



## ВІДГУК ОФЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

головного наукового співробітника ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» (м. Київ), д-ра мед. наук, член-кореспондента НАМН України

Бухтіарової Тетяни Анатоліївни на дисертаційну роботу

Бурлаки Кристини Анатоліївни

«Епігенетичні механізми побічної дії нестероїдних протизапальних засобів (експериментальне дослідження)», подану до захисту у разову спеціалізовану вчену раду ДФ 17.600.067 Запорізького державного медико-фармацевтичного університету МОЗ України, яка створена відповідно до наказу ректора Запорізького державного медико-фармацевтичного університету від 20.12.2023 року № 439 на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина»

**Актуальність теми дисертації.** Нестероїдні протизапальні лікарські засоби (НПЛЗ) є одними з найбільш поширених ліків, які призначаються у всьому світі. Вони складаються з групи препаратів, які використовуються при лихоманці, болю та запаленні, оскільки ці препарати володіють протизапальними, безпечними та жарознижувальними властивостями. З клінічної точки зору, вони корисні при запальних процесах різного генезу, застосовуються для полегшення болю при багатьох станах, починаючи від менструального та післяопераційного болю до болю при артриті, як симптоматичний засіб при лихоманці. В доступній опублікованій літературі є численні звіти про захисні ефекти НПЛЗ при онкологічних захворюваннях. В багатьох з цих досліджень, які носять епідеміологічний характер, ці препарати асоціювалися зі зниженим ризиком виникнення різних типів раку. Поруч з цим, існують повідомлення щодо здатності НПЛЗ підвищувати ризик виникнення раку, хоча їх кількість набагато менша порівняно з такими щодо захисних властивостей НПЛЗ. Епідеміологічними дослідженнями встановлена здатність НПЛЗ за тривалого застосування ініціювати неопластичні процеси у шлунку та кишківнику. Наразі дослідження ролі НПЛЗ у збільшенні ризику виникнення раку здебільшого є епігенетичними, а механізми, що лежать в основі підвищення ризику окреслені недостатньо чітко. Також залишається відкритим питання їхньої інформаційної цінності. Поруч з цим, відкритим залишається питання механізмів токсичних та притаманних НПЛЗ побічних ефектів, які в теперішній час не обмежуються інгібіцією циклооксигенази (ЦОГ-1 та ЦОГ-2). Зокрема, дослідженнями останнього п'ятиріччя показана здатність НПЛЗ негативно впливати на тонкі молекулярні ланцюги взаємозалежних антиоксидантної та прооксидантної систем, імунної системи, виступати у ролі потужних епігенетичних факторів, порушувати експресійну активність окремих генів.

В зв'язку з вищевикладеним, дослідження нових молекулярних та потенційних епігенетичних механізмів токсичних та побічних ефектів НПЛЗ при їх тривалому застосуванні як підґрунтя оптимізації їх медичного застосування та створення принципово нових препаратів з покращеними профілями ефективності та безпеки є важливою задачею медичної науки.

Спираючись на вищесказане, дисертаційна робота Бурлаки Кристини Анатоліївни, присвячена вирішенню наведених вище завдань, є актуальною та значущою з наукової і практичної точки зору.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота Бурлаки К.А. є фрагментом двох науково-дослідних тем кафедри клінічної лабораторної діагностики: «Дослідження факторів ендогенної цитопротекції та розробка нових ефективних шляхів діагностики та лікування захворювань серця та патології центральної нервової системи» (№ державної реєстрації 0118U004369), термін виконання 2017-2019 рр та «Коморбідні