мМ ЕДТА) та центрифугували 10 хв при 3 000 g. До цього осаду додавали 5 мл 8М сечовини та 3 мл 5 мМ ЕДТА в 50 мМ КН₂РО₄ (рН 7,4) та інкубували на киплячій водяній бані до розчинення з наступним центрифугуванням 10 хв при 3 000 g. До надосадової рідини додавали 0,02 мл реактиву Елмана (5,5'-дитіобіс-(2-нітробензойної) кислоти), у контрольні проби – 0,02 мл дистильованої води та вимірювали адсорбцію дослідних проб проти контрольних при 412 нм. Рівень протеїнових SH-груп виражали у нмоль/мг протеїну [199].

Для визначення вмісту відновленого глутатіону до 1 мл гомогенату додавали 150 мкл осаджуючого реактиву, який містив 0,2 М НРО₃, 6 М ЕДТА та

5 М NaCl. Проби витримували 5 хв і центрифугували (3 000 g, 15 хв). До супернатанта вносили 2 мл 0,3 М Na₂HPO₄ та 0,25 мл реактиву Елмана. Вміст відновленого глутатіону визначали за калібрувальною кривою величини оптичної густини, яку будували шляхом вимірювання робочих розчинів відновленого глутатіону (від 0,1 мМ до 5 мМ). Адсорбцію дослідних проб вимірювали проти контрольної при довжині хвилі 420 нм. Рівень відновленого глутатіону виражали у ммоль/мг протеїну [200].

Концентрацію протеїну в гомогенатах печінки визначали за допомогою методу Лоурі [201].

2.4.4. Оцінка антиоксидантної ланки захисту клітин. Для визначення активності глутатіон-S-трансферази тканину печінки перфузували 37°C розчином Хенкса без EDTA (5,36 мМ NaHCO₃, 0,41 мМ MgCl·H₂O, 0,49 мМ KH₂PO₄, 0,41 мМ MgSO₄·7H₂O, 0,137 мМ NaCl, 0,44 мМ KCl, 0,3 мМ Na₂HPO₄·7H₂O, рН 7,4) для видалення крові із судин та гомогенізували в 0,1 М трис-НСl (рН 7,5) з наступним центрифугуванням при 20 000 g протягом години при 4 °С для отримання цитозольної фракції. 1 мл робочої суміші містив 0,98 мл 0,125 М калій фосфатного буферу (рН 7,4), 0,01 мл 0,1 М 1-хлор-2,4-динітробензолу та 0,01 мл 0,1 М відновленого глутатіону. Активність ферменту оцінювали за зростанням оптичної густини протягом 3 хв при 340 нм і виражали у ΔD/хв/мг протеїну [202].

Оцінку активності глутатіонпероксидази виконували згідно методики [203]. Для цього перфузовану тканину печінки гомогенізували в 0,1 М трис-НСl (рН 7,5) з наступним центрифугуванням при 20 000 g протягом години при 4°C для отримання цитозольної фракції. Отриманий супернатант преінкубували з розчином NaN₃ і відновленого глутатіону при 37 °С протягом 5 хв і додавали H₂O₂ з наступною інкубацією протягом 45 с. Реакцію зупиняли розчином трихлороцтової кислоти, потім суміш центрифугували 10 хв при 3 000 g. До

отриманого супернатанта додавали розчин 5,5'-дитіо-біс-(2-нітробензойної) кислоти та через 7,5 хв вимірювали оптичну густину при 412 нм і розраховували активність ферменту у нмоль GSH/хв/мг протеїну.

Концентрацію протеїну в гомогенатах печінки визначали за допомогою методу Лоурі [201].

2.4.5. Дослідження експресії мРНК прозапальних, профіброзних генів і ростових факторів. Для виділення РНК із печінки 20 мг тканини розтирали в рідкому азоті до стану порошку. Виділення РНК здійснювали з використанням NucleoMag 96 RNA Kit. Для цього гомогенізовані зразки лізували за допомогою лізуючого буферу MR1+TCEP з наступним центрифугуванням при 11 600 g протягом 15 хв при 4°C. Отримані супернатанти переносили в чисті мікропробірки, додавали магнітні частинки NucleoMag® B-Beads і буфер MR2, піпетували та інкубували при кімнатній температурі протягом 5 хв та центрифугували протягом 2 хв при 2 000 g.

Після центрифугування до осаду додавали буферний розчин, який містив ДНКазу I, інкубували зразки 15 хв при кімнатній температурі. Після цього зразки підлягали серії промивок і елюції в приладі BeadRetriever system. Виділену тотальну РНК відбирали в стерильні пробірки, вільні від РНКаз, і заморожували при -80°C.

Кількість виділеної РНК і наявність у ній домішків білків і вуглеводів вимірювали за оптичною густиною розчинів при 260 нм і за співвідношенням A260/A280 за допомогою спектрофотометра MaestroNano Pro Micro-Volume MN-913. Цілісність РНК визначали за співвідношенням інтенсивності смуг 28S/18S рРНК на електрофореграмі, після капілярного електрофорезу на приладі Microchip electrophoresis system із використанням RNA reagent kit for MultiNA. Зразки тотальної РНК із інтенсивністю смуг 28S – 4700 пн. і 18S – 1900 пн. надалі були використані в наступних дослідженнях.

Синтез кДНК проводили з використанням RevertAid H Minus First Standart cDNA Synthesis Kit. Суміш для реакції зворотної транскрипції містила 2 мкг тотальної РНК у 20 мкл, 100 пмоль випадкових праймерів і Oligo (dT)18. Реакція зворотної транскрипції проходила з наступними параметрами реакції: 42°C – 60 хв, 70°C – 5 хв, після чого реакцію охолоджували на льоду. Отриману кДНК аліквотували й заморожували при -80°C.

Полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (ПЛР-РЧ) проводили на приладі Thermal Cycler CFX96 Real-Time system із використанням програмного забезпечення BioRad CFX Manager. Реакційна суміш містила: 0,3 мкл кДНК відповідного зразка, 10 мкл maxima SYBR Green/Fluorescein PCR master mix, 1,5 мкл ген-специфічного праймера та 8,2 мкл води, очищеної від нуклеаз. Ампліфікацію проводили при режимі: спочатку 95°C - 10 хв, потім 39 циклів: 95°C - 40 с, 60°C - 30 с, 72°C - 30 с. Для нормалізації експресії мРНК використовували ген «домашнього господарства» *Gapdh*. Для розрахунку відносної експресії використовувати метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Дизайн специфічних олігонуклеотидних праймерів проводили за допомогою програми Primer Express (Applied Biosystem). Аналіз нуклеотидних послідовностей проводили з використанням комплекту програми BLAST. Послідовність праймерів, які було використано в реакції ПЛР-РЧ, наведено в Таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Нуклеотидні послідовності праймерів, які використовувались для досліджень змін експресії генів

П6	F 5'-GTC ACA GAA GGA GTG GC -3' R 5'-CTG ACC ACA GTG AGG AA-3'
----	---

продовження Таблиця 2.1.

<i>Tnfa</i>	F 5'-CCT CCC TCT CAT CAG TTC TA-3' R 5'-CTT TGA GAT CCA TGC CG-3'
<i>Nfkb1</i>	F 5'-GGA CAT GGG ATT TCA GGA TAA CC-3' R 5'-AGA GGT GTC TGA TAC AGG TCA T-3'
<i>Nfkbia</i>	F 5'-GAG ACT CGT TCC TGC ACT TG-3' R 5'-AAG TGG AGT GGA GTC TGC TG-3'
<i>Tgfb1</i>	F 5'-GGC TAC CAT GCC AAC TT-3' R 5'-ACC CAC GTA GTA GAC GA-3'
<i>Colla1</i>	F 5'-CCT CAG AAG AAC TGG TAC ATC A-3' R 5'-GGC CTC GGT GGA CAT TA-3'
<i>Acta 2</i>	F 5'-TCT GGC ACC ACT CTT TCT ATA AC-3' R 5'-TAG CCA CAT ACA TGG CGG-3'
<i>Hgf</i>	F 5'-AAA TGA GAA TGG TTC TTG GTG-3' R 5'-CTG GCC TCT TCT ATG GCT-3'
<i>Tgfa</i>	F 5'-CCA TCA GTC TAC CCT TTG C-3' R 5'-GGA GAA GGT ACA CAG CG-3'
<i>Egf</i>	F 5'-CGG ACA GCT ACA CGG AAT G-3' R 5'-CGA GGC AGA CAC AAA TAA CCC-3'
<i>Gapdh</i>	F 5'-TCA ACA GCA ACT CCC ACT CTT CCA-3' R 5'-ACC CTG TTG CTG TAG CCG TAT TCA-3'

2.5. Статистичний аналіз

Аналіз 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.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Скринінгове дослідження потенційної гепатопротекторної дії ОРН-D-M при гострій гепатотоксичності

Метою експериментів, описаних в даному підрозділі, було провести скринінгове дослідження гепатопротекторної дії ОРН-D-M і визначити найбільш ефективну за антиоксидантною дією дозу комплексу для перорального введення тваринам, яку в подальшому планувалось використовувати у дослідженнях при гострій гепатотоксичності.

У результаті проведеного первинного фармакологічного скринінгу встановлено, що комплекс ОРН-D-M знижує показники ураження паренхіми печінки та оксидативного стресу при гострій гепатотоксичності та має дозозалежний характер (Таблиця 3.1).

Таблиця 3.1

Підбір дози для перорального введення ОРН-D-M при ТАА-індукованій гепатотоксичності

Групи	АлАТ, МО/л	АсАТ, МО/л	ГГТ, МО/л	ТБК- активні продукти, нмоль/мг протеїну	Відновле- ний глутатіон, ммоль/мг протеїну
NaCl	74,7±7,7	69,9±5,6	2,5±0,4	14,4±2,5	2,5±0,4
ТАА	704,2±47,3*	236,0±8,4*	9,3±0,5*	55,1±8,3*	0,34±0,03*

продовження Таблиця 3.1

ОРН-D-M 10	689,5±43,1*	211,1±7,6*	9,5±0,2*	52,6±5,0*	0,35±0,06*
ОРН-D-M 25	657,1±54,9*	193,1±9,9*	9,0±0,3*	50,6±6,2*	0,42±0,04*
ОРН-D-M 50	533,2±27,1*#	180,0±10,3*#	8,4±0,5*#	41,7±2,4*#	0,51±0,03*#
ОРН-D-M 100	480,4±31,5*#	162,9±10,9*#	7,1±0,4*#	35,6±4,5*#	0,57±0,09*#
ОРН-D-M 150	359,2±27,1*#	130,0±10,0*#	6,2±0,6*#	29,5±2,9*#	0,66±0,08*#
ОРН-D-M 200	276,4±16,3*#	109,7±11,1*#	5,1±0,4*#	23,2±3,5*#	0,83±0,05*#
ОРН-D-M 250	265,7±14,4*#	99,2±4,5*#	6,4±0,3*#	24,7±2,1*#	0,87±0,06*#
ОРН-D-M 300	270,1±10,1*#	101,5±6,9*#	5,5±0,3*#	22,5±1,7*#	0,84±0,03*#

Примітка. Дані наведені як середнє \pm SD. * – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи NaCl; # – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи ТАА.

На основі отриманих біохімічних досліджень у групі NaCl змін не було виявлено, тоді як у групі ТАА спостерігали значне підвищення активності маркерних печінкових ферментів – АлАТ, АсАТ і ГГТ у 9, 4 та 4 раза порівняно з групою NaCl. Крім того, у групі ТАА спостерігався розвиток оксидативного пошкодження біомолекул, про що нам свідчать високі рівні ТБК-активних продуктів (активні продукти, які реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБК)) і зниження рівня відновленого глутатіону.

При порівнянні ефекту різних доз ОРН-D-M при ТАА-індукованій гепатотоксичності потрібно зазначити, що найменшу гепатопротекторну дію проявляв комплекс в концентрації 50 мг/кг маси тіла тварин. Лікування

ОРН-D-M в дозах 10 та 25 мг/кг маси тіла тварин при пероральному застосуванні не проявляло захисного ефекту на моделі гострої гепатотоксичності.

Найменші значення токсичного ураження печінки порівняно з усіма групами лікування спостерігали в разі терапевтичного застосування ОРН-D-M у дозах 150, 200, 250 та 300 мг/кг маси тіла тварин. Комплекс у дозі 150, 200, 250, 300 мг/кг маси тіла тварин знижував АлАТ активність у сироватці крові тварин на 49, 61, 62 та 62 % порівняно з групою ТАА. Крім того, лікування препаратом у дозах 150, 200, 250 та 300 мг/кг маси тіла тварин ефективно знижувало показники активності АсАТ і ГГТ порівняно з групою ТАА. Аналогічна тенденція спостерігалася щодо зниження оксидативного стресу за умов лікування комплексом в концентраціях 150, 200, 250, 300 мг/кг маси тіла тварин.

Варто зауважити, що у групах лікування ОРН-D-M 200, ОРН-D-M 250 та ОРН-D-M 300 показники маркерних ферментів і оксидативного стресу статистично достовірно не відрізнялися між собою. Наступне збільшення концентрації комплексом до 250 та 300 мг/кг маси тіла тварин не призводило до додаткового підвищення гепатопротекторної дії, яке б статистично достовірно відрізнялося від отриманих результатів при дослідженнях дози 200 мг/кг маси тіла тварин.

Таким чином, результати проведених досліджень показали, що найбільш ефективною лікувальною дозою ОРН-D-M є доза 200 мг/кг маси тіла тварин при введенні якої спостерігалось значне зниження показників ураження паренхіми печінки та показників оксидативного стресу при гострому токсичному ураженні печінки.

Отримані дані обґрунтовують доцільність дослідження гепатопротекторної дії ОРН-D-M у дозі 200 мг/кг маси тіла тварин.

3.2. Дослідження впливу комплексу ОРН-D-M на морфологічні зміни та показники ураження паренхіми при гострій гепатотоксичності

Метою роботи, представленої в даному підрозділі, було встановлення морфофункціональних змін паренхіми печінки мишей при гострій ТАА-індукованій гепатотоксичності на фоні застосування ОРН-D-M.

У здорових тварин стан внутрішніх органів був у межах норми, хоча мали місце незначні зміни, обумовлені способом виведення тварин із експерименту. Як видно з макрофотографії (рис. 3.1) печінка усіх мишей групи NaCl мала гладку поверхню темно-бордового кольору. Паренхіму печінки складала гепатоцити, які розташовувались у вигляді балок, які йдуть у радіальному напрямку до центральної вени. Між гепатоцитами в тому ж напрямку розміщувались кровоносні капіляри.

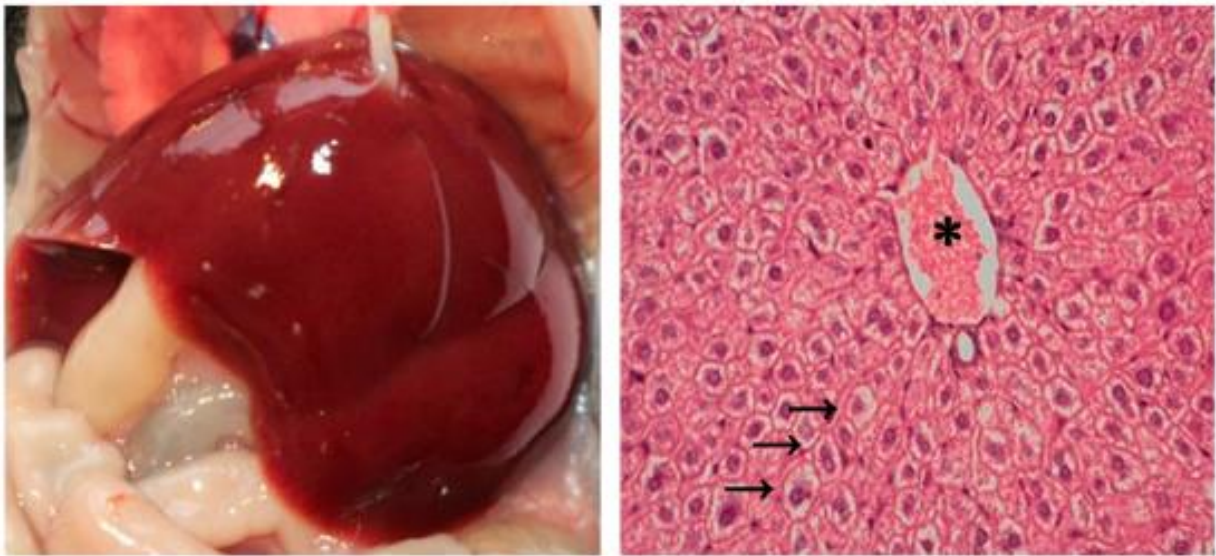


Рис. 3.1. Макрофотографії та приклади гістологічних препаратів фрагментів печінки здорових тварин (група NaCl). Гепатоцити, розташовані у вигляді балки (→), центральна вена (*). Забарвлення гематоксиліном та еозином, х400

У тварин групи ТАА патологічні зміни були досить значними. Морфологія печінки була змінена порівняно з групою NaCl (рис. 3.2). Зокрема, у всіх тварин даної групи колір органу був блідий, спостерігалась вузлувата та шорстка поверхня. У деяких тварин спостерігались значні крововиливи у центрально-лобулярній зоні. На гістологічних зрізах нами виявлено великі осередки білково-гідропічної дистрофії цитоплазми з переходом у лізис і некроз паренхімних клітин, значні крововиливи, дифузно-осередкова запальна інфільтрація в області портальних трактів мононуклеарами (лімфоцитами, макрофагами) і явища пілефлебиту. Частина гепатоцитів візуалізувалась у вигляді гомогенної еозинофільної маси з явищами каріолізису, що є морфологічним індикатором загальнопатологічного процесу некрозу. Також спостерігалася активація клітин Купфера та центрально-лобулярний некроз (рис. 3.2).

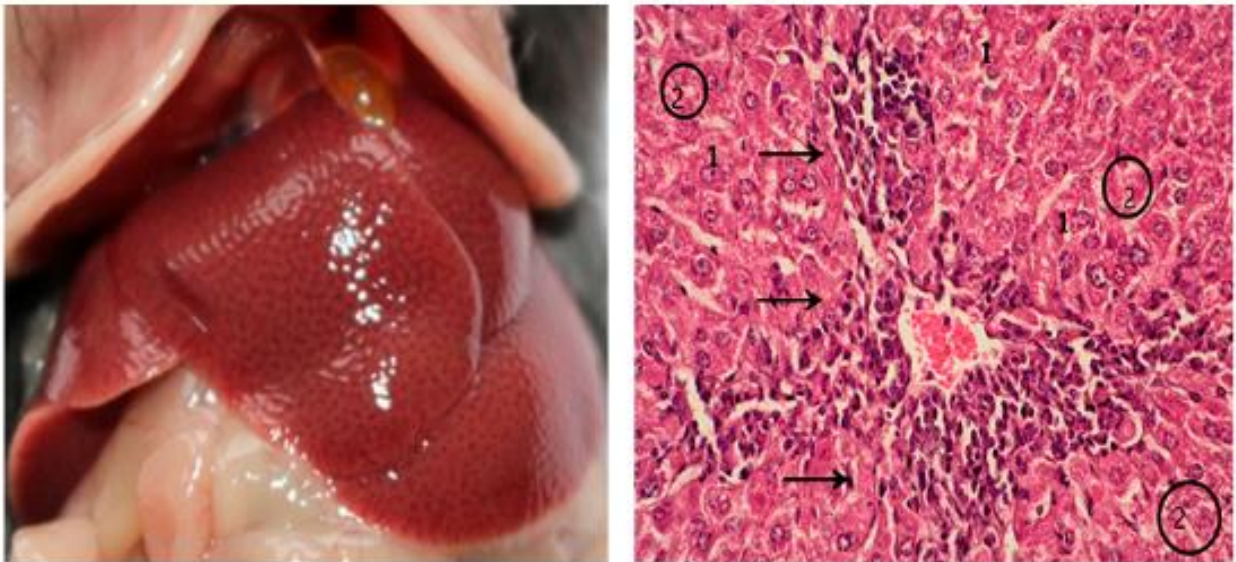


Рис. 3.2. Макрофотографії та приклади гістологічних препаратів фрагментів печінки тварин групи ТАА. Інфільтрація паренхіми клітинами імунної системи (→), білково-гідропічна дистрофія (1), гепатоцити у вигляді гомогенної еозинофільної маси з явищами каріолізису (2). Забарвлення гематоксиліном та еозином, x400

При застосуванні комплексу ОРН-D-M у дозі 200 мг/кг з лікувальною метою спостерігалось зменшення ТAA-індукованої гепатотоксичності. 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 NaCl, проте колір печінки був дещо блідіший порівняно з групою здорових тварин. Гістологічні дослідження печінки даної групи тварин показали зменшення некротичних і апоптотичних ділянок зі збереженою архітектурою паренхіми печінки та відсутністю центрально-лобулярного некрозу (рис. 3.3). Проте, у більшості тварин даної групи спостерігалась незначна лімфогістіоцитарна інфільтрація (<15 клітин у полі зору) в центрально-лобулярній зоні.

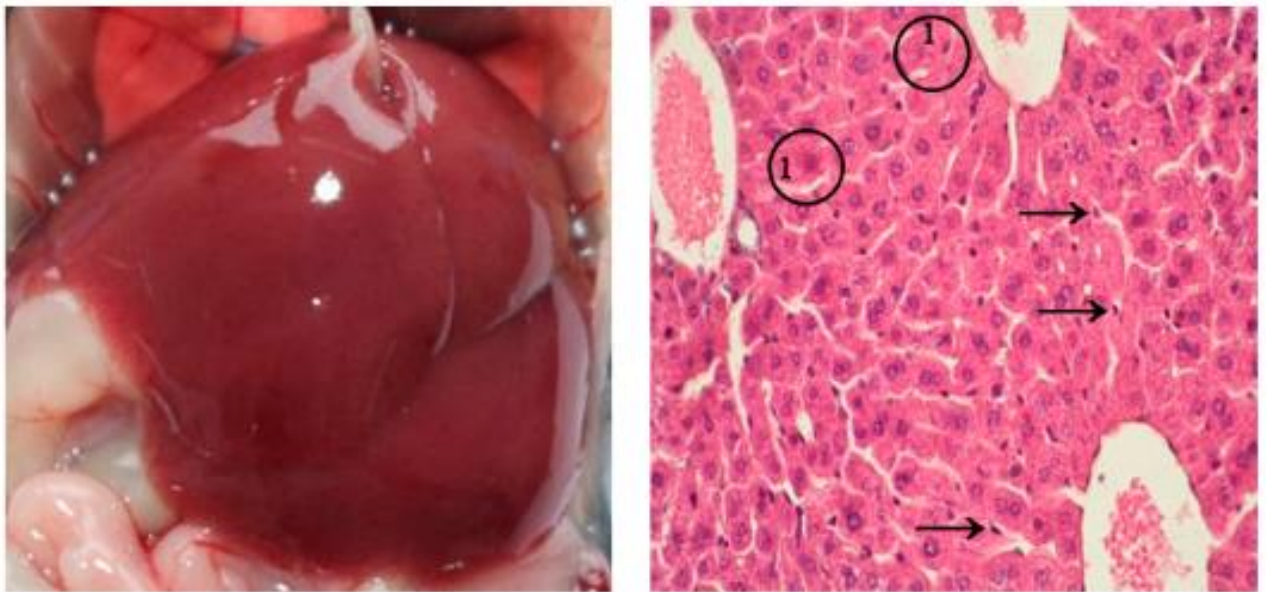


Рис. 3.3. Макрофотографії та приклади гістологічних препаратів фрагментів печінки тварин групи лікування ОРН-D-M. Інфільтрація паренхіми клітинами імунної системи (→), білково-гідропічна дистрофія (1) . Забарвлення гематоксиліном та еозином, x400

В групі контролю препарату стан печінки був без виражених паталогічних змін і не відрізнявся від здорових мишей (рис. 3.4). Морфологічний стан печінки тварин даної групи був аналогічний як у групі NaCl, орган був червоно-бордового кольору із гладенькою поверхнею. Гістологічні препарати теж не відрізнялись від групи здорових тварин. Це свідчить про те, що комплекс є нетоксичним та не викликає змін в паренхімі печінки при їх застосуванні у дозі 200 мг/кг маси тіла тварин [204].

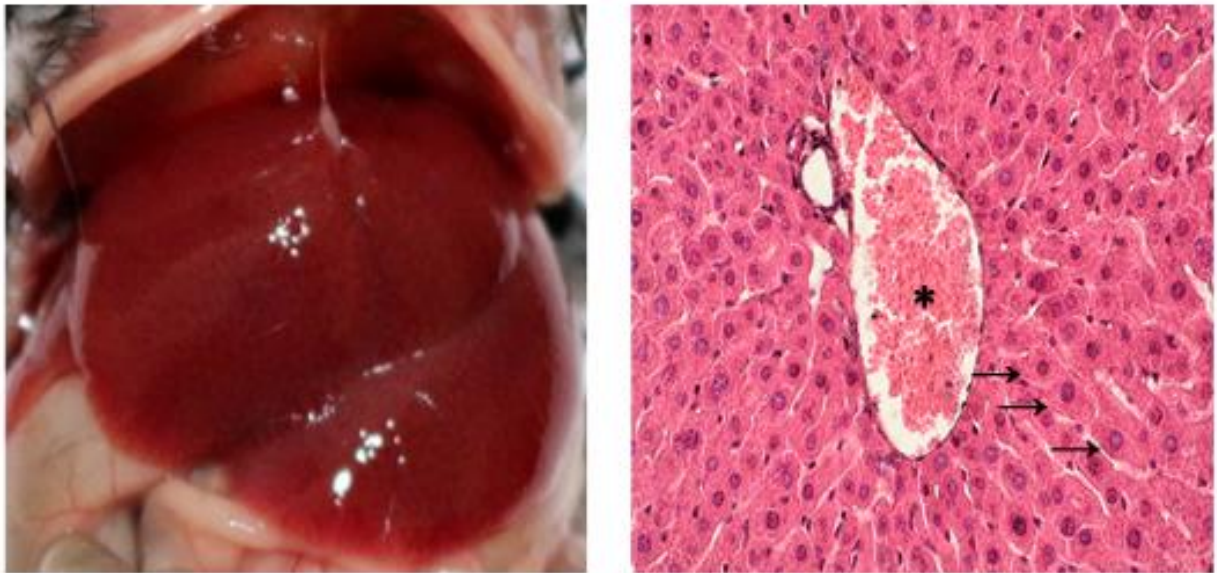


Рис. 3.4. Макрофотографії та приклади гістологічних препаратів фрагментів печінки тварин групи контролю ОРН-D-M. Гепатоцити, розташовані у вигляді балки (→), центральна вена (*). Забарвлення гематоксиліном та еозином, x400

Гостре токсичне ураження печінки характеризується порушенням структури клітинних мембран гепатоцитів, що призводить до витоку цитозольних ферментів в позаклітинний простір [159]. Тому, активність цитозольних та трансмембранних печінкових ферментів у сироватці крові, таких як аланінамінотрансферази (АлАТ) та γ -глутамілтранспептидази (ГГТ), мають

важливе значення для ідентифікації ураження печінки, цілісності мембран гепатоцитів та ступеня пошкодження клітин печінки.

Результати проведених досліджень показали, що у сироватці крові мишей, які отримували гепатотоксин активність АлАТ і ГГТ зросла у 8 та 6 разів, порівняно з показниками тварин групи NaCl (рис. 3.5). Це свідчить про значне пошкодження та некроз клітин печінки, зміни стану ліпідного шару мембран та вираженість цитолітичного синдрому.

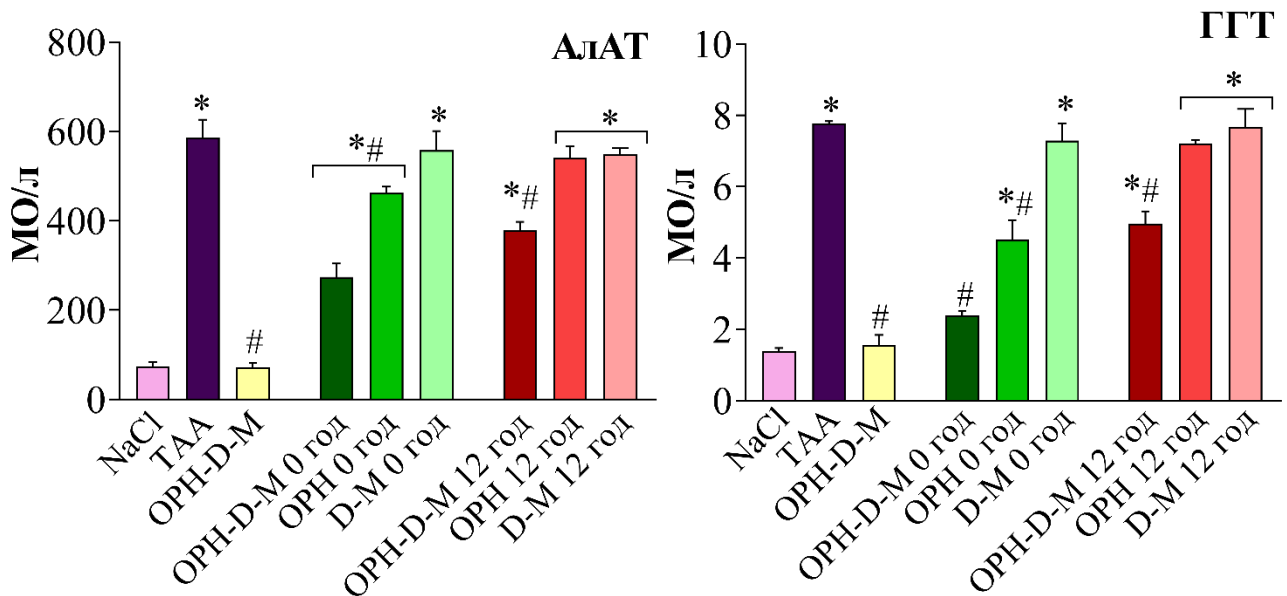


Рис. 3.5. АлАТ і ГГТ активності у сироватці крові мишей через 48 годин після застосування ТАА та лікувального впливу ОРН-D-M, ОРН та D-M через 12 годинні інтервали при їх застосуванні від початку дослідження (0 год) та через 12 год після застосування ТАА (12 год). Дані наведені як середнє \pm SD. * – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи NaCl; # – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи ТАА

Застосування ОРН-D-M як від початку дослідження (одночасно із введенням ТАА), так і через 12 год після індукції гострої гепатотоксичності, сприяє зменшенню активності АлАТ на 53 та 36 % порівняно з групою тварин,

що отримувала ТАА. Також показано, що комплекс ефективно знижує активність ГГТ у сироватці крові обох досліджуваних груп тварин (рис. 3.5) [204,205].

Цікаво, що ОРН від початку дослідження (ОРН 0 год) так само ефективно знижують рівні активності АлАТ і ГГТ на 21 та 43 % порівняно з групою тварин, яка отримувала ТАА. Варто зауважити, що показники в обох групах D-M і ОРН 12 год статистично достовірно ($p < 0,05$) не відрізняються від показників тварин, що отримували лише гепатотоксин [179,206].

Зважаючи на отримані дані, можна припустити, що комплекс ОРН-D-M здатний зменшувати розвиток центрально-лобулярного некрозу та вираженість патологічних змін біохімічних показників цитолізу печінки у сироватці крові мишей при гострій ТАА-індукованій гепатотоксичності.

Оскільки чинником до розвитку патологічних змін у печінці є оксидативний стрес, то проведені дослідження зумовили необхідність вивчення рівня показників оксидативного стресу та антиоксидантної активності при гострій гепатотоксичності, що і поклало основу наступного підрозділу.

3.3. Дослідження показників оксидативного стресу та антиоксидантної системи при гострій гепатотоксичності

Основним фактором, що впливає на розвиток гострої ТАА-індукованої гепатотоксичності, є ксенобіотична біотрансформація гепатотоксину, яка призводить до утворення реакційноздатних інтермедіатів ТАА – сульфоксиду (TASO), діоксиду (TASO₂) та АФК [207].

Токсичні інтермедіати ТАА та АФК за прооксидантним вільнорадикальним механізмом призводять до окислювального пошкодження ліпідів і білків [160]. Тому наступні дослідження стосувалися вивчення впливу природних ОРН та їх комплексу з D-манітолом на інтенсивність генерації

продуктів оксидативної деградації при гострій гепатотоксичності та активності ферментів антиоксидантної ланки захисту.

Оцінку оксидативної деструкції біомолекул проводили на основі визначення вмісту продуктів пероксидного окислення ліпідів (ТБК-активних продуктів), протеїнових карбонільних груп і протеїнових SH-груп у тканині печінки.

Як видно з рис. 3.6, гостра ТАА-індукована гепатотоксичність характеризувалася підвищеними рівнями ТБК-активних продуктів і протеїнових карбонільних груп у 6 та 4 рази порівняно з групою тварин NaCl. Введення ОРН-D-M з лікувальною метою призводило до зменшення вільнорадикального пошкодження біополімерів печінки. У групах 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) рівень ТБК-активних сполук зменшувався на 65 та 32 % порівняно з групою, що отримувала токсин. Крім того, застосування ОРН від початку ініціації гепатотоксичності (група ОРН 0 год) також знижувало рівень пероксидного окислення ліпідів на 23% порівняно з групою тварин ТАА. В той же час, показники у групах D-M (D-M 0 год та D-M 12 год) статистично достовірно не відрізнялись від показників групи токсину.

Білкові молекули також виступають мішенями для атаки АФК та реакційними метаболітами ТАА, що призводить до зміни конформації молекул, втрати їх функціональної активності, фрагментації та внутрішньоклітинної деградації. Результати наших досліджень показали, що у групі ТАА показник протеїнових карбонільних груп (показник окислювальної модифікації білків) був підвищений у 4 рази порівняно з групою здорових тварин (рис. 3.6). На протипагу цьому, у групах тварин ОРН-D-M 0 год та ОРН-D-M 12 год цей показник знижувався на 52 та 28 % порівняно з групою ТАА. Аналогічна тенденція зниження рівня протеїнових карбонільних груп спостерігалась у групах

лікування ОРН 0 год та ОРН 12 год. І навпаки, у групах тварин D-M 0 год та D-M 12 год рівень цього показника не відрізнявся від групи ТАА [179,205,206].

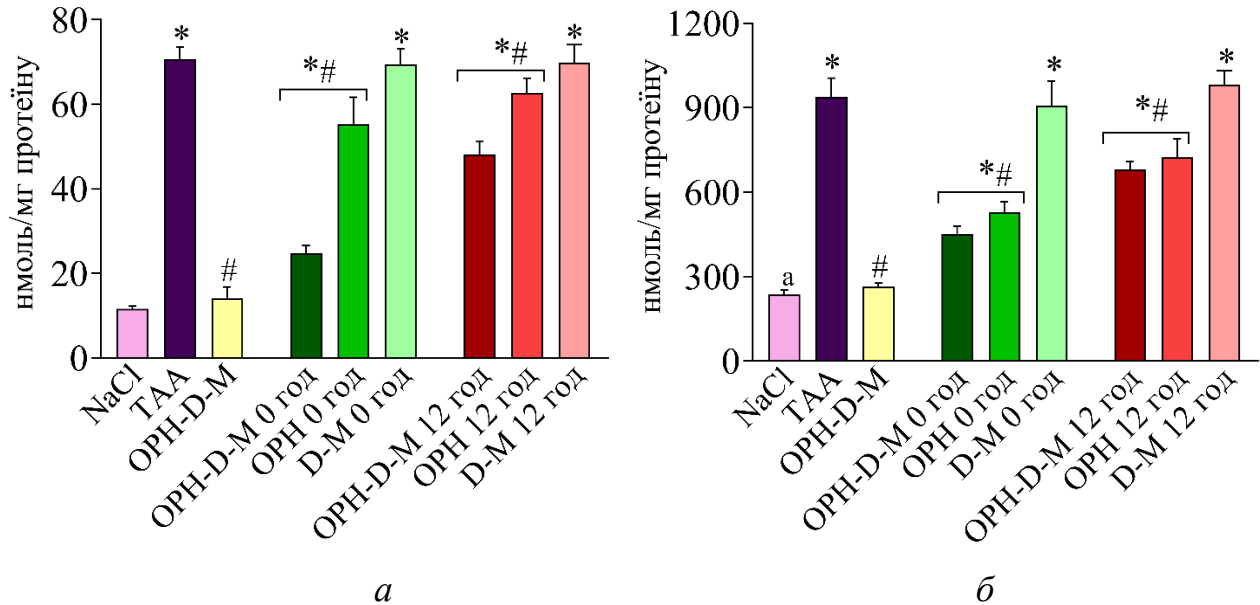


Рис. 3.6. Рівні ТБК-активних продуктів (а) та протеїнових карбонільних груп (б) у печінці мишей через 48 годин після застосування ТАА та лікувального впливу ОРН-D-M, ОРН та D-M через 12 годинні інтервали при їх застосуванні від початку дослідження (0 год) та через 12 год після застосування ТАА (12 год). Дані наведені як середнє \pm SD. * – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи NaCl; # – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи ТАА

Велика кількість білків та ферментів у своєму складі містять SH-групи, які розміщуються у функціональних (регуляторних, каталітичних або зв'язуючих) ділянках білків, і їх протонна лабільність робить їх високо реакційноздатними не лише для широкого спектру біологічних взаємодій, але й по відношенню до дії АФК, АФН та реакційноздатних інтермедіатів ТАА [208,209].

У наших дослідженнях окисдаивний стрес, який розвивався за дії ТАА призводив до зниження рівня протеїнових SH груп у 12 разів порівняно з групою

здорових тварин (рис. 3.7). Проте, через 48 годин після введення токсину у тварин групи ОРН-D-M 0 год та ОРН-D-M 12 год спостерігалось зростання рівня протеїнових тіолових груп у 6 та 5 разів, проте показники не поверталися до рівня контрольних величин. Імовірно, це пов'язано з тим, що SH-групи виступають акцепторами, які здатні перехоплювати електрони і тому вони є найчутливішими до дії гепатотоксину. Цікавим є те, що у групах тварин, які отримували лікування ОРН (основна складова комплексу) не проявлялось аналогічного ефекту, що свідчить про те, що ОРН є ефективними лише у комплексі з D-M [206].

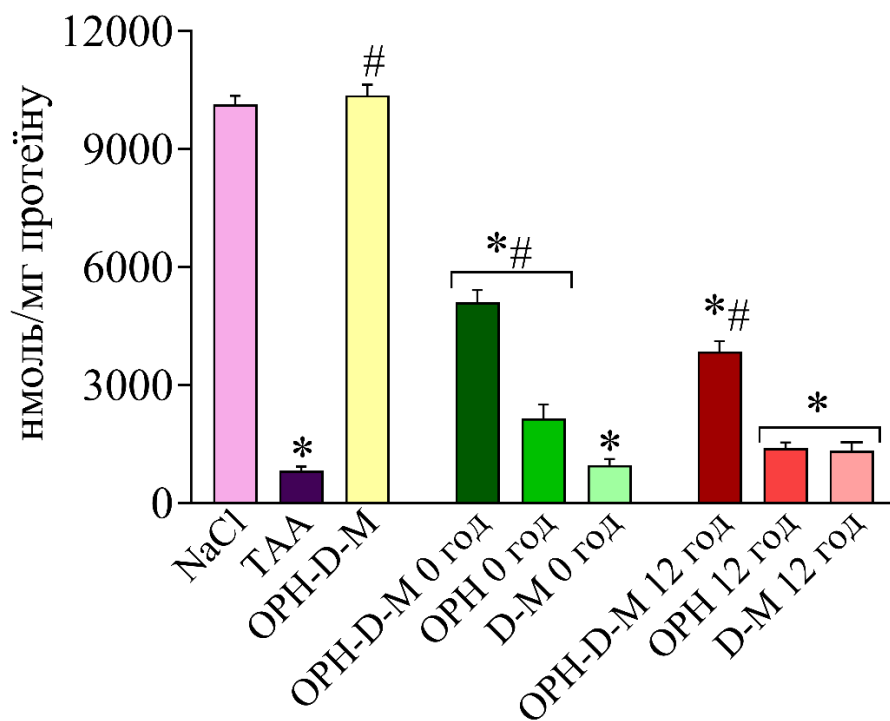


Рис. 3.7. Рівень протеїнових SH-груп у печінці мишей через 48 годин після застосування ТАА та лікувального впливу ОРН-D-M, ОРН та D-M через 12 годинні інтервали при їх застосуванні від початку дослідження (0 год) та через 12 год після застосування ТАА (12 год). Дані наведені як середнє \pm SD. * – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи NaCl; # – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи ТАА

Отже, на основі проведених досліджень встановлено, що комплекс ОРН-D-M здатний ефективно послаблювати ліпідне та протеїнове окислення компонентів гепатоцитів, про що свідчать знижені рівні продуктів пероксидного окислення ліпідів і білків при ТАА-індукованій гепатотоксичності.

Відомо, що для боротьби з окислювальним стресом і підтриманням належного відновлення середовища печінка добре забезпечена антиоксидантними механізмами. Функціональну основу системи антиоксидантного захисту формує глутатіонова система, складовими елементами якої є власне ферменти та відновлений глутатіон які каталізують реакції його зворотнього перетворення (окиснення ↔ відновлення). Зазвичай, в гепатоцитах концентрації відновленого глутатіону високі для підтримання окислювально-відновлювального гомеостазу клітини. Відновлений глутатіон також важливий для збереження цілісності структури та функцій біомолекул. Тому, наступним етапом наших досліджень було визначення вмісту цієї молекули у гомогенатах печінки.

ТАА-індукована гепатотоксичність характеризувалася зниженням вмісту відновленого глутатіону в паренхімі печінки на 70 % порівняно з групою тварин NaCl. Це свідчить про виснаження пулу відновленого глутатіону в клітинах печінки та інтенсивне вільнорадикальне пошкодження біополімерів гепатоцитів за дії АФК та метаболітів ТАА. Водночас, застосування комплексу ОРН-D-M з лікувальною метою як від початку дослідження (група ОРН-D-M 0 год) так і через 12 год після індукції гепатотоксичності (група ОРН-D-M 12 год), підвищували знижені рівні антиоксиданту на 98 та 69 % порівняно з групою токсину (рис. 3.8). Варто зауважити, що лікування ОРН від початку дослідження (група ОРН 0 год) також підвищувало рівень відновленого глутатіону на 39 % порівняно з групою тварин, що отримувала ТАА [179,205].

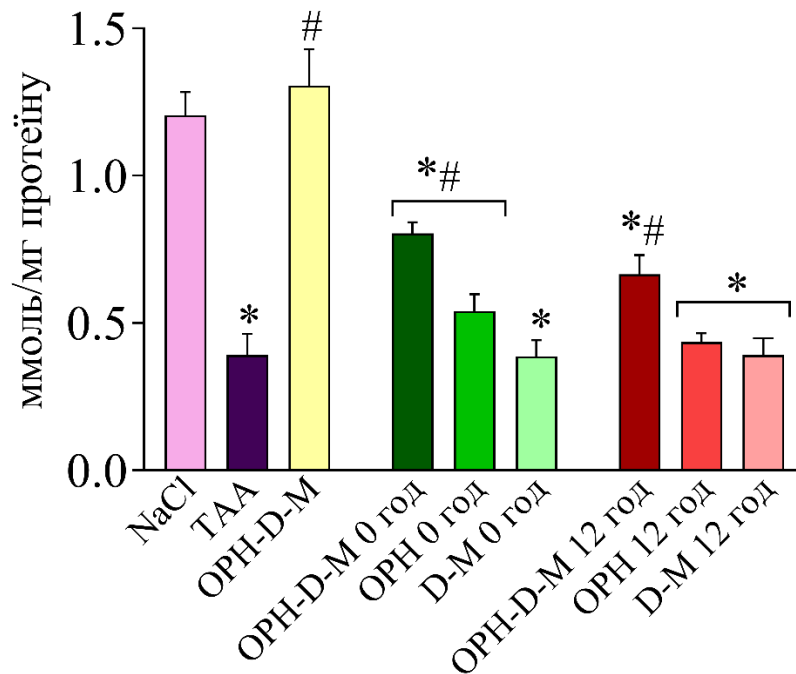


Рис. 3.8. Вміст відновленого глутатіону в печінці мишей через 48 годин після застосування ТАА та лікувального впливу ОРН-D-M, ОРН та D-M через 12 годинні інтервали при їх застосуванні від початку дослідження (0 год) та через 12 год після застосування ТАА (12 год). Дані наведені як середнє \pm SD. * – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи NaCl; # – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи ТАА

Наступним етапом нашої роботи було дослідження активності ферментів глутатіонової системи антиоксидантної ланки захисту, зокрема глутатіонпероксидази та глутатіон-S-трансферази.

Глутатіонпероксидаза (ЕС 1.11.1.9, ГП) – важливий фермент класу оксидоредуктаз, який задіяний у клітинній системі захисту для знешкодження пероксидів і гідропероксидів. Як складова глутатіонового циклу, ГП захищає печінку від метаболітів пероксидного окислення ліпідів. У свою чергу, глутатіон-S-трансфераза (ЕС 2.5.1.18, ГТ) має каталітичну активність, що забезпечує кон'югацію відновленого глутатіону з реакційноздатними хімічними метаболітами, які утворились у I фазі детоксикації ксенобіотиків.

Результати проведеного дослідження наведені у Таблиці 3.2. Показано, що через 48 год після ТАА-індукованої інтоксикації спостерігалось зниження активності як ГП, так і ГТ на 47 та 44 % порівняно з групою здорових тварин. Проте, знижена каталітична активність ГТ була значно підвищена у групах ОРН-D-M 0 год, ОРН-D-M 12 год та ОРН 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 антиоксидантних ферментів при гострій інтоксикації мишей ТАА.[204,206].

Таблиця 3.2

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 *#

продовження Таблиця 3.2

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. Дані наведені як середнє ± SD. * – 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 проти гепатотоксичності, проте молекулярні механізми їхньої дії залишаються не з'ясовані. Тому, згідно робочої гіпотези наступні наші дослідження були направлені на пошук потенційного механізму дії ОРН-D-M при гепатотоксичності.

3.4. 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 [76]. Раніше було показано, що

комплекс ОРН-D-M має вплив на цитокіновий профіль при цукровому діабеті II типу [210], тому ми припустили, що він може зменшувати запалення у моделі гострої гепатотоксичності.

Тому, було досліджено рівні відносної експресії прозапальних генів *Il6* та *Tnfa* за допомогою ПЛР-РЧ. Як показано на рис. 3.9 на 48 год після введення гепатотоксину спостерігалось значне підвищення рівнів відносної експресії генів *Tnfa* та *Il6* у паренхіми печінки мишей у 29 та 3 рази порівняно зі здоровою групою тварин.

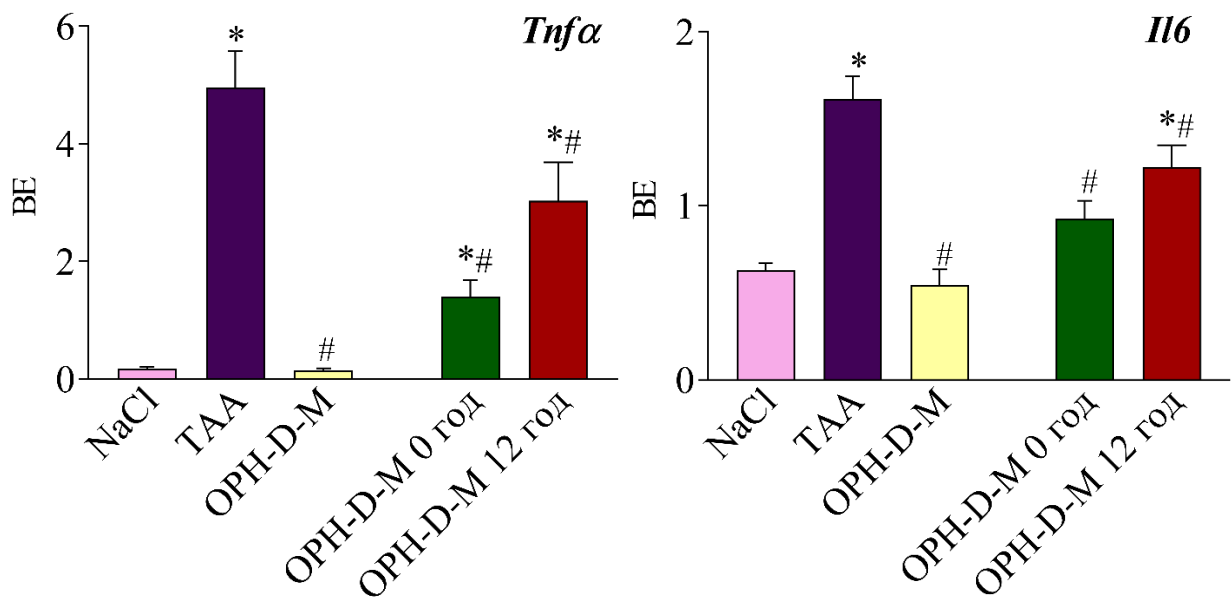


Рис. 3.9. Рівні відносної експресії генів *Tnfa* та *Il6* через 48 годин після застосування ТАА та лікувального впливу ОРН-D-M через 12 годинні інтервали при їх застосуванні від початку дослідження (0 год) та через 12 год після застосування ТАА (12 год). Дані наведені як середнє \pm SD. * – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи NaCl; # – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи ТАА

На противагу цьому, за умов введення піддослідним тваринам комплексу ОРН-D-M, починаючи з 0 год та через 12 год після введення гепатотоксину,

відмічалось зниження рівня відносної експресії гена *Tnfa* на 72 та 39 % порівняно з групою тварин, що отримувала ТАА. Також спостерігалася аналогічна тенденція зниження досліджуваного показника *Il6*. Застосування ОРН-D-M з лікувальною метою сприяло достовірному зниженню рівня відносної експресії прозапального цитокіну *Il6* на 64 та 53 % починаючи лікування з 0 год та через 12 год, порівняно з показниками групи ТАА (рис. 3.9) [205,206,211].

Відомо, що при гострій ТАА-індукованій гепатотоксичності підвищується рівень відносної експресії транскрипційного фактору *Nfkb1* [212], який контролює експресію цитокінів (у тому числі *Tnfa* та *Il6*), хемокінів та прооксидантних генів. Тому ми припустили, що ОРН-D-M реалізує свій гепатопротекторний потенціал саме через вплив на рівень відносної експресії *Nfkb1*.

Нами було досліджено рівні відносної експресії генів *Nfkb1* і *Nfkbia* та показано, що при гострому токсичному ураженні, викликаному ТАА, спостерігалось значне підвищення рівнів відносної експресії *Nfkb1* і *Nfkbia* у 12 та 6 разів відповідно ($p < 0,05$) порівняно з групою тварин NaCl (рис. 3.10). 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) сприяло зниженню рівня відносної експресії гену *Nfkb1* на 51 та 27 % порівняно з групою ТАА. Аналогічна тенденція спостерігалася 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 гепатотоксин. Варто зауважити, що введення ОРН-D-M здоровим тваринам не призводило до зміни профілів відносної експресії досліджуваних генів (рис. 3.10) [204].

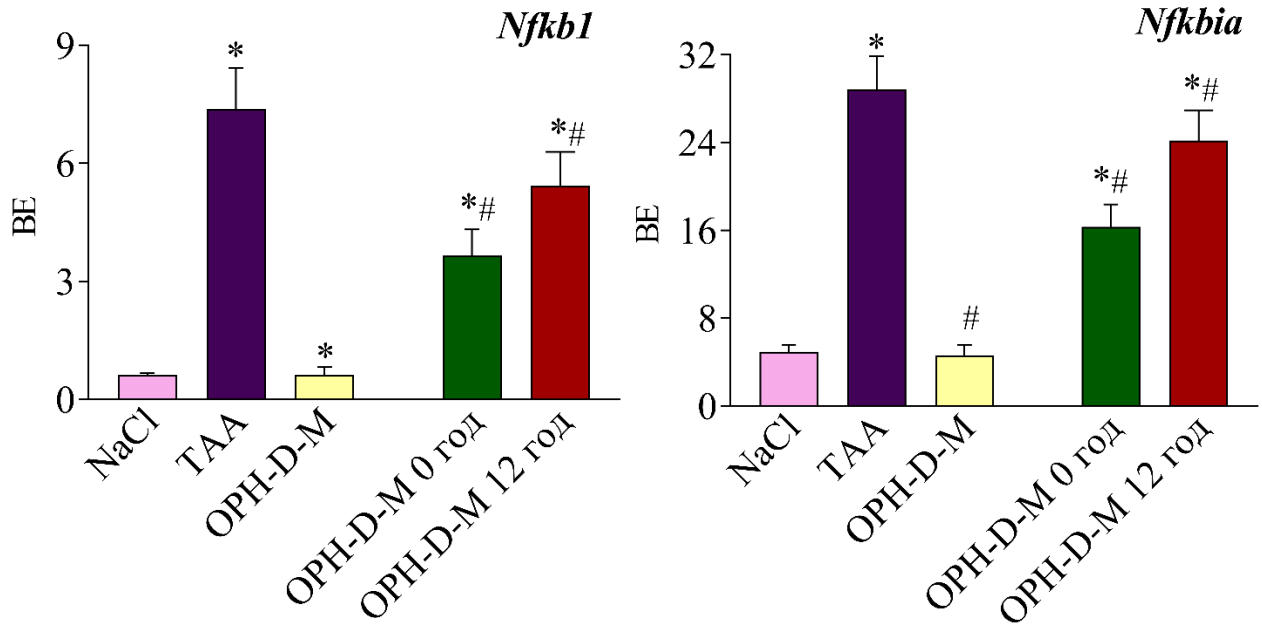


Рис. 3.10. Рівні відносної експресії генів *Nfkb1* та *Nfkbia* через 48 годин після застосування ТАА та лікувального впливу ОРН-D-M через 12 годинні інтервали при їх застосуванні від початку дослідження (0 год) та через 12 год після застосування ТАА (12 год). Дані наведені як середнє \pm SD. * – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи NaCl; # – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи ТАА

З метою підтвердження нашого припущення щодо дії препарату на ланку запалення, додатково проведено дослідження визначення рівня мієлопероксидазної (МПО) активності як маркерної молекули рекрутованих нейтрофілів у паренхіму печінки. Результати проведених досліджень показано на рис. 3.11.

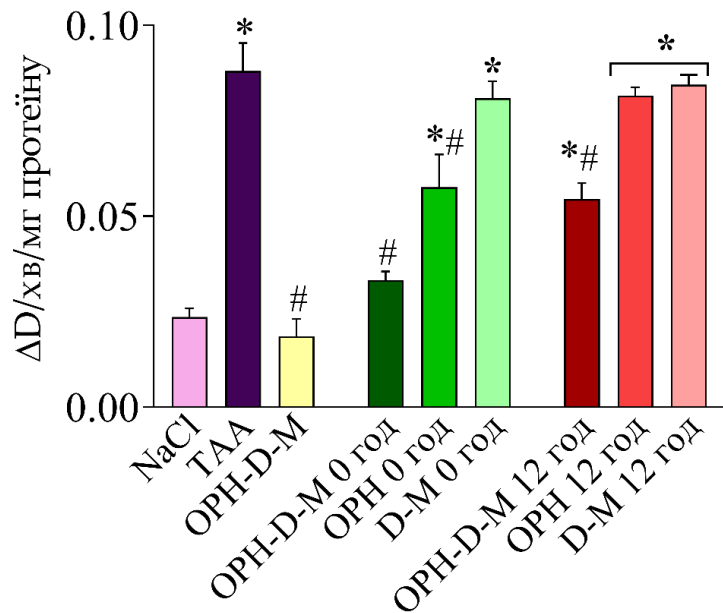


Рис. 3.11. Рівень мієлопероксидазної активності в паренхімі печінки мишей через 48 годин після застосування ТАА та лікувального впливу ОРН-D-M, ОРН та D-M через 12 годинні інтервали при їх застосуванні від початку дослідження (0 год) та через 12 год після застосування ТАА (12 год). Дані наведені як середнє \pm SD. * – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи NaCl; # – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи ТАА

Було встановлено, що ТАА значно ($p < 0,05$) підвищував МПО активність – у 4 рази, порівняно зі здоровою групою тварин. У той же час, у групах ОРН-D-M 0 год, ОРН-D-M 12 год та ОРН 0 год виявлено зниження рівня МПО активності на 58, 39 та 35 %, порівняно з групою тварин, яка отримувала ТАА. Варто зауважити, що в групах ОРН 12 год, D-M 0 год та D-M 12 год рівень МПО активності не відрізнявся від цього показника у групі ТАА.

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 та гістопатологічними дослідженнями [205,206,213].

3.5. Вплив комплексу ОРН-D-M на активацію стелатних клітин печінки при гострій гепатотоксичності

Гостра гепатотоксичність характеризується активацією стелатних клітин печінки та ремоделюванням позаклітинного матриксу, тому дослідження впливу комплексу ОРН-D-M на рівні відносної експресії генів *Acta 2*, *Tgfβ1* та *Colla1* є важливими для розуміння можливого механізму дії препарату.

Як показано на рис. 3.12 на 48 год після введення ТАА спостерігався значний рівень відносної експресії гена *Acta 2* в 60 разів порівняно з групою здорових тварин. 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 провагу 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. Крім того, застосування ТАА сприяло значному підвищенню рівня відносної експресії гена *Colla1* у 28 разів порівняно з групою тварин NaCl (рис. 3.12). У свою чергу, в 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 отримували гепатотоксин.

Також, нами було досліджено рівень відносної експресії ключового профіброгенного цитокіну – *Tgfβ1*. У нашому дослідженні ми виявили збільшення рівня відносної експресії гена *Tgfβ1* у 15 разів в печінці тварин, що отримували лише ТАА порівняно з групою здорових тварин (рис. 3.12). На противагу, у групах ОРН-D-M 0 год та ОРН-D-M 12 год рівень відносної експресії *Tgfβ1* був значно нижчий – на 57 та 28 % порівняно з групою ТАА [204,205,211].

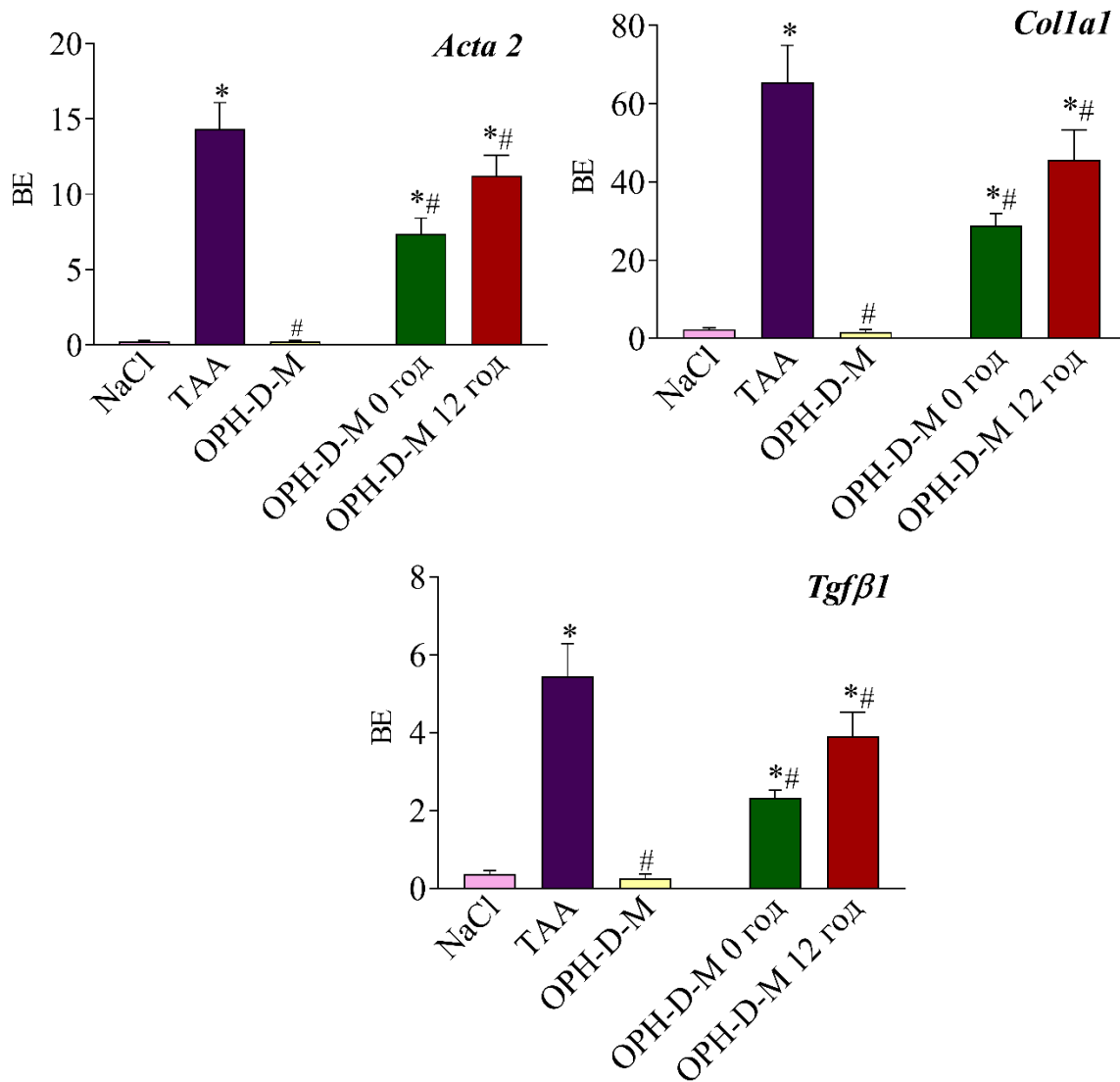


Рис. 3.12. Рівні відносної експресії генів *Acta 2*, *Tgfβ1* та *Colla1* через 48 годин після застосування ТАА та лікувального впливу ОРН-D-M через 12 годинні інтервали при їх застосуванні від початку дослідження (0 год) та через 12 год після застосування ТАА (12 год). Дані наведені як середнє \pm SD. * – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи NaCl; # – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи ТАА

3.6. Вивчення експресії основних мітогенів печінки при ТАА-індукованій гепатотоксичності за дії ОРН-D-M

Ще однією групою досліджених нами генів, були гени, які кодують основні мітогени – гепатоцитарний ростовий фактор (*Hgf*), трансформуючий ростовий фактор α (*Tgfa*) та епідермальний ростовий фактор (*Egf*), які залучені у регенерації печінки. Ми припустили, що комплекс ОРН-D-M може підвищувати рівні експресії основних мітогенів і таким чином реалізувати свою гепатопротекторну дію.

Результати зміни рівнів відносної експресії генів *Hgf*, *Tgfa* та *Egf* при гострій гепатотоксичності зображено на рис. 3.13. Показано, що при ТАА-індукованій гепатотоксичності спостерігалось значне підвищення рівнів відносної експресії генів *Hgf*, *Tgfa* та *Egf* у 5, 5 та 6 разів порівняно з групою здорових тварин. 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, яка отримувала токсин [204].

Отримані нами результати свідчать про те, що наше припущення не дало очікуваних результатів і комплекс ОРН-D-M не змінює профілі відносної експресії основних мітогенів при гострій гепатотоксичності.

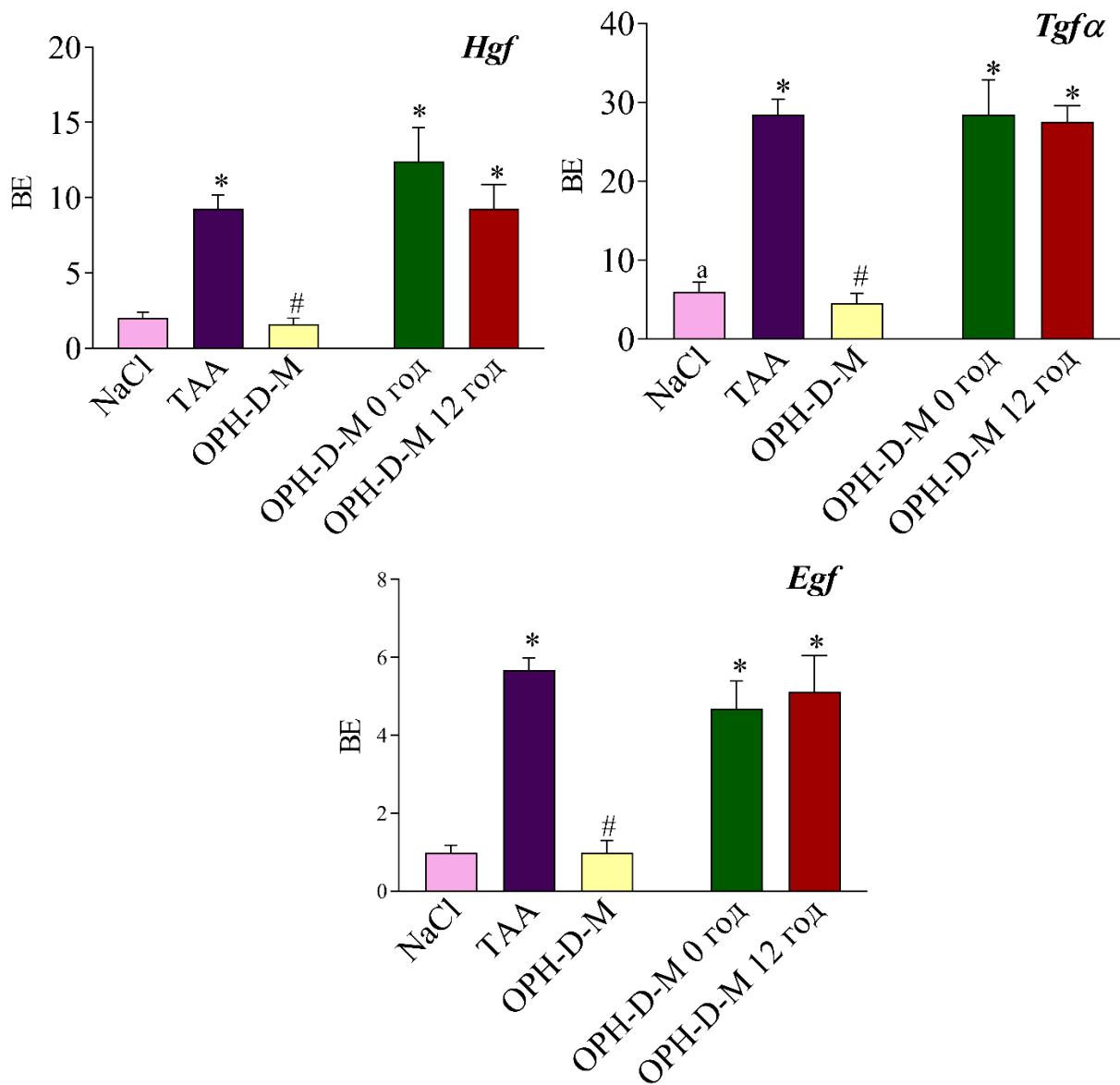


Рис. 3.13. Рівні відносної експресії генів *Hgf*, *Tgfa* та *Egf* через 48 годин після застосування ТАА та лікувального впливу ОРН-D-M через 12 годинні інтервали при їх застосуванні від початку дослідження (0 год) та через 12 год після застосування ТАА (12 год). Дані наведені як середнє \pm SD. * – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи NaCl; # – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи ТАА

3.7. Вплив комплексу ОРН-D-M на розвиток патологічних процесів при хронічному токсичному гепатоураженні

Наступний етап наших досліджень присвячений вивченню впливу ОРН-D-M на показники оксидативного стресу, запалення та активації стелатних клітин печінки з тривалою в часі експозицією токсину.

У роботі при довготривалому введенні ТАА зафіксоване значне ($p < 0,05$) підвищення рівнів ТБК-активних продуктів і протеїнових карбонільних груп у 6 та 4 рази порівняно з групою NaCl. Крім того, спостерігалось зниження рівнів протеїнових SH-груп та відновленого глутатіону на 76 та 82 % порівняно з групою здорових тварин. Це свідчить про важке оксидативне пошкодження ліпідних і протеїнових компонентів печінки (рис. 3.14).

Водночас монотерапевтичне лікування комплексом ОРН-D-M від початку дослідження (група ОРН-D-M 0 т) сприяло зменшенню рівнів ТБК-активних продуктів і протеїнових карбонільних груп на 60 та 35 % порівняно з групою тварин, що отримувала гепатотоксин. Також, у дослідній групі тварин спостерігалось підвищення знижених за дії токсину рівнів протеїнових SH-груп і відновленого глутатіону у 2 та 3 рази відповідно. Цікаво, що лікування ОРН-D-M через 4 тижні після першого застосування ТАА (група ОРН-D-M 4 т) теж проявляло протекторні властивості, що сприяло зниженню рівня ТБК-активних продуктів і протеїнових карбонільних груп на 49 та 24 % порівняно із тваринами групи ТАА. Крім того, у групі ОРН-D-M 4 т рівні протеїнових SH-груп і відновленого глутатіону були підвищені у 3 рази порівняно з групою тварин, що отримувала токсин. Варто зазначити, що комплекс ОРН-D-M не викликав токсичного ураження печінки при довготривалому застосуванні (рис. 3.14) [179,214,215].

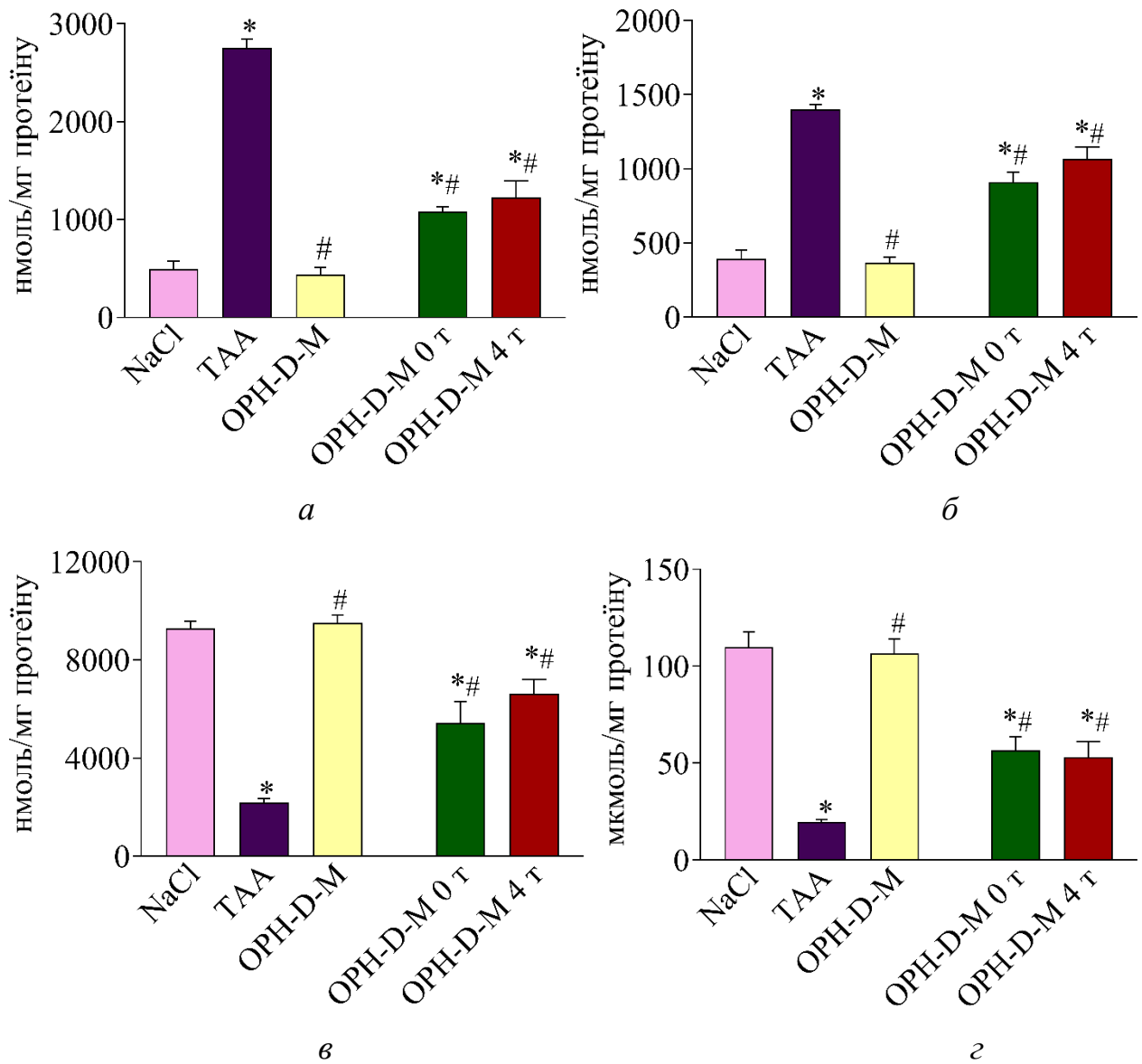


Рис. 3.14. Рівні ТБК-активних продуктів (а), протеїнових карбонільних груп (б), протеїнових SH-груп (в) та відновленого глутатіону (г) у печінці мишей через 8 тижнів після застосування ТАА та щоденного лікувального впливу ОРН-D-M при їх застосуванні від початку дослідження (ОРН-D-M 0 т) та через 4 тижні після індукції хронічного токсичного гепатоураження (ОРН-D-M 4 т). Дані наведені як середнє \pm SD. * – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи NaCl; # – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи ТАА

Отримані дані підвищеного рівня відновленого глутатіону корелювали з високою активністю ферментів глутатіонпероксидази (ГП) і глутатіон-S-трансферази (ГТ). Знижена активність антиоксидантних ферментів при дії ТАА була значно підвищена при щоденному застосуванні ОРН-D-M з терапевтичною метою. Як показано у Таблиці 3.3, комплекс підвищував активність ГП і ГТ у 3 та 2 рази порівняно з тваринами, що отримували токсин. Схожа тенденція спостерігалася при щоденному лікуванні ОРН-D-M через 4 тижні після початку ініціації хронічного токсичного ураження печінки. Комплекс ОРН-D-M підвищував знижені рівні антиоксидантних ферментів ГП і ГТ на 87 та 60 % порівняно з групою ТАА [214].

Таблиця 3.3

Глутатіонпероксидазна та глутатіон-S-трансферазна активності у паренхімі печінки при ТАА-індукованому хронічному ураженні

Група	ГТ активність, мкмоль/хв/мг протеїну	ГП активність, нмоль/хв/мг протеїну
NaCl	1,4±0,15	30,5±2,23
ТАА	0,5±0,09 *	9,7±0,86 *
ОРН-D-M	1,4±0,21 #	31,1±2,56 #
ОРН-D-M 0 т	1,1±0,12 *#	22,5±1,30 *#
ОРН-D-M 4 т	0,9±0,11 *#	18,1±0,10 *#

Примітка. Дані наведені як середнє ± SD. * – p<0,05 відмінності статистично достовірні щодо значень групи NaCl; # – p<0,05 відмінності статистично достовірні щодо значень групи ТАА.

Незаперечним є факт кореляції між оксидативним стресом і запаленням при хронічному токсичному ураженні печінки. Відомо, що тривала дія гепатотоксину призводить до стійкого запального процесу та руйнування клітин печінки. Тому, ми дослідили вплив комплексу ОРН-D-M на рівні відносної експресії генів *Il6* та *Tnfa*, як медіаторів запального процесу, та *Nfkb1* з тривалою в часі експозицією ТАА.

Результати досліджень рівнів відносної експресії генів *Il6* та *Tnfa* зображено на рис. 3.15. Довготривале застосування гепатотоксину підвищувало патерни відносної експресії прозапальних генів *Il6* та *Tnfa* у 8 та 10 разів порівняно з групою NaCl, що свідчить про запальний процес у паренхімі печінки.

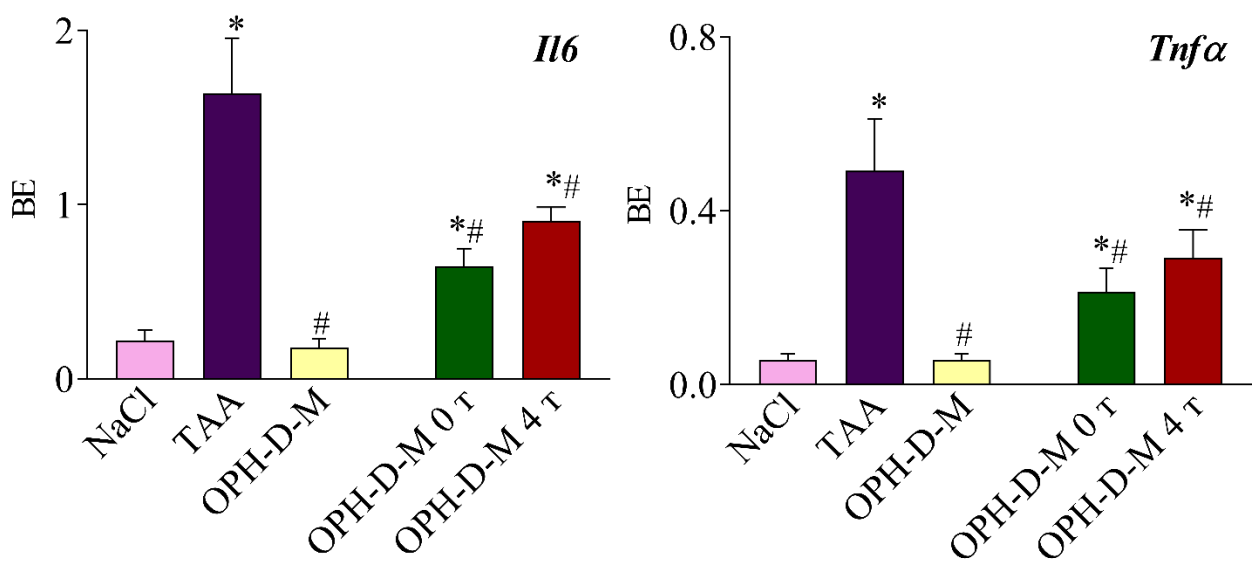


Рис. 3.15. Рівні відносної експресії генів *Il6* та *Tnfa* через 8 тижнів після застосування ТАА та щоденного лікувального впливу ОРН-D-M при їх застосуванні від початку дослідження (ОРН-D-M 0 т) та через 4 тижні після індукції хронічного токсичного гепатоураження (ОРН-D-M 4 т). Дані наведені як середнє \pm SD. * – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи NaCl; # – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи ТАА

У групі тварин, які підлягали лікуванню ОРН-D-M від початку дослідження (група ОРН-D-M 0 т) відзначалося зниження рівнів 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, ОРН-D-M не змінювали патерни експресії досліджених генів при довготривалому застосуванні [216].

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 (рис. 3.16).

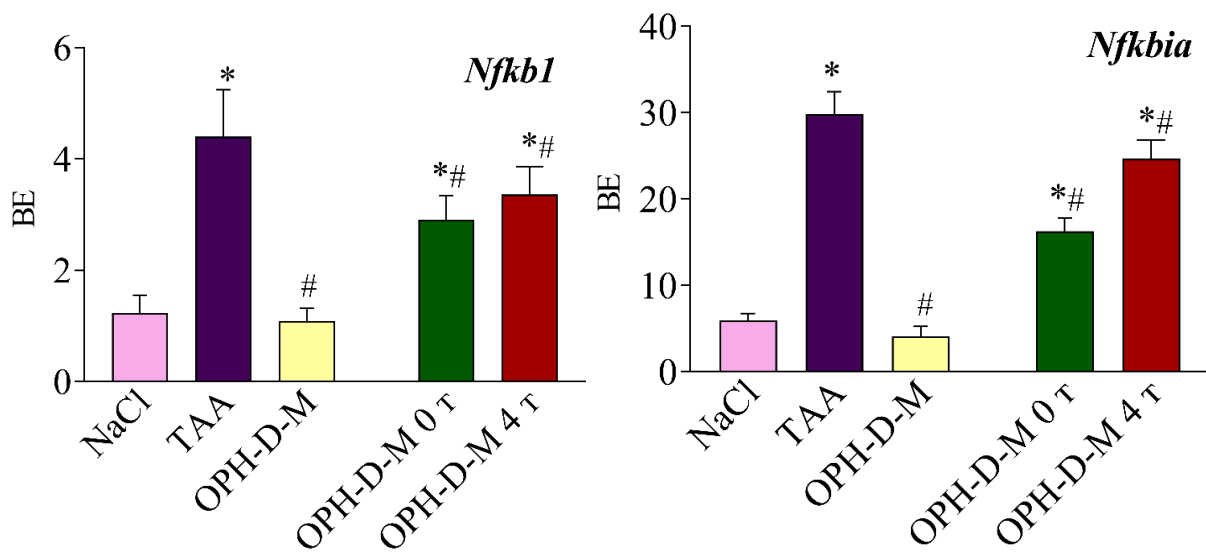


Рис. 3.16. Рівні відносної експресії генів *Nfkb1* та *Nfkbia* через 8 тижнів після застосування ТАА та щоденного лікувального впливу ОРН-D-M при їх застосуванні від початку дослідження (ОРН-D-M 0 т) та через 4 тижні після індукції хронічного токсичного гепатоураження (ОРН-D-M 4 т). Дані наведені як середнє \pm SD. * – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи NaCl; # – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи ТАА

Тотожні результати спостерігалися при дослідженні рівня відносної експресії *Nfkb1a*. Застосування комплексу призводило до зниження рівня мРНК *Nfkb1a* в обох дослідних групах тварин, які отримували препарати з лікувальною метою [215].

Тривалий оксидативний стрес та хронічне запалення призводить до стійкої реакції загоєння печінки, активації фіброгенезу печінки та надмірного накопичення компонентів позаклітинного матриксу [217,218]. Тому, наступним етапом наших досліджень, було визначення рівнів відносної експресії фіброз-асоційованих генів (*Tgfβ1*, *Acta 2*, *Colla1*) для оцінки ефекту лікування комплексом ОРН-D-M на ТАА-індукований фіброгенез печінки у мишей.

Як показано на рис. 3.17, у тварин, які отримували ТАА тричі на тиждень протягом 8 тижнів спостерігалось значне підвищення рівнів відносної експресії генів *Tgfβ1*, *Acta 2* та *Colla1* у 12, 8 та 11 разів порівняно зі здоровою групою тварин. На противагу цьому, комплекс значно знижував підвищені рівні відносної експресії фіброз-асоційованих генів.

Лікування 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) значно знизило рівень відносної експресії гена *Tgfβ1* на 43 та 26 % порівняно з групою тварин, яка отримувала токсин. Слід зазначити, що застосування ОРН-D-M у групах ОРН-D-M 0 т та ОРН-D-M 4 т ефективно знижувало підвищений рівень відносної експресії гена *Colla1* (рис. 3.17), що може свідчити про потенційну інгібіторну дію препарату на розвиток фіброзу при хронічному токсичному ураженні печінки у мишей.

Крім того, підвищений рівень відносної експресії маркера активованих зірчастих клітин – *Acta 2* зменшився в групах лікування 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) на 27 та 22 % порівняно з групою тварин, яка отримувала ТАА [216,219].

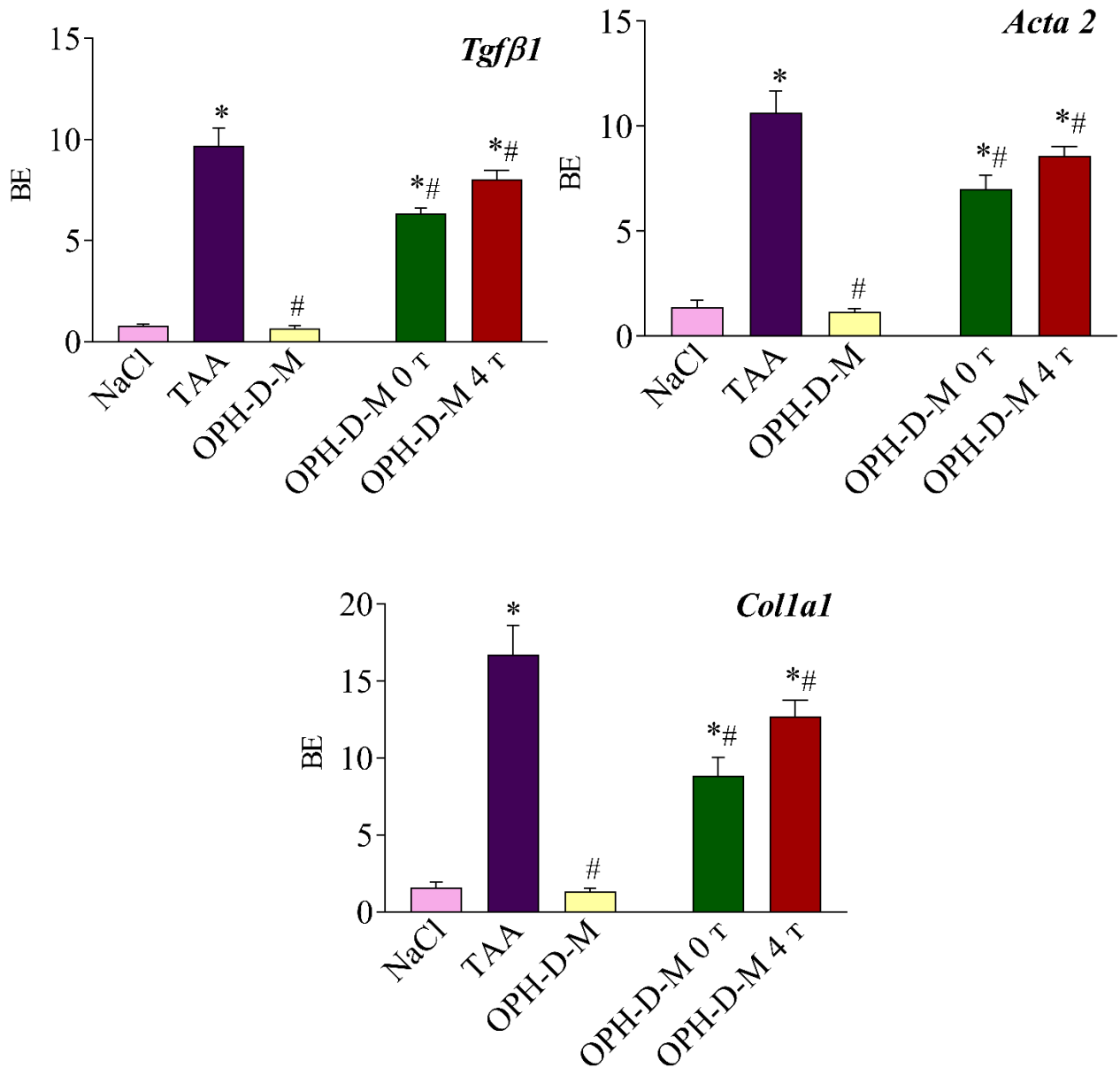


Рис. 3.17. Рівні відносної експресії генів *Tgfβ1*, *Acta 2* та *Colla1* через 8 тижнів після застосування ТАА та щоденного лікувального впливу ОРН-Д-М при їх застосуванні від початку дослідження (ОРН-Д-М 0 т) та через 4 тижні після індукції хронічного токсичного гепатоураження (ОРН-Д-М 4 т). Дані наведені як середнє \pm SD. * – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи NaCl; # – $p < 0,05$ відмінності статистично достовірні щодо значень групи ТАА

Також, нами було проведено гістологічні дослідження для диференціації колагенових волокон сполучної тканини в паренхімі печінки мишей при ТАА-індукованому хронічному ураженні. Результати проведеного дослідження зображено на рис. 3.18.

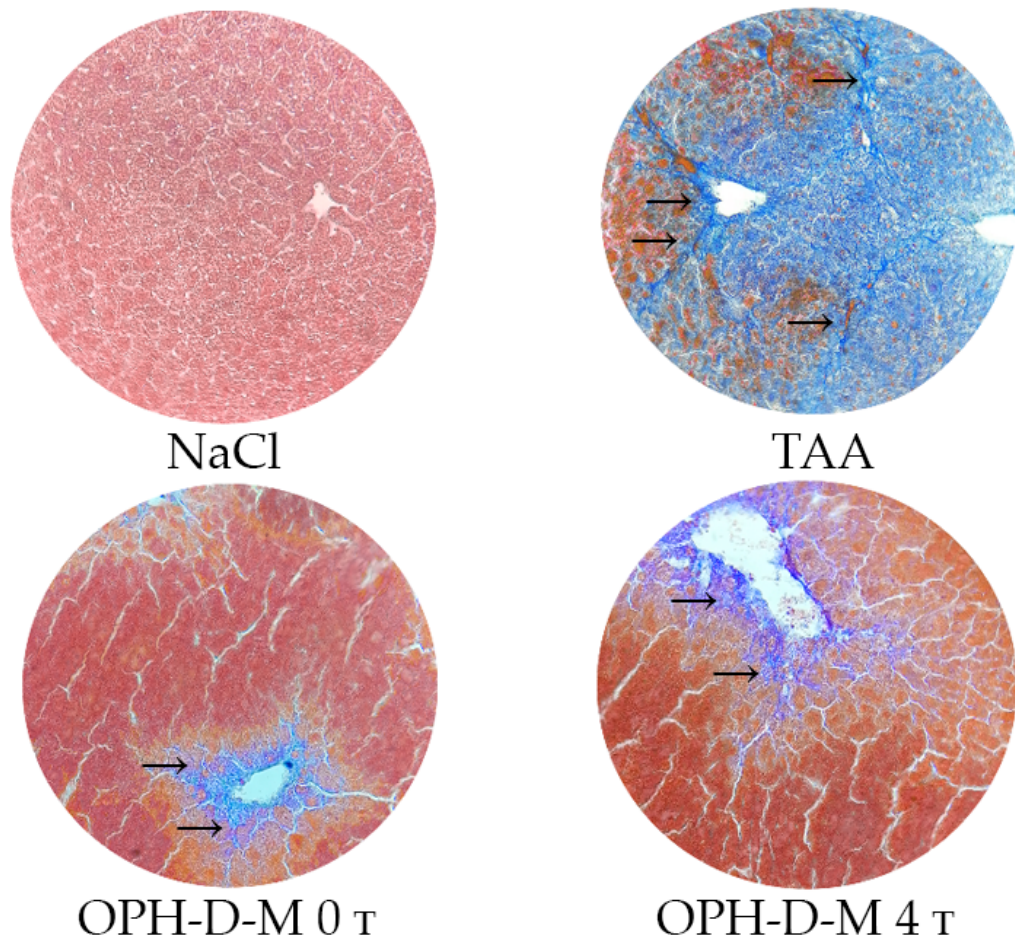


Рис. 3.18. Приклади гістологічних препаратів фрагментів печінки здорових тварин (група NaCl), тварин з хронічним токсичним ураженням (група ТАА) та тварин, які отримували лікування ОРН-D-M від початку дослідження (ОРН-D-M 0 т) та через 4 тижні після індукції хронічного токсичного гепатоураження (ОРН-D-M 4 т). Колагенові волокна (→). Забарвлення за Маллорі, x200

Результати наших досліджень показали, що довготривале застосування гепатотоксину (група ТАА) призвело до руйнування структури печінки та спричинило значні відкладення пучків колагенових волокон в портальних зонах (забарвлені темно-синім кольором), які утворили внутрішньочасточкові фіброзні септи. 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. 3.19).

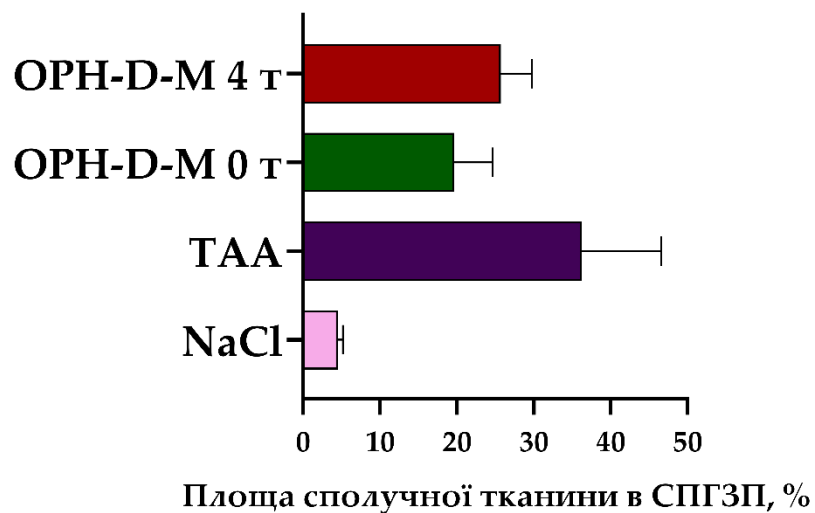


Рис. 3.19. Площа сполучної тканини у гістологічних препаратах фрагментів печінки, визначена методом Маллорі в % стандартизованої площі гістологічного зрізу печінки (СПГЗП) у здорових тварин (група NaCl), тварин з хронічним токсичним ураженням (група ТАА) та тварин, які отримували лікування ОРН-D-M від початку дослідження (ОРН-D-M 0 т) та через 4 тижні після індукції хронічного токсичного гепатоураження (ОРН-D-M 4 т)

На противагу цьому, у групі тварин ОРН-D-M 0 т архітектура печінки була збереженою і ділянки явного пошкодження були невеликі. Кількість відкладень сполучної тканин 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 [220].

Результати досліджень, представлені у РОЗДІЛІ 3 опубліковані у таких роботах:

1. **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.
2. **T. 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.
3. **Т.В. Марчишак**, Т.Г. Яковенко, З.Ю. Ткачук Вплив комплексів олігорибонуклеотидів з D-манітолом на експресію генів при гострій тіоацетамід-індукованій гепатотоксичності // *Допов. Нац. Акад. Наук Укр.* – 2018. – № 7. – С. 96-102.
4. 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.

5. **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.

6. **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.

7. **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.

8. **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.

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. 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.

11. **Т. В. Марчишак**, Т. Г. Яковенко, І. О. Шмараков, 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.

12. **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.

13. **Т. В. Марчишак**, И.А. Шмараков Гепатопротекторная активность экзогенной РНК // Материалы 18 Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых. – Пушино, Россия. – 2014. – С. 149-150.

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Захворювання печінки досі залишаються одним зі складних розділів гепатобіліарної системи, не дивлячись на досягнення сучасної науки та практики. Лікування хвороб печінки потребує комплексного підходу та базується на використанні засобів, які направлені на усунення етіотропного чинника з наступною патогенетичною гепатопротекторною терапією. Разом з тим, використання комбінованої фармакотерапії на основі сучасних синтетичних препаратів часто супроводжується побічними ефектами (зокрема, гематологічними змінами, диспепсією, маніфестацією, аутоімунними порушеннями тощо). Тому актуальним є пошук препаратів комплексної дії, які водночас мають гепатопротекторну активність і направлені на усунення етіотропного чинника.

У цьому плані перспективними є препарати на основі ОРН і D-манітолу. Доцільність поглибленого вивчення біологічної активності комплексу ОРН-D-M, які в майбутньому можна використати з терапевтичною метою в гастроентерології, обґрунтовується даними літератури щодо протівірусної дії комплексу ОРН-D-M проти вірусу гепатиту С [11,12,192]. Тому дослідження потенційної гепатопротекторної дії комплексу при гепатотоксичності та пошук механізму його дії є пріоритетним та актуальним.

Оскільки, дослідження потенційної гепатопротекторної дії комплексу ОРН-D-M проводились вперше, то першим етапом було скринінгове дослідження гепатопротекторної дії ОРН-D-M і підбір оптимальної ефективної дози для перорального застосування при гострій гепатотоксичності. Результатами першого етапу встановлено, що ОРН-D-M володіє потенційною гепатопротекторною дією, яка проявлялася в нормалізації рівнів печінкових трансаміназ (АлАТ, АсАТ, ГГТ), продуктів пероксидного окислення ліпідів і відновленого глутатіону і мала дозозалежний характер. Показано, що найбільш

виражена гепатопротекторна дія комплексу при гострій гепатотоксичності проявлялась у дозі 200 мг/кг маси тіла тварин.

Виходячи з робочої гіпотези дисертаційної роботи, ми припускали можливість системної гепатопротекторної дії ОРН-D-M шляхом нормалізації показників ураження печінки, оксидативного стресу та антиоксидантної системи. Результати проведених досліджень показали, що комплекс ОРН-D-M при лікувальному введенні у дозі 200 мг/кг маси тіла тварин на тлі дії чинника гострого токсичного ураження зменшував вираженість дистрофічних і дегенеративних змін у паренхімі печінки. Лікування комплексом через 12-годинні інтервали сприяло збереженню архітектури печінки про що свідчила відсутність центральнo-лобулярного некрозу та невелика кількість некротичних/апоптичних ділянок у паренхімі органу. Крім того, нами показано, що ОРН-D-M зменшував вираженість патологічних змін про що свідчило статистично достовірне зниження активностей печінкових трансаміназ (АЛАТ, ГГТ) порівняно з групою тварин, яка отримувала токсин. Зважаючи на отримані дані, можна припустити, що комплекс ОРН-D-M здатний зменшувати синдром цитолізу та ураження печінки.

З літературних даних відомо, що ТАА у дозі 500 мг/кг маси тіла тварин за прооксидантним вільнорадикальним механізмом призводить до нагромадження АФК, порушення процесів їхньої інактивації, що в підсумку веде до окислювальної модифікації біомолекул [221]. Наші результати демонстрували активацію пероксидного окислення ліпідів і білків клітин печінки з одночасним виснаженням пулу відновленого глутатіону при гострій ТАА-індукованій гепатотоксичності. На фоні лікувального застосування ОРН-D-M (група ОРН-D-M 0 год) через 12-годинні інтервали при одночасному введенні з ТАА після індукції гострого токсичного ураження, рівні продуктів пероксидного окислення ліпідів і протеїнових карбонільних груп у паренхімі органу знижувалися на 65 та 52 % ($p < 0,05$), під впливом ОРН (група ОРН 0 год) – на 22

та 44 % ($p < 0,05$), під впливом D-M (група D-M 0 год) – на 2 та 3% відносно групи ТАА. Аналогічна тенденція зменшення показників оксидативної деструкції біомолекул спостерігалася при лікуванні ОРН-D-M через 12-годинні інтервали при введенні першої дози після 12 год після застосування гепатотоксину (група ОРН-D-M 12 год). Варто відмітити, що лікування гострої гепатотоксичності окремими компонентами комплексу, зокрема ОРН, не проявляло тотожного ефекту порівняно з ОРН-D-M. Крім того, застосування комплексу від початку дослідження (група ОРН-D-M 0 год) та через 12 годин після застосування гепатотоксину (група ОРН-D-M 12 год) супроводжувалося підвищенням рівня протеїнових SH-груп у 6 та 5 разів порівняно з групою тварин, які отримували токсин.

У роботі показано, що інтенсивність оксидативного стресу в печінці тісно пов'язана з активністю антиоксидантної системи, зокрема глутатіонової ланки захисту. Відомо, що ГП з використанням відновленого глутатіону забезпечує знешкодження H_2O_2 та гідропероксидів, які утворилися при пероксидному окисленні ліпідів [202,222]. Результати наших досліджень показали, що застосування ОРН-D-M з лікувальною метою сприяє індукції даного ферменту із одночасним підвищенням пулу кофактора у вигляді відновленого глутатіону при ТАА-індукованій гепатотоксичності. Крім цього, лікування комплексом тварин групи ОРН-D-M 0 год та ОРН-D-M 12 год сприяло підвищенню активності ГТ на 62 та 33% порівняно з групою ТАА. Це свідчить про підвищення адаптивно-захисної здатності печінки до дії вільних радикалів під впливом комплексу ОРН-D-M. Ми припускаємо, що підвищені рівні ферментів ГП і ГТ за дії комплексу можуть бути зумовлені частковою нормалізацією рівня відновленого глутатіону, який є критичним для кон'югації та елімінації електрофільних метаболітів оксидативного стресу при ТАА-індукованій гострій гепатотоксичності.

Отже, отримані нами результати підтверджують наше припущення щодо нормалізації показників ураження печінки, оксидативного стресу та антиоксидантної системи за дії ОРН-D-M при токсичному ураженні печінки.

Наше припущення щодо системної гепатопротекторної дії препарату включало також можливість ОРН-D-M нормалізувати запалення, блокувати розвиток фібротичних процесів та впливати на регенерацію печінки при токсичному ураженні печінки впливаючи на молекулярному рівні на цитокіни, транскрипційні фактори, ростові фактори та мітогени.

У проведених нами дослідженнях щодо ланки запалення було показано, що лікування ОРН-D-M на початку дослідження (ОРН-D-M 0 год) та через 12 годин після застосування гепатотоксину (ОРН-D-M 12 год) знижувало рівень відносної експресії універсального транскрипційного фактору *Nfkb1* на 51 та 27 % порівняно з групою тварин, що отримувала ТАА. Аналогічна тенденція спостерігалася щодо зниження рівнів відносної експресії генів, що кодують прозапальні цитокіни *Il6* та *Tnfa* при застосуванні комплексу з лікувальною метою. Отримані результати свідчать, що ОРН-D-M здатний знижувати запальний процес у паренхімі печінки за дії гепатотоксину шляхом інгібування надекспресію *Nfkb1*, що в свою чергу перешкоджає надекспресії цитокінів і хемокінів, які залучені в розвитку патологічного процесу. Даний висновок підтверджується низькими показниками активності мієлопероксидази при гострому токсичному ураженні – маркерного ферменту, який міститься в азурофільних гранулах нейтрофілів і лізосомах моноцитів/макрофагів і відображає рівень інфільтрації паренхіми клітинами імунної системи.

При гепатотоксичності надпродукція прозапальних цитокінів призводить до активації стелатних клітин, які виступають основними ефекторними клітинами у фіброгенезі печінки. Тому ми припускали реалізацію гепатопротекторної дії препарату шляхом зменшення активації стелатних клітин та розвитку фібротичних процесів в пошкодженій печінці. Застосування

комплексу ОРН-D-M з терапевтичною метою знижувало профілі відносної експресії профібrogenного цитокіну *Tgfb1* та *Colla1*. Варто зауважити, що за дії комплексу знижувався й рівень відносної експресії гена *Acta 2*, що свідчить про зменшення кількості активованих стелатних клітин печінки. Іншими дослідниками відмічалось, що активовані стелатні клітини характеризуються значною індукцією та підвищеною активністю NF-κB. Як результат, це призводить до посиленої експресії COX-2, IL-1β, IL-6, ICAM-1. Тому ми припускаємо, що, імовірно, комплекс здатний знижувати рівень відносної експресії *Nfkb1* і тим самим модулювати сигналінг профіброзних цитокінів.

В рамках нашої гіпотези ми припускали здатність ОРН-D-M впливати на регенеративні процеси в печінці, які забезпечують відновлення паренхіми органу після ураження. Тому ще однією групою досліджених нами молекул були основні мітогени, зокрема HGF, TGF-α та EGF, які сприяють виживанню гепатоцитів, стимулюють регенерацію та забезпечують гепатопротекцію [148]. Ми припускали, що, можливо, захисний ефект комплексу ОРН-D-M також пов'язаний з індукцією генів, що кодують основні мітогени. Результати наших досліджень показали, що за дії препарату рівні відносної експресії генів *Hgf*, *Tgfa* та *Egf* залишались статистично незмінними відносно групи тварин, які отримували токсин. Отримані нами результати свідчать про те, що наше припущення не дало очікуваних результатів і комплекс ОРН-D-M не змінює профілі відносної експресії основних мітогенів при гепатотоксичності.

У дисертаційній роботі нами також проведено дослідження впливу ОРН-D-M на показники оксидативного стресу, запалення та активацію стелатних клітин печінки з тривалою в часі експозицією токсину. Результати наших досліджень показали, що монотерапевтичне застосування комплексу ОРН-D-M при ТАА-індукованому ураженні печінки призводило до зменшення оксидативного пошкодження біомолекул гепатоцитів, що проявлялося в зниженні рівнів продуктів пероксидного окислення ліпідів та білків. Крім того,

застосування ОРН-D-M від початку дослідження та через 4 тижні від початку ініціації хронічного токсичного ураження, захищало печінку від окислення вільними радикалами, посилюючи активність глутатіон-залежної антиоксидантної ланки захисту. Ці сукупні дані свідчать про те, що антиоксидація за дії препарату є перспективною стратегією лікування хронічного токсичного ураження печінки.

Хронічна активація імунної відповіді призводила до порушення балансу між прозапальними та протизапальними цитокінами, що сприяло прогресуванню хронічного пошкодження печінки. У цьому дослідженні лікування комплексом ОРН-D-M значно знижувало рівень відносної експресії *Nfkb1*, що в свою чергу пригнічувало генералізований запальний каскад, про що свідчить зниження профілів відносної експресії генів *Il6* та *Tnfa*.

Тривале застосування гепатотоксину також суттєво змінювало якісний і кількісний склад компонентів позаклітинного матриксу, що призводило до розвитку фіброзу печінки. В свою чергу, лікування препаратом знижувало підвищені рівні відносної експресії профіброзних генів *Tgfβ1*, *Colla1* та *Acta 2*, що може свідчити про потенційний протифіброзний ефект комплексу ОРН-D-M. Додатково, даний ефект був підтверджений нашими дослідженнями щодо відкладень фібрил-утворюючих колагенів при хронічному ураженні печінки за дії ТАА. Було показано, що застосування ОРН-D-M з терапевтичною метою зменшувало кількість відкладень сполучної тканини у паренхімі печінки при хронічному токсичному ураженні. Отримані нами результати гепатопротекторної дії препарату підтверджують висунуту робочу гіпотезу щодо потенційних механізмів дії комплексу ОРН-D-M при токсичному ураженні печінки.

Узагальнюючи отримані результати дисертаційного дослідження, нами запропонована гіпотетична схема гепатопротекторної дії комплексу ОРН-D-M при токсичному ураженні печінки (рис. 4.1).

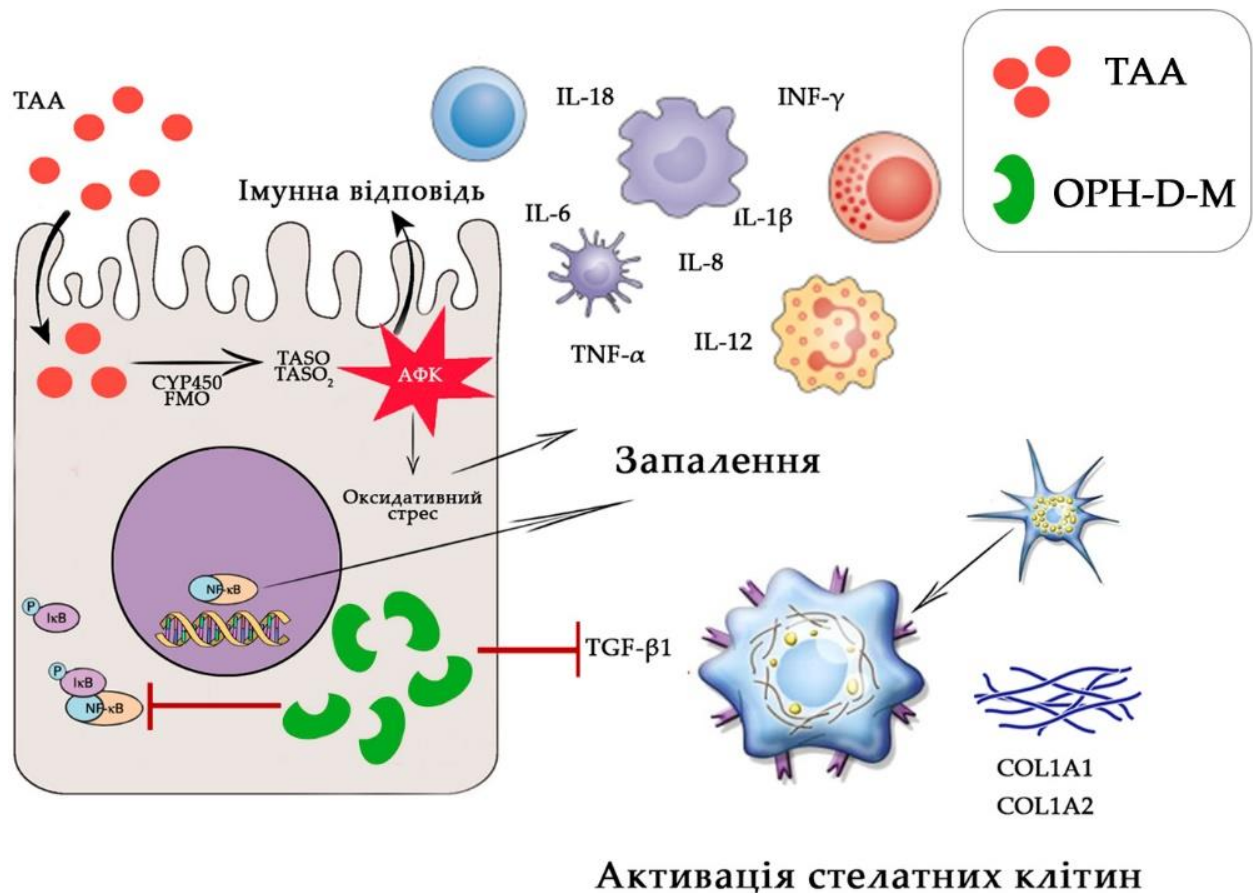


Рис. 4.1. Гіпотетична схема гепатопротекторної дії комплексу OPH-D-M при токсичному ураженні печінки

Ми припускаємо, що комплекс має мультитаргетну дію і здатний впливати на різні системи захисту печінки. Зокрема, OPH-D-M може нормалізувати показники ураження паренхіми печінки, оксидативного стресу та антиоксидантної системи при токсичному ураженні печінки. Крім того, ми також припускаємо, що комплекс здатний модулювати розвиток імунної відповіді та активацію стелатних клітин печінки шляхом інгібування надекспресії транскрипційного фактору NF-κB, прозапальних цитокінів та профібротичних генів при токсичному ураженні печінки.

Загалом, отримані нами результати потенційної гепатопротекторної дії комплексу ОРН-D-M при гострій і хронічній гепатотоксичності підтверджують мембраностабілізуючу, антиоксидантну та протизапальну властивості препарату і розширюють наше розуміння можливого механізму його дії. Застосування ОРН-D-M з терапевтичною метою в перспективі може лягти в основу розробки препарату для лікування гепатотоксичності.

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 ТАА-індукованого вільнорадикального пошкодження біомолекул гепатоцитів мишей за рахунок зниження рівня генерації продуктів оксидативної деградації та підвищенню 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 *Tgfβ1*, *Colla1* та *Acta 2* в паренхімі печінки мишей.
5. За умов ТАА-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 ТАА-індукованого хронічного токсичного ураження призводить до зниження підвищених рівнів відносної експресії генів *Nfkb1*, *Nfkbia*, прозапальних цитокінів (*Il6*, *Tnfa*) та

профіброзних генів (*Tgf β 1*, *Colla1*, *Acta 2*) в паренхімі печінки, що призводить до зменшення відкладень сполучної тканини та зменшення розвитку фіброзу печінки.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Blachier, M.; Leleu, H.; Peck-Radosavljevic, M.; Valla, D. C.; Roudot-Thoraval, F. The Burden of Liver Disease in Europe: A Review of Available Epidemiological Data. *J. Hepatol.* **2013**, *58* (3), 593–608. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.12.005>.
2. Asrani, S. K.; Devarbhavi, H.; Eaton, J.; Kamath, P. S. Burden of Liver Diseases in the World. *J. Hepatol.* **2019**, *70* (1), 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.014>.
3. Cichoż-Lach, H.; Michalak, A. Oxidative Stress as a Crucial Factor in Liver Diseases. *World J. Gastroenterol.* **2014**. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i25.8082>.
4. Li, S.; Tan, H. Y.; Wang, N.; Zhang, Z. J.; Lao, L.; Wong, C. W.; Feng, Y. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16* (11), 26087–26124. <https://doi.org/10.3390/ijms161125942>.
5. Sanchez-Valle, V.; Chavez-Tapia, N.; Uribe, M.; Mendez-Sanchez, N. Role of Oxidative Stress and Molecular Changes in Liver Fibrosis: A Review. *Curr. Med.* **2012**, *19* (28), 4850–4860. <https://doi.org/10.2174/092986712803341520>.
6. Leggio, L.; Lee, M. R. Treatment of Alcohol Use Disorder in Patients with Alcoholic Liver Disease. *Am. J. Med.* **2017**, *130* (2), 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2016.10.004>.
7. Friedman, S. L.; Rockey, D. C.; Bissell, D. M. Hepatic Fibrosis 2006: Report of the Third AASLD Single Topic Conference. *J. Hepatol.* **2007**, *45* (1), 242–249. <https://doi.org/10.1002/hep.21459>.
8. Tkachuk, Z.; Tkachuk, V.; Tkachuk, L. The Study on Membrane-Stabilizing and Anti-Inflammatory Actions of Yeast RNA in Vivo and in Vitro. *Biopolym Cell* **2006**, *22* (2), 109–116. <https://doi.org/10.7124/bc.000723>.
9. Melnichuk, N.; Semernikova, L.; Tkachuk, Z. Complexes of

- Oligoribonucleotides with D-Mannitol Inhibit Hemagglutinin-Glycan Interaction and Suppress Influenza A Virus H1N1 (A/FM/1/47) Infectivity In Vitro. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* **2017**, *10* (3). <https://doi.org/10.3390/ph10030071>.
10. Melnichuk, N.; Zarubaev, V.; Iosyk, I.; Andreychyn, M.; Semernikova, L.; Tkachuk, Z. Pre-Clinical and Clinical Efficiency of Complexes of Oligoribonucleotides with D-Mannitol against Respiratory Viruses. *Pharmaceutics* **2018**, *10* (2). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020059>.
 11. Ткачук, З. Ю.; Дикий, Б. М.; Кондрин, О. Є.; Пришляк, О. Я.; Васкул, Н. В. Застосування Препарату Нуклекс в Терапії Гепатиту С. *Укр. Мед. Алм.* **2011**, *14*, 200–203.
 12. Фролов, В. М.; Соцька, Я. А.; Круглова, О. В.; Ткачук, З. Ю. Вплив Провірусного Препарату Нуклекс На Показники Клітинної Ланки Імунітету у Хворих На Хронічний Вірусний Гепатит С. *Укр. Морфол. Алм.* **2012**, *10* (1), 99–105.
 13. Торопчин, В. І. Стан Системи Інтерферону в Хворих На Неалкогольний Стеатогепатит На Тлі Синдрому Хронічної Втоми При Застосуванні Комбінації Енерліву Та Нуклекса. *Укр. Мед. Алм.* **2012**, *15* (2), 150–160.
 14. Pandit. Drug-Induced Hepatotoxicity: A Review. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2012**, *02* (5), 233–243. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2541>.
 15. Andrade, R. J.; Chalasani, N.; Björnsson, E. S.; Suzuki, A.; Kullak-Ublick, G. A.; Watkins, P. B.; Devarbhavi, H.; Merz, M.; Lucena, M. I.; Kaplowitz, N.; Aithal, G. P. Drug-Induced Liver Injury. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2019**, *5* (1), 1–22. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0105-0>.
 16. Gunawan, B.; Kaplowitz, N. Clinical Perspectives on Xenobiotic- Induced Hepatotoxicity. *Drug Metab. Rev.* **2004**, *36* (2), 301–312. <https://doi.org/10.1081/DMR-120034148>.
 17. Soucek, P. Xenobiotics. In *Encyclopedia of Cancer*; Springer Berlin Heidelberg:

- Berlin, Heidelberg, 2011; pp 3964–3967. https://doi.org/10.1007/978-3-642-16483-5_6276.
18. Fleury, M. B. Importance of the Metabolic Oxidation of Drugs and Other Xenobiotics: Recent Developments. *Ann Pharm Fr* **2011**, *69* (1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2010.12.001>.
 19. Dekant, W. The Role of Biotransformation and Bioactivation in Toxicity. *EXS* **2009**, *99*, 57–86. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8336-7_3.
 20. David, S.; Hamilton, J. P. Drug-Induced Liver Injury. *US Gastroenterol Hepatol Rev* **2010**, *6*, 73–80.
 21. Hoofnagle, J. H. Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN). *Hepatology* **2004**, *40* (4), 773–773. <https://doi.org/10.1002/hep.20445>.
 22. Seeff, L. B.; Cuccherini, B. A.; Zimmerman, H. J.; Adler, E.; Benjamin, S. B. Acetaminophen Hepatotoxicity in Alcoholics. *Ann. Intern. Med.* **1986**, *104* (3), 399. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-104-3-399>.
 23. Njoku, D. B. Drug-Induced Hepatotoxicity: Metabolic, Genetic and Immunological Basis. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15* (4), 6990–7003. <https://doi.org/10.3390/ijms15046990>.
 24. Lee, W. M. Drug-Induced Hepatotoxicity. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349* (5), 474–485. <https://doi.org/10.1056/NEJMra021844>.
 25. Schulz, M.; Schmoltdt, A.; Andresen-Streichert, H.; Iwersen-Bergmann, S. Revisited: Therapeutic and Toxic Blood Concentrations of More than 1100 Drugs and Other Xenobiotics. *Crit Care* **2020**, *24* (1). <https://doi.org/10.1186/s13054-020-02915-5>.
 26. Omiecinski, C. J.; Vanden Heuvel, J. P.; Perdew, G. H.; Peters, J. M. Xenobiotic Metabolism, Disposition, and Regulation by Receptors: From Biochemical Phenomenon to Predictors of Major Toxicities. *Toxicol. Sci.* **2011**, *120* (1), 49–75. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq338>.
 27. Lerapetritou, M. G.; Georgopoulos, P. G.; Roth, C. M.; Androulakis, L. P. Tissue-

- Level Modeling of Xenobiotic Metabolism in Liver: An Emerging Tool for Enabling Clinical Translational Research. *Clin Transl Sci* **2009**, 2 (3), 228–237. <https://doi.org/10.1111/j.1752-8062.2009.00092.x>.
28. Guengerich, F. P. Cytochromes P450, Drugs, and Diseases. *Mol. Interv.* **2003**, 3 (4), 194–204. <https://doi.org/10.1124/mi.3.4.194>.
29. Testa, B.; Krämer, S. D. The Biochemistry of Drug Metabolism – An Introduction. *Chem. Biodivers.* **2007**, 4 (9), 2031–2122. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790169>.
30. Thakkar, N.; Slizgi, J. R.; Brouwer, K. L. R. Effect of Liver Disease on Hepatic Transporter Expression and Function. *J Pharm Sci* **2017**, 106 (9), 2282–2294. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.04.053>.
31. Gu, X.; Manautou, J. E. Molecular Mechanisms Underlying Chemical Liver Injury. *Expert Rev. Mol. Med.* **2012**, 14. <https://doi.org/10.1017/S1462399411002110>.
32. Iyanagi, T. Molecular Mechanism of Phase I and Phase II Drug-Metabolizing Enzymes: Implications for Detoxification. In *Int Rev Cell Mol Biol*; Academic Press, 2007; Vol. 260, pp 35–112. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(06\)60002-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)60002-8).
33. Bigoniya, P.; Singh, C.; Shukla, A. A Comprehensive Review of Different Liver Toxicants Used in Experimental Pharmacology. *IJPSDR* **2009**, 1 (3), 124–135.
34. Kutsuno, Y.; Itoh, T.; Tukey, R. H.; Fujiwara, R. Glucuronidation of Drugs and Drug-Induced Toxicity in Humanized UDP-Glucuronosyltransferase 1 Mice. *Drug Metab. Dispos.* **2014**, 42 (7), 1146–1152. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.057083>.
35. Kiang, T.; Ensom, M.; Chang, T. UDP-Glucuronosyltransferases and Clinical Drug-Drug Interactions. *Pharmacol. Ther.* **2005**, 106 (1), 97–132. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.10.013>.
36. Barbosa, A. C. S.; Feng, Y.; Yu, C.; Huang, M.; Xie, W. Estrogen

- Sulfotransferase in the Metabolism of Estrogenic Drugs and in the Pathogenesis of Diseases. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2019**, *15* (4), 329–339. <https://doi.org/10.1080/17425255.2019.1588884>.
37. Kalinina, E. V.; Chernov, N. N.; Novichkova, M. D. Role of Glutathione, Glutathione Transferase, and Glutaredoxin in Regulation of Redox-Dependent Processes. *Biochemistry (Mosc)*. **2014**, *79* (13), 1562–1583. <https://doi.org/10.1134/S0006297914130082>.
38. Jiang, X.; Du, B.; Zheng, J. Glutathione-Mediated Biotransformation in the Liver Modulates Nanoparticle Transport. *Nat. Nanotechnol.* **2019**, *14* (9), 874–882. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0499-6>.
39. Saengtienchai, A.; Ikenaka, Y.; Kawata, M.; Kawai, Y.; Takeda, K.; Kondo, T.; Bortey-Sam, N.; Nakayama, S. M. M.; Mizukawa, H.; Ishizuka, M. Comparison of Xenobiotic Metabolism in Phase I Oxidation and Phase II Conjugation between Rats and Bird Species. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2018**, *214*, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.08.007>.
40. Gu, X.; Manautou, J. E. Molecular Mechanisms Underlying Chemical Liver Injury. *Expert Rev. Mol. Med.* **2012**, *14*, e4. <https://doi.org/10.1017/S1462399411002110>.
41. Dickinson, D. A.; Forman, H. J. Cellular Glutathione and Thiols Metabolism. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64* (5–6), 1019–1026. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01172-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01172-3).
42. Deponte, M. Glutathione Catalysis and the Reaction Mechanisms of Glutathione-Dependent Enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830* (5), 3217–3266. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>.
43. Yang, X.; Wei, J.; Wu, Z.; Gao, J. Effects of Substrate-Binding Site Residues on the Biochemical Properties of a Tau Class Glutathione s-Transferase from *Oryza Sativa*. *Genes* **2020**, *11* (1). <https://doi.org/10.3390/genes11010025>.
44. Fabrini, R.; Bocedi, A.; Dawood, K. F.; Turella, P.; Stella, L.; Parker, M. W.;

- Pedersen, J. Z.; Federici, G.; Antonini, G.; Ricci, G. The Extended Catalysis of Glutathione Transferase. *FEBS Lett.* **2011**, *585* (2), 341–345. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.12.009>.
45. Yang, Y.; Cheng, J. Z.; Singhal, S. S.; Saini, M.; Pandya, U.; Awasthi, S.; Awasthi, Y. C. Role of Glutathione S-Transferases in Protection against Lipid Peroxidation: Overexpression of HGSTA2-2 in K562 Cells Protects against Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis and Inhibits JNK and Caspase 3 Activation. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (22), 19220–19230. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100551200>.
46. Sharma, R.; Yang, Y.; Sharma, A.; Awasthi, S.; Awasthi, Y. C. Antioxidant Role of Glutathione S-Transferases: Protection Against Oxidant Toxicity and Regulation of Stress-Mediated Apoptosis. *Antioxid. Redox Signal.* **2004**, *6* (2), 289–300. <https://doi.org/10.1089/152308604322899350>.
47. Hoffmann, U.; Kroemer, H. K. The ABC Transporters MDR1 and MRP2: Multiple Functions in Disposition of Xenobiotics and Drug Resistance. *Drug Metab. Rev.* **2004**, *36* (3–4), 669–701. <https://doi.org/10.1081/DMR-200033473>.
48. Fardel, O.; Jigorel, E.; Le Vee, M.; Payen, L. Physiological, Pharmacological and Clinical Features of the Multidrug Resistance Protein 2. *Biomed. Pharmacother.* **2005**, *59* (3), 104–114. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2005.01.005>.
49. Petzinger, E.; Geyer, J. Drug Transporters in Pharmacokinetics. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2006**, *372* (6), 465–475. <https://doi.org/10.1007/s00210-006-0042-9>.
50. Tocchetti, G. N.; Rigalli, J. P.; Arana, M. R.; Villanueva, S. S. M.; Mottino, A. D. Modulation of Expression and Activity of Intestinal Multidrug Resistance-Associated Protein 2 by Xenobiotics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2016**, *303*, 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.05.002>.
51. Radi, R. Oxygen Radicals, Nitric Oxide, and Peroxynitrite: Redox Pathways in Molecular Medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2018**, *115* (23), 5839–5848.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.1804932115>.
52. Djordjević, V. B. Free Radicals in Cell Biology. *Int. Rev. Cytol.* **2004**, *237*, 57–89. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)37002-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)37002-6).
 53. Shimizu, I.; Shimamoto, N.; Saiki, K.; Furujo, M.; Osaw, K. Lipid Peroxidation in Hepatic Fibrosis. *InTech* **2012**. <https://doi.org/10.5772/46180>.
 54. Morita, M.; Ishida, N.; Uchiyama, K.; Yamaguchi, K.; Itoh, Y.; Shichiri, M.; Yoshida, Y.; Hagihara, Y.; Naito, Y.; Yoshikawa, T.; Niki, E. Fatty Liver Induced by Free Radicals and Lipid Peroxidation. *Free Radic. Res.* **2012**, *46* (6), 758–765. <https://doi.org/10.3109/10715762.2012.677840>.
 55. Ayala, A.; Muñoz, M. F.; Argüelles, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>.
 56. Yin, H.; Xu, L.; Porter, N. A. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (10), 5944–5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>.
 57. Girotti, A. Lipid Hydroperoxide Generation, Turnover, and Effector Action in Biological Systems. *J. Lipid Res.* **1998**, *39* (8), 1529–1542.
 58. Tsikas, D. Assessment of Lipid Peroxidation by Measuring Malondialdehyde (MDA) and Relatives in Biological Samples: Analytical and Biological Challenges. *Anal. Biochem.* **2017**, *524*, 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.021>.
 59. Grotto, D.; Santa Maria, L.; Valentini, J.; Paniz, C.; Schmitt, G.; Garcia, S. C.; Pomblum, V. J.; Rocha, J. B. T.; Farina, M. Importance of the Lipid Peroxidation Biomarkers and Methodological Aspects for Malondialdehyde Quantification. *Quim Nova* **2009**, *32* (1), 169–174. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000100032>.
 60. Kapusta, A.; Kuczyńska, B.; Puppel, K. Relationship between the Degree of

- Antioxidant Protection and the Level of Malondialdehyde in High-Performance Polish Holstein-Friesian Cows in Peak of Lactation. *PLOS ONE* **2018**, *13* (3), e0193512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193512>.
61. Niemela, O. Aldehyde-Protein Adducts in the Liver as a Result of Ethanol-Induced Oxidative Stress. *Front. Biosci.* **1999**, *4* (1–3), 506. <https://doi.org/10.2741/Niemela>.
 62. Patel, V. B.; Worall, S.; Emery, P. W.; Preedy, V. R. Protein Adduct Species in Muscle and Liver of Rats Following Acute Ethanol Administration. *Alcohol Alcohol.* **2005**, *40* (6), 485–493. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agh196>.
 63. Ambade, A.; Mandrekar, P. Oxidative Stress and Inflammation: Essential Partners in Alcoholic Liver Disease. *Int J Hepatol* **2012**, *5*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2012/853175>.
 64. Thiele, G.; Duryee, M.; Willis, M.; Sorrell, M.; Freeman, T.; Tuma, D.; Klassen, L. Malondialdehyde-Acetaldehyde (MAA) Modified Proteins Induce pro-Inflammatory and pro-Fibrotic Responses by Liver Endothelial Cells. *Comp. Hepatol.* **2004**, *3* (1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/1476-5926-2-S1-S25>.
 65. LoPachin, R. M.; DeCaprio, A. P. Protein Adduct Formation as a Molecular Mechanism in Neurotoxicity. *Toxicol. Sci.* **2005**, *86* (2), 214–225. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi197>.
 66. Roy, D. R.; Sarkar, U.; Chattaraj, P. K.; Mitra, A.; Padmanabhan, J.; Parthasarathi, R.; Subramanian, V.; Van Damme, S.; Bultinck, P. Analyzing Toxicity Through Electrophilicity. *Mol. Divers.* **2006**, *10* (2), 119–131. <https://doi.org/10.1007/s11030-005-9009-x>.
 67. Srivastava, A.; Maggs, J. L.; Antoine, D. J.; Williams, D. P.; Smith, D. A.; Park, B. K. Role of Reactive Metabolites in Drug-Induced Hepatotoxicity. *Handb Exp Pharmacol* **2010**, *196* (196), 165–194. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00663-0_7.
 68. Thiele, G. M.; Duryee, M. J.; Hunter, C. D.; England, B. R.; Fletcher, B. S.;

- Daubach, E. C.; Pospisil, T. P.; Klassen, L. W.; Mikuls, T. R. Immunogenic and Inflammatory Responses to Citrullinated Proteins Are Enhanced Following Modification with Malondialdehyde-Acetaldehyde Adducts. *Int. Immunopharmacol.* **2020**, *83*, 106433. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106433>.
69. Tuma, D. J. Role of Malondialdehyde-Acetaldehyde Adducts in Liver Injury. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *32* (4), 303–308. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00742-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00742-0).
70. Thiele, G. M.; Klassen, L. W.; Tuma, D. J. Formation and Immunological Properties of Aldehyde-Derived Protein Adducts Following Alcohol Consumption. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *447*, 235–257. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-242-7_17.
71. Sapkota, M.; Wyatt, T. Alcohol, Aldehydes, Adducts and Airways. *Biomolecules* **2015**, *5* (4), 2987–3008. <https://doi.org/10.3390/biom5042987>.
72. Jokelainen, K.; Parkkila, S.; Salaspuro, M.; Niemelä, O. Covalent Adducts of Proteins with Acetaldehyde in the Liver as a Result of Acetaldehyde Administration in Drinking Water. *J. Hepatol.* **2000**, *33* (6), 926–932. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(00\)80124-5](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(00)80124-5).
73. Martinon, F.; Burns, K.; Tschopp, J. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of ProIL- β . *Mol. Cell.* **2002**, *10* (2), 417–426. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00599-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00599-3).
74. Bhargava, P.; Lee, C. H. Role and Function of Macrophages in the Metabolic Syndrome. *Biochem. J.* **2012**, *442* (2), 253–262. <https://doi.org/10.1042/BJ20111708>.
75. Nallagangula, K. S.; Nagaraj, S. K.; Venkataswamy, L.; Chandrappa, M. Liver Fibrosis: A Compilation on the Biomarkers Status and Their Significance during Disease Progression. *Future Sci. OA* **2018**, *4* (1). <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0083>.

76. Luedde, T.; Schwabe, R. F. NF- κ B in the Liver-Linking Injury, Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2011**, *8* (2), 108–118. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.213>.
77. Ghosh, S.; May, M. J.; Kopp, E. B. NF- κ B and Rel Proteins: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, *16* (1), 225–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.225>.
78. Dixon, L. J.; Barnes, M.; Tang, H.; Pritchard, M. T.; Nagy, L. E. Kupffer Cells in the Liver. *Compr. Physiol.* **2013**, *3* (2), 785–797. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120026>.
79. Roberts, R. A.; Ganey, P. E.; Ju, C.; Kamendulis, L. M.; Rusyn, I.; Klaunig, J. E. Role of the Kupffer Cell in Mediating Hepatic Toxicity and Carcinogenesis. *Toxicol. Sci.* **2007**, *96* (1), 2–15. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl173>.
80. Wynn, T. A.; Barron, L. Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Semin Liver Dis.* **2010**, *30* (3), 245–257. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1255354>.
81. Marra, F.; Tacke, F. Roles for Chemokines in Liver Disease. *Gastroenterology*. W.B. Saunders 2014. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.06.043>.
82. Heymann, F.; Tacke, F. Immunology in the Liver-from Homeostasis to Disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2016**, *13* (2), 88–110. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.200>.
83. Huang, H.; Tohme, S.; Al-Khafaji, A. B.; Tai, S.; Loughran, P.; Chen, L.; Wang, S.; Kim, J.; Billiar, T.; Wang, Y.; Tsung, A. Damage-Associated Molecular Pattern-Activated Neutrophil Extracellular Trap Exacerbates Sterile Inflammatory Liver Injury. *Hepatology* **2015**, *62* (2), 600–614. <https://doi.org/10.1002/hep.27841>.
84. McDonald, B.; Pittman, K.; Menezes, G. B.; Hirota, S. A.; Slaba, I.; Waterhouse, C. C. M.; Beck, P. L.; Muruve, D. A.; Kubes, P. Intravascular Danger Signals Guide Neutrophils to Sites of Sterile Inflammation. *Science* **2010**, *330* (6002),

- 362–366. <https://doi.org/10.1126/science.1195491>.
85. Neubauer, K.; Ritzel, A.; Saile, B.; Ramadori, G. Decrease of Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule 1-Gene-Expression in Inflammatory Cells and in Endothelial Cells in the Rat Liver Following CCl₄-Administration and in Vitro after Treatment with TNF α . *Immunol. Lett.* **2000**, *74* (2), 153–164. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(00\)00203-0](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(00)00203-0).
86. Knittel, T.; Mehde, M.; Kobold, D.; Saile, B.; Dinter, C.; Ramadori, G. Expression Patterns of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Parenchymal and Non-Parenchymal Cells of Rat Liver: Regulation by TNF- α and TGF-B1. *J. Hepatol.* **1999**, *30* (1), 48–60. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(99\)80007-5](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(99)80007-5).
87. Greenhalgh, S. N.; Thompson, A. I.; Henderson, N. C.; Iredale, J. P. Oxidative Stress and Liver Inflammation. In *Studies on Hepatic Disorders.*; Humana Press, Cham, 2015; pp 123–147. https://doi.org/10.1007/978-3-319-15539-5_6.
88. Arii, S.; Imamura, M. Physiological Role of Sinusoidal Endothelial Cells and Kupffer Cells and Their Implication in the Pathogenesis of Liver Injury. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* **2000**, *7* (1), 40–48. <https://doi.org/10.1007/s005340050152>.
89. Li, P.; He, K.; Li, J.; Liu, Z.; Gong, J. The Role of Kupffer Cells in Hepatic Diseases. *Mol. Immunol.* **2017**, *85*, 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.02.018>.
90. Wen, Y.; Lambrecht, J.; Ju, C.; Tacke, F. Hepatic Macrophages in Liver Homeostasis and Diseases-Diversity, Plasticity and Therapeutic Opportunities. *Cell. Mol. Immunol.* **2021**, *18* (1), 45–56. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00558-8>.
91. Robinson, M. W.; Harmon, C.; O'Farrelly, C. Liver Immunology and Its Role in Inflammation and Homeostasis. *Cell. Mol. Immunol.* **2016**, *13* (3), 267–276. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.3>.

92. Tapia, G.; Fernández, V.; Varela, P.; Cornejo, P.; Guerrero, J.; Videla, L. A. Thyroid Hormone-Induced Oxidative Stress Triggers Nuclear Factor-KB Activation and Cytokine Gene Expression in Rat Liver. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, *35* (3), 257–265. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00209-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00209-0).
93. Tapia, G.; Fernández, V.; Pino, C.; Ardiles, R.; Videla, L. A. The Acute-Phase Response of the Liver in Relation to Thyroid Hormone-Induced Redox Signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *40* (9), 1628–1635. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.033>.
94. Fernández, V.; Reyes, S.; Bravo, S.; Sepúlveda, R.; Romanque, P.; Santander, G.; Castillo, I.; Varela, P.; Tapia, G.; Videla, L. A. Involvement of Kupffer Cell-Dependent Signaling in T3-Induced Hepatocyte Proliferation in Vivo. *Biol. Chem.* **2007**, *388* (8), 831–837. <https://doi.org/10.1515/BC.2007.101>.
95. Ghosh, S.; Karin, M. Missing Pieces in the NF-KB Puzzle. *Cell* **2002**, *109* (2), 81–96. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00703-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00703-1).
96. De Boer, W. I.; Alagappan, V. K. T.; Sharma, H. S. Molecular Mechanisms in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Potential Targets for Therapy. *Cell Biochem. Biophys.* **2007**, *47* (1), 131–147. <https://doi.org/10.1385/cbb:47:1:131>.
97. Hayakawa, M.; Miyashita, H.; Sakamoto, I.; Kitagawa, M.; Tanaka, H.; Yasuda, H.; Karin, M.; Kikugawa, K. Evidence That Reactive Oxygen Species Do Not Mediate NF-KB Activation. *EMBO J.* **2003**, *22* (13), 3356–3366. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg332>.
98. Solan, N. J.; Miyoshi, H.; Carmona, E. M.; Bren, G. D.; Paya, C. V. RelB Cellular Regulation and Transcriptional Activity Are Regulated by P100. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (2), 1405–1418. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109619200>.
99. Tang, J.-R.; Michaelis, K. A.; Nozik-Grayck, E.; Seedorf, G. J.; Hartman-Filson, M.; Abman, S. H.; Wright, C. J. The NF-KB Inhibitory Proteins I κ B α and I κ B β Mediate Disparate Responses to Inflammation in Fetal Pulmonary Endothelial Cells. *J Immunol.* **2013**, *190* (6), 2913–2923.

- <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202670>.
100. Park, G.; Christman, J. Nuclear Factor Kappa B Is a Promising Therapeutic Target in Inflammatory Lung Disease. *Curr Drug Targets* **2006**, *7* (6), 661–668. <https://doi.org/10.2174/138945006777435317>.
 101. Chen, L. W.; Egan, L.; Li, Z. W.; Greten, F. R.; Kagnoff, M. F.; Karin, M. The Two Faces of IKK and NF-KB Inhibition: Prevention of Systemic Inflammation but Increased Local Injury Following Intestinal Ischemia-Reperfusion. *Nat Med.* **2003**, *9* (5), 575–581. <https://doi.org/10.1038/nm849>.
 102. Yang, J. Y.; Zhong, Y. Te; Hao, W. N.; Liu, X. X.; Shen, Q.; Li, Y. F.; Ren, S.; Wang, Z.; Li, W.; Zhao, L. C. The PI3K/Akt and NF-KB Signaling Pathways Are Involved in the Protective Effects of Lithocarpus Polystachyus(Sweet Tea) on APAP-Induced Oxidative Stress Injury in Mice. *RSC Adv.* **2020**, *10* (31), 18044–18053. <https://doi.org/10.1039/d0ra00020e>.
 103. Namineni, S.; O'Connor, T.; Faure-Dupuy, S. A Dual Role for Hepatocyte-Intrinsic Canonical NF-KB Signaling in Virus Control. *J. Hepatol.* **2020**, *72* (5), 960–975. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.12.019>.
 104. Baldwin, J. The Transcription Factor NF-KB and Human Disease. *J. Clin. Investig.* **2001**, *107* (1), 3–6. <https://doi.org/10.1172/jci11891>.
 105. Wong, E. T.; Tergaonkar, V. Roles of NF-KB in Health and Disease: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Clin. Sci.* **2009**, *116* (6), 451–465. <https://doi.org/10.1042/CS20080502>.
 106. Beinke, S.; Ley, S. C. Functions of NF-KB1 and NF-KB2 in Immune Cell Biology. *Biochem. J.* **2004**, *382* (2), 393–409. <https://doi.org/10.1042/BJ20040544>.
 107. Karin, M.; Greten, F. R. NF-KB: Linking Inflammation and Immunity to Cancer Development and Progression. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5* (10), 749–759. <https://doi.org/10.1038/nri1703>.
 108. Luedde, T.; Trautwein, C. Intracellular Survival Pathways in the Liver. *Liver Int.*

- 2006, 26 (10), 1163–1174. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2006.01366.x>.
109. Malhi, H.; Gores, G. J.; Lemasters, J. J. Apoptosis and Necrosis in the Liver: A Tale of Two Deaths? *Hepatology* **2006**, 43 (2), 31–44. <https://doi.org/10.1002/hep.21062>.
110. Triantafyllou, E.; Woollard, K. J.; McPhail, M. J. W.; Antoniadou, C. G.; Possamai, L. A. The Role of Monocytes and Macrophages in Acute and Acute-on-Chronic Liver Failure. *Front. Immunol.* **2018**, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02948>.
111. Gehrke, N.; Hövelmeyer, N.; Waisman, A.; Straub, B. K.; Weinmann-Menke, J.; Wörns, M. A.; Galle, P. R.; Schattenberg, J. M. Hepatocyte-Specific Deletion of IL1-RI Attenuates Liver Injury by Blocking IL-1 Driven Autoinflammation. *J.Hepatol.* **2018**, 68 (5), 986–995. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.008>.
112. Barbier, L.; Ferhat, M.; Salamé, E.; Robin, A.; Herbelin, A.; Gombert, J. M.; Silvain, C.; Barbarin, A. Interleukin-1 Family Cytokines: Keystones in Liver Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.* **2019**, 10 (AUG). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02014>.
113. de Menezes, M. N.; Salles, É. M.; Vieira, F. IL-1 α Promotes Liver Inflammation and Necrosis during Blood-Stage Plasmodium Chabaudi Malaria. *Sci. Rep.* **2019**, 9 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44125-2>.
114. Sultan, M.; Ben-Ari, Z.; Masoud, R.; Pappo, O.; Harats, D.; Kamari, Y.; Safran, M. Interleukin-1 α and Interleukin-1 β Play a Central Role in the Pathogenesis of Fulminant Hepatic Failure in Mice. *PLOS ONE* **2017**, 12 (9), e0184084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184084>.
115. Manna, F. A.; Abdel-Wahhab, K. G. Physiological Potential of Cytokines and Liver Damages. *Hepatoma Res.* **2016**, 2 (6), 131–139. <https://doi.org/10.20517/2394-5079.2015.58>.
116. Kawaratani, H.; Tsujimoto, T.; Douhara, A.; Takaya, H.; Moriya, K.; Namisaki, T.; Noguchi, R.; Yoshiji, H.; Fujimoto, M.; Fukui, H. The Effect of Inflammatory

- Cytokines in Alcoholic Liver Disease. *Mediators Inflamm.* **2013**, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/495156>.
117. Zimmermann, H. W.; Seidler, S.; Gassler, N.; Nattermann, J.; Luedde, T.; Trautwein, C.; Tacke, F. Interleukin-8 Is Activated in Patients with Chronic Liver Diseases and Associated with Hepatic Macrophage Accumulation in Human Liver Fibrosis. *PLOS ONE* **2011**, 6 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021381>.
118. Polyak, S. J.; Khabar, K. S. A.; Rezeiq, M.; Gretch, D. R. Elevated Levels of Interleukin-8 in Serum Are Associated with Hepatitis C Virus Infection and Resistance to Interferon Therapy. *J. Virol.* **2001**, 75 (13), 6209–6211. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.13.6209-6211.2001>.
119. Kitazawa, T.; Nakatani, Y.; Fujimoto, M.; Tamura, N.; Uemura, M.; Fukui, H. The Production of Tumor Necrosis Factor-Alpha by Macrophages in Rats With Acute Alcohol Loading. *Alcohol.Clin. Exp. Res.* **2003**, 27 (1), 72–75. <https://doi.org/10.1097/01.alc.0000078611.55696.f0>.
120. Tiegs, G. Cellular and Cytokine-Mediated Mechanisms of Inflammation and Its Modulation in Immune-Mediated Liver Injury. *Z Gastroenterol.* **2007**, 45 (1), 63–70. <https://doi.org/10.1055/s-2006-927397>.
121. Medler, J.; Wajant, H. Tumor Necrosis Factor Receptor-2 (TNFR2): An Overview of an Emerging Drug Target. *Expert Opin Ther Targets.* **2019**, 23 (4), 295–307. <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1586886>.
122. Park, P. H.; Thakur, V.; Pritchard, M. T.; McMullen, M. R.; Nagy, L. E. Regulation of Kupffer Cell Activity during Chronic Ethanol Exposure: Role of Adiponectin. In *J Gastroenterol. Hepatol.*; Blackwell Publishing, 2006; Vol. 21. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04580.x>.
123. Ghabril, M.; Bonkovsky, H. L.; Kum, C.; Davern, T.; Hayashi, P. H.; Kleiner, D. E.; Serrano, J.; Rochon, J.; Fontana, R. J.; Bonacini, M. Liver Injury From Tumor Necrosis Factor- α Antagonists: Analysis of Thirty-Four Cases. *Clin.*

- Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *11* (5). <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.12.025>.
124. French, J. B.; Bonacini, M.; Ghabril, M.; Foureau, D.; Bonkovsky, H. L. Hepatotoxicity Associated with the Use of Anti-TNF- α Agents. *Drug Saf* **2016**, *39* (3), 199–208. <https://doi.org/10.1007/s40264-015-0366-9>.
125. Wen, Y. A.; Liu, D.; Zhou, Q. Y.; Huang, S. F.; Luo, P.; Xiang, Y.; Sun, S.; Luo, D.; Dong, Y. F.; Zhang, L. P. Biliary Intervention Aggravates Cholestatic Liver Injury, and Induces Hepatic Inflammation, Proliferation and Fibrogenesis in BDL Mice. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2011**, *63* (3), 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.01.006>.
126. Fujita, T.; Narumiya, S. Roles of Hepatic Stellate Cells in Liver Inflammation: A New Perspective. *Inflamm Regen* **2016**, *36* (1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s41232-016-0005-6>.
127. Desmoulière, A. Hepatic Stellate Cells: The Only Cells Involved in Liver Fibrogenesis? A Dogma Challenged. *Gastroenterology* **2007**, *132* (5), 2059–2062. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.075>.
128. Kisseleva, T.; Brenner, D. A. Hepatic Stellate Cells and the Reversal of Fibrosis. In *J. Gastroenterol. Hepatol.*; Blackwell Publishing, 2006; Vol. 21. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04584.x>.
129. Watanabe, T.; Tajima, H.; Hironori, H.; Nakagawara, H. Sodium Valproate Blocks the Transforming Growth Factor (TGF)-B1 Autocrine Loop and Attenuates the TGF-B1-Induced Collagen Synthesis in a Human Hepatic Stellate Cell Line. *Int. J. Mol. Med.* **2011**, *28* (6), 919–925. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2011.768>.
130. Aoki, H.; Ohnishi, H.; Hama, K.; Ishijima, T.; Satoh, Y.; Hanatsuka, K.; Ohashi, A.; Wada, S.; Miyata, T.; Kita, H.; Yamamoto, H.; Osawa, H.; Sato, K.; Tamada, K.; Yasuda, H.; Mashima, H.; Sugano, K. Autocrine Loop between TGF- β 1 and IL-1 β through Smad3- and ERK-Dependent Pathways in Rat Pancreatic Stellate Cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **2006**, *290* (4), C1100–C1108.

- <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00465.2005>.
131. Kwak, H. J.; Park, M. J.; Cho, H.; Park, C. M.; Moon, S. I.; Lee, H. C.; Park, I. C.; Kim, M. S.; Rhee, C. H.; Hong, S. Il. Transforming Growth Factor-B1 Induces Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Expression via Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase and Sp1 in Human Fibrosarcoma Cells. *Mol. Cancer Res.* **2006**, *4* (3), 209–220. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0140>.
 132. Hemmann, S.; Rgen Graf, J.; Roderfeld, M.; Roeb, E. Expression of MMPs and TIMPs in Liver Fibrosis-a Systematic Review with Special Emphasis on Anti-Fibrotic Strategies. *J. Hepatol.* **2007**, *46* (5), 955–975. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.02.003>.
 133. Shmarakov, I. O.; Jiang, H.; Liu, J.; Fernandez, E. J.; Blaner, W. S. Hepatic Stellate Cell Activation: A Source for Bioactive Lipids. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **2019**, *1864* (5), 629–642. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.02.004>.
 134. Hernández-Gea, V.; Ghiassi-Nejad, Z.; Rozenfeld, R.; Gordon, R.; Fiel, M. I.; Yue, Z.; Czaja, M. J.; Friedman, S. L. Autophagy Releases Lipid That Promotes Fibrogenesis by Activated Hepatic Stellate Cells in Mice and in Human Tissues. *Gastroenterology* **2012**, *142* (4), 938–946. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.044>.
 135. Daujatz-Chavanieu, M.; Gerbal-Chaloin, S. Regulation of CAR and PXR Expression in Health and Disease. *Cells* **2020**, *9* (11). <https://doi.org/10.3390/cells9112395>.
 136. Arteel, G. E.; Naba, A. The Liver Matrisome – Looking beyond Collagens. *JHEP Reports* **2020**, *2* (4), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100115>.
 137. Bedossa, P.; Paradis, V. Liver Extracellular Matrix in Health and Disease. *J. Pathol.* **2003**, *200* (4), 504–515. <https://doi.org/10.1002/path.1397>.
 138. El-Mihi, K. A.; Kenawy, H. I.; El-Karef, A.; Elsherbiny, N. M.; Eissa, L. A.

- Naringin Attenuates Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis in Rats through Modulation of the PI3K/Akt Pathway. *Life Sci.* **2017**, *187*, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.08.019>.
139. Mormone, E.; George, J.; Nieto, N. Molecular Pathogenesis of Hepatic Fibrosis and Current Therapeutic Approaches. *Chem. Biol. Interact.* **2011**, *193* (3), 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.07.001>.
140. Natarajan, V.; Harris, E. N.; Kidambi, S. SECs (Sinusoidal Endothelial Cells), Liver Microenvironment, and Fibrosis. *Biomed Res. Int.* **2017**, *2017*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/4097205>.
141. Степанов, Ю.; Філіппова, О. Стеатоз і Стеатогепатит - Тригери Печінкового Фіброгенезу? *Гастроентерологія* **2013**, *2* (48), 97–106.
142. McQuitty, C. E.; Williams, R.; Chokshi, S.; Urbani, L. Immunomodulatory Role of the Extracellular Matrix Within the Liver Disease Microenvironment. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1–33. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.574276>.
143. Michalopoulos, G. K. Liver Regeneration after Partial Hepatectomy: Critical Analysis of Mechanistic Dilemmas. *Am. J. Pathol.* **2010**, *176* (1), 2–13. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090675>.
144. Zhang, W.; Chen, X. P.; Zhang, W. G.; Zhang, F.; Xiang, S.; Dong, H. H.; Zhang, L. Hepatic Non-Parenchymal Cells and Extracellular Matrix Participate in Oval Cell-Mediated Liver Regeneration. *WJG* **2009**, *15* (5), 552–560. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.552>.
145. Friedman, S. L.; Tsuchida, T. Mechanisms of Hepatic Stellate Cell Activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2017**, *14* (7), 397–411.
146. Tao, Y.; Wang, M.; Chen, E.; Tang, H. Liver Regeneration: Analysis of the Main Relevant Signaling Molecules. *Mediators Inflamm.* **2017**, *2017*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/4256352>.
147. Marshall, K. M.; He, S.; Zhong, Z.; Atkinson, C.; Tomlinson, S. Dissecting the Complement Pathway in Hepatic Injury and Regeneration with a Novel Protective

- Strategy. *JEM* **2014**, *211* (9), 1793–1805. <https://doi.org/10.1084/jem.20131902>.
148. Bangru, S.; Kalsotra, A. Cellular and Molecular Basis of Liver Regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2020**, *100*, 74–87. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.12.004>.
149. LeCouter, J.; Moritz, D. R.; Li, B.; Phillips, G. L.; Liang, X. H.; Gerber, H. P.; Hillan, K. J.; Ferraral, N. Angiogenesis-Independent Endothelial Protection of Liver: Role of VEGFR-1. *Science* **2003**, *299* (5608), 890–893.
150. Lee, D. C.; Sunnarborg, S. W.; Hinkle, C. L.; Myers, T. J.; Stevenson, M.; Russell, W. E.; Castner, B. J.; Gerhart, M. J.; Paxton, R. J.; Black, R. A.; Chang, A.; Jackson, L. F. TACE/ADAM17 Processing of EGFR Ligands Indicates a Role as a Physiological Convertase. In *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; New York Academy of Sciences, 2003; Vol. 995, pp 22–38. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb03207.x>.
151. Michalopoulos, G. K.; Bhushan, B. Liver Regeneration: Biological and Pathological Mechanisms and Implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2021**, *18* (1), 40–55. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0342-4>.
152. Mead, J. E.; Fausto, N. Transforming Growth Factor α May Be a Physiological Regulator of Liver Regeneration by Means of an Autocrine Mechanism. *PNAS* **1989**, *86* (5), 1558–1562.
153. Hoffmann, K.; Nagel, A. J.; Tanabe, K.; Fuchs, J.; Dehlke, K.; Ghamarnejad, O.; Lemekhova, A.; Mehrabi, A. Markers of Liver Regeneration - The Role of Growth Factors and Cytokines: A Systematic Review. *BMC Surg.* **2020**, *20* (1). <https://doi.org/10.1186/s12893-019-0664-8>.
154. Huang, W.; Ma, K.; Zhang, J.; Qatanani, M.; Cuvillier, J.; Liu, J.; Dong, B.; Huang, X.; Moore, D. D. Nuclear Receptor-Dependent Bile Acid Signaling Is Required for Normal Liver Regeneration. *Science* **2006**, *312* (5771), 233–236. <https://doi.org/10.1126/science.1121435>.
155. Cruise, J. L. A1-Receptors in Liver Regeneration. *Dig. Dis. Sci.* **1991**, *36* (4),

- 485–488. <https://doi.org/10.1007/BF01298880>.
156. Bockhorn, M.; Goralski, M.; Prokofiev, D.; Dammann, P.; Grünewald, P.; Trippler, M.; Biglarnia, A.; Kamler, M.; Niehues, E. M.; Frilling, A.; Broelsch, C. E.; Schlaak, J. F. VEGF Is Important for Early Liver Regeneration After Partial Hepatectomy. *J. Surg. Res.* **2007**, *138* (2), 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.07.027>.
157. Enguita-Germán, M.; Fortes, P. Targeting the Insulin-like Growth Factor Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *World J. Hepatol.* **2014**, *6* (10), 716–737. <https://doi.org/10.4254/wjh.v6.i10.716>.
158. Childs, J. F. L.; Siegler, E. A. Compounds for Control of Orange Decays. *Science* **1945**, *102* (2638), 68. <https://doi.org/10.1126/science.102.2638.68>.
159. Akhtar, T.; Sheikh, N. An Overview of Thioacetamide-Induced Hepatotoxicity. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **2013**, *32* (3), 43–46. <https://doi.org/10.3109/15569543.2013.805144>.
160. Hajovsky, H.; Gang, H.; Yakov, K.; Diganta, S.; Wenqi, C.; David, S.; Moore, J.; L, S.; Robert, P. H. Metabolism and Toxicity of Thioacetamide and Thioacetamide S-Oxide in Rat Hepatocytes. *Chem Res Toxicol.* **2012**, *25* (9), 1955–1963. <https://doi.org/10.1021/tx3002719>.
161. Wallace, M. C.; Hamesch, K.; Lunova, M.; Kim, Y.; Weiskirchen, R.; Strnad, P.; Friedman, S. L. Standard Operating Procedures in Experimental Liver Research: Thioacetamide Model in Mice and Rats. *Lab. Anim.* **2015**, *49* (1), 21–29. <https://doi.org/10.1177/0023677215573040>.
162. Prabha, S. P.; Ansil, P. N.; Nitha, A.; Wills, P. J.; Latha, M. S. Preventive and Curative Effect of Methanolic Extract of *Gardenia Gummifera* Linn. f. on Thioacetamide Induced Oxidative Stress in Rats. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* **2012**, *2* (2), 90–98. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60023-1](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60023-1).
163. Hajovsky, H.; Hu, G.; Koen, Y.; Sarma, D.; Cui, W.; Moore, D. S.; Staudinger, J. L.; Hanzlik, R. P. Metabolism and Toxicity of Thioacetamide and

- Thioacetamide S-Oxide in Rat Hepatocytes. *Chem Res Toxicol.* **2012**, *25* (9), 1955–1963. <https://doi.org/10.1021/tx3002719>.
164. Rahman, T. M.; Hodgson, H. J. F. The Effects of Early and Late Administration of Inhibitors of Inducible Nitric Oxide Synthase in a Thioacetamide-Induced Model of Acute Hepatic Failure in the Rat. *J. Hepatol.* **2003**, *38* (5), 583–590. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(03\)00050-3](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(03)00050-3).
165. Ganesh, K. N.; Krishnan, Y. Nucleic Acids - Chemistry and Applications. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (24), 12283–12287. <https://doi.org/10.1021/jo402730c>.
166. Lyttleton, J. W. Nucleic Acids: What They Are and What They Do. *N Z Vet J* **1967**, *15* (7), 122–128. <https://doi.org/10.1080/00480169.1967.33709>.
167. Lee, C. H.; Kim, J. H.; Lee, S. W. Prospects for Nucleic Acid-Based Therapeutics against Hepatitis C Virus. *World J. Gastroenterol.* **2013**, *19* (47), 8949–8962. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i47.8949>.
168. Mescalchin, A.; Restle, T. Oligomeric Nucleic Acids as Antivirals. *Molecules* **2011**, *16* (2), 1271–1296. <https://doi.org/10.3390/molecules16021271>.
169. Bunka, D. H. J.; Stockley, P. G. Aptamers Come of Age - At Last. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4* (8), 588–596. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1458>.
170. Keefe, A. D.; Pai, S.; Ellington, A. Aptamers as Therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* Nature Publishing Group July 2010, pp 537–550. <https://doi.org/10.1038/nrd3141>.
171. Morris, K. N.; Jensen, K. B.; Julin, C. M.; Weil, M.; Gold, L. High Affinity Ligands from in Vitro Selection: Complex Targets. *PNAS* **1998**, *95* (6), 2902–2907. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.2902>.
172. Patel, D. J.; Suri, A. K. Structure, Recognition and Discrimination in RNA Aptamer Complexes with Cofactors, Amino Acids, Drugs and Aminoglycoside Antibiotics. *J Biotechnol.* **2000**, *74* (1), 39–60.
173. Gragoudas, E. S.; Adamis, A. P.; Cunningham, E. T.; Feinsod, M.; Guyer, D. R. Pegaptanib for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.*

- 2004**, 351 (27), 2805–2816. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa042760>.
174. Agrawal, N.; Dasaradhi, P. V. N.; Mohmmmed, A.; Malhotra, P.; Bhatnagar, R. K.; Mukherjee, S. K. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *MMBR* **2003**, 67 (4), 657–685. <https://doi.org/10.1128/membr.67.4.657-685.2003>.
175. Han, H. RNA Interference to Knock down Gene Expression. *Methods Mol. Biol.* **2018**, 1706, 293–302. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_16.
176. Wall, N. R.; Shi, Y. Small RNA: Can RNA Interference Be Exploited for Therapy? *Lancet*. Elsevier Limited October 25, 2003, pp 1401–1403. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14637-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14637-5).
177. Bobbin, M. L.; Rossi, J. J. RNA Interference (RNAi)-Based Therapeutics: Delivering on the Promise? *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **2016**, 56, 103–122. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103633>.
178. Олишевский, С. В.; Козак, В. В.; Яниш, Ю. В.; Рыбалко, С. Л.; Шляховенко, В. А. Иммуностимулирующая CpG-ДНК: Перспективы Клинического Применения в Онкологии. *Онкология* **2006**, 2 (8), 209–217.
179. Shmarakov, I. O.; Marchyshak, T. V.; Borschovetska, V. L.; Marchenko, M. M.; Tkachuk, Z. Y. Hepatoprotective Activity of Exogenous RNA. *Ukr. Biochem. J.* **2015**, 87 (4), 37–44. <https://doi.org/10.15407/ubj87.04.037>.
180. Щодрий, В. Б.; Козлов, О. В.; Рибенчук, А. О.; Бойко, В. В.; Бортницький, В. І.; Рябов, С. В.; Ткачук, З. Ю. Дослідження Продуктів Взаємодії РНК з Манітолом Методом Піролітичної Мас-Спектрометрії. *Доп. Нац. академ. наук Укр.* **2017**, 2, 79–87. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.02.079>.
181. Tkachuk, Z. Compound, Composition and Method for the Treatment of Inflammatory and Inflammatory-Related Disorders, March 26, 2001.
182. Ткачук, З. Ю. Вплив Препаратів Нуклеїнових Кислот На Агрегацію Тромбоцитів Людини in Vitro. *Доп. Нац. академ. наук Укр.* **2008**, No. 8, 164–168.
183. Ткачук, З. Спосіб Лікування Запальних Захворювань Та Пов'язаних з Ними

- Розладів Та Спосіб Покращення Рівня Показників Крові з Використанням Очищеної Дріжджової РНК, 2004.
184. Фролов, В. М.; Ткачук, З. Ю.; Круглова, О. В. Застосування Імуномодулятора Нуклеїнат у Клінічній Практиці. *Інфекційні хвороби* **2012**, 4, 82–90.
185. Вівчарик, М.; Ільченко, О.; Левченко, С.; Ткачук, З. Комплексоутворення РНК з Манітолом, Їого Спектральні Характеристики Та Біологічна Активність. *Доп. Нац. академ. наук Укр.* **2016**, 10, 78–83. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2016.10.078>.
186. Щодрий, В.; Качковський, О.; Слонівський, Ю.; Ткачук, З. Дослідження Взаємодії Манітолу з Нуклеозидами За Допомогою Флуоресцентного Зонда. *Доп. Нац. академ. наук Укр.* **2017**, 7, 85–90. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.07.085>.
187. Ткачук, З. Ю.; Рибалко, С. Л.; Дядюн, С. Т.; Старосила, Д. Б. Антигерпетична Активність Препарату Нуклекс. *Доп. Нац. академ. наук Укр.* **2011**, 4, 182–188.
188. Ткачук, З. .; Зарубаєв, В. В.; Семерникова, Л. І. Противірусна Дія Препарату Нуклекс На Віруси Грипу, Парагрипу Та Пташиного Грипу. *Укр. Мед. Алм.* **2011**, 14 (6), 209–212.
189. Melnichuk, N.; Kashuba, V.; Rybalko, S.; Tkachuk, Z. Complexes of Oligoribonucleotides with D-Mannitol Modulate the Innate Immune Response to Influenza A Virus H1N1 (A/FM/1/47) In Vivo. *Pharmaceuticals* **2018**, 11 (3). <https://doi.org/10.3390/ph11030073>.
190. Торопчин, В. І.; Ткачук, З. Ю. Концентрація Циркулюючих Імунних Комплексів Та Їх Молекулярний Склад у Хворих На Неалкогольний Стеатогепатит, Сполучений з Синтромом Хронічної Втоми При Застосуванні Комбінації Нуклекса Та Енерліва. *Укр. Мед. Алм.* **2011**, 14 (3), 162–166.

191. Торопчин, В. І. Вплив Комбінації Енерліву Та Нуклекса На Показники Перекисного Окислення Ліпідів у Хворих На Неалкогольний Стеатогепатит, Сполучений з Синдромом Хронічної Втоми. *Укр. Морфол. Алм.* **2011**, 1 (9), 124–128.
192. Фролов, В.; Соцька, Я.; Круглова, О.; Ткачук, З. Оцінка Ефективності Нуклексу в Лікуванні Хворих На Хронічний Вірусний Гепатит С. *Укр. Мед. Алм.* **2012**, 15, 157–164.
193. Shmarakov, I. O.; Borschovetska, V. L.; Marchenko, M. M.; Blaner, W. S. Retinoids Modulate Thioacetamide-Induced Acute Hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* **2014**, 139 (2), 284–292. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu045>.
194. Горальський, Л. П.; Хомич, В. Т.; Кононський, О. І. Основи Гістологічної Техніки і Морфофункціональні Методи Досліджень у Нормі Та При Патології. *Полісся* **2015**, 3, 72–74.
195. Reitman, S.; Frankel, S. A Colorimetric Method for the Determination of Serum Glutamic Oxalacetic and Glutamic Pyruvic Transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* **1957**, 28 (1), 56–63. <https://doi.org/10.1093/ajcp/28.1.56>.
196. Schierwagen, C.; Bylund-Fellenius, A. C.; Lundberg, C. Improved Method for Quantification of Tissue PMN Accumulation Measured by Myeloperoxidase Activity. *J Pharmacol Methods.* **1990**, 23 (3), 179–186. [https://doi.org/10.1016/0160-5402\(90\)90061-O](https://doi.org/10.1016/0160-5402(90)90061-O).
197. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal. Biochem.* **1979**, 95 (2), 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
198. Levine, R. L.; Garland, D.; Oliver, C. N.; Stadtman, E. R. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Meth. Enzymol.* **1990**, 7, 17–24. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H).
199. Murphy, M. E.; Kehrer, J. P. Oxidation State of Tissue Thiol Groups and Content of Protein Carbonyl Groups in Chickens with Inherited Muscular Dystrophy.

- Biochem. J.* **1989**, *1*, 33–38. <https://doi.org/10.1042/bj2600359>.
200. Ellman, G. L. Tissue Sulfhydryl Groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *3*, 84–89. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).
201. Waterborg, J. H.; Matthews, H. R. The Lowry Method for Protein Quantitation. *Proteins* **1984**, 1–4. <https://doi.org/10.1385/0-89603-062-8:1>.
202. Habig, W. H.; Pabst, M. J.; Jakoby, W. B. Glutathione S-Transferases. The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249* (22), 7130-7139.
203. Разыграев, А. В. Метод Определения Глутатионпероксидазной Активности с Использованием Пероксида Водорода и 5,5'-Дитиобис (2-Нитробензойной Кислоты). *Клинико-лабораторный консилиум* **2004**, *4*, 19–22.
204. Marchyshak, T.; Shmarakov, I.; Tkachuk, Z. Hepatoprotective Effect of Oligoribonucleotides-D-Mannitol Complexes under Thioacetamide-Induced Hepatotoxicity. In *Materials of XI annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine*; 2017; p 228.
205. Marchishak, T.; Tkachuk, Z.; Shmarakov, I. Hepatoprotective Effect of Oligoribonucleotides-D-Mannitol Complexes under Thioacetamide-Induced Hepatotoxicity; In *Proceedings of 3rd International Electronic Conference on Medicinal Chemistry*; MDPI: Basel, Switzerland, 2017; p 4695. <https://doi.org/10.3390/ecmc-3-04695>.
206. Marchyshak, T.; Yakovenko, T.; Shmarakov, I.; Tkachuk, Z. The Potential Protective Effect of Oligoribonucleotides-d-Mannitol Complexes against Thioacetamide-Induced Hepatotoxicity in Mice. *Pharmaceuticals* **2018**, *11* (3). <https://doi.org/10.3390/ph11030077>.
207. Chilakapati, J.; Shankar, K.; Korrapati, M. C.; Hill, R. A.; Mehendale, H. M. Saturation Toxicokinetics of Thioacetamide: Role in Initiation of Liver Injury. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33* (12), 1877–1885.

<https://doi.org/10.1124/dmd.105.005520>.

208. Lepedda, A. J.; Zinellu, A.; Nieddu, G.; Zinellu, E.; Carru, C.; Spirito, R.; Guarino, A.; De Muro, P.; Formato, M. Protein Sulfhydryl Group Oxidation and Mixed-Disulfide Modifications in Stable and Unstable Human Carotid Plaques. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**. <https://doi.org/10.1155/2013/403973>.
209. Poole, L. B. The Basics of Thiols and Cysteines in Redox Biology and Chemistry. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *80*, 148–157.
210. Зельоний, І. І.; Ткачук, З. Ю.; Афонін, Д. М.; Тютюнник, О. А.; України, Н. А. Н. Вплив Препарату Нуклекс На Цитокіновий Профіль Хворих На Цукровий Діабет 2 Типу з Нейропатичною Формою Синдрому Діабетичної Стопи. *Журнал Національної академії медичних наук України* **2014**, *20* (2), 240–245.
211. Марчишак, Т.; Яковенко, Т.; Ткачук, З. Вплив Комплексів Олігорибонуклеотидів з D-Манітолом На Експресію Генів При Гострій Тіоацетамід-Індукованій Гепатотоксичності. *Доп. Нац. академ. наук Укр.* **2018**, *1*, 96–102.
212. Dwivedi, D. K.; Jena, G.; Kumar, V. Dimethyl Fumarate Protects Thioacetamide-Induced Liver Damage in Rats: Studies on Nrf2, NLRP3, and NF- κ B. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2020**, *34* (6). <https://doi.org/10.1002/jbt.22476>.
213. Shmarakov, I. O.; Marchyshak, T. V.; Borschovetska, V. L.; Marchenko, M. M.; Tkachuk, Z. Y. Hepatoprotective Activity of Exogenous RNA. *Ukr. Biochem. J.* **2015**, *87* (4), 37–44. <https://doi.org/10.15407/ubj87.04.037>.
214. Marchyshak, T.; Yakovenko, T.; Tkachuk, Z. Effect of Oligoribonucleotides with D-Mannitol Complexes on Oxidative Stress Indicators against Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis. *ScienceRise:Biological Science* **2020**, *3* (24), 35–40. <https://doi.org/10.15587/2519-8025.2020.214418>.
215. Marchyshak, T.; Tkachuk, Z. Effect of Oligoribonucleotides-D-Mannitol Complexes on the Expression of pro-Inflammatory and Profibrotic Genes at the

- Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis. In *Матеріали VI науково-практичної конференції школи молодих науковців ПАТ «Фармак»*; 2018; pp 19–20.
216. Marchyshak, T.; Semernikova, L.; Yakovenko, T.; Tkachuk, Z. Hepatoprotective and Antioxidant Effects of Oligoribonucleotides-D-Mannitol Complexes against Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis. In *Proceedings of 4th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry*; MDPI: Basel, Switzerland, 2018; p 5624. <https://doi.org/10.3390/ecmc-4-05624>.
217. Parola, M.; Pinzani, M. Liver Fibrosis: Pathophysiology, Pathogenetic Targets and Clinical Issues. *Mol. Aspects Med.* **2019**, *65*, 37–55. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.09.002>.
218. Aydin, M. M.; Akcali, K. C. Liver Fibrosis. *Turk J Gastroenterol* **2018**, *29* (1), 14–21. <https://doi.org/10.5152/tjg.2018.17330>.
219. Марчишак, Т.; Яковенко, Т.; Ткачук, З. Вплив Комплексів Олігорибонуклеотидів з D-Манітолом На Експресію Прозапальних Та Профіброзних Генів При Тіоацетамід-Індукованому Печінковому Фіброзі. In *Матеріали XII українського біохімічного конгресу, Медична та клінічна хімія*; 2019; pp 215–216.
220. Marchyshak, T.; Yakovenko, T.; Semernikova, L.; Tkachuk, Z. Effect of Oligoribonucleotides-D-Mannitol Complexes on the Expression of pro-Inflammatory and Profibrotic Genes at the Thioacetamide Induced Liver Fibrosis. In *Materials of XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine*; 2018; p 145.
221. Shmarakov, I. O.; Borschovetska, V. L.; Marchenko, M. M.; Blaner, W. S. Retinoids Modulate Thioacetamide-Induced Acute Hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* **2014**, *139* (2), 284–292. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu045>.
222. Yuan, L.; Kaplowitz, N. Glutathione in Liver Diseases and Hepatotoxicity. *Mol. Aspects Med.* **2009**, *30* (1–2), 29–41.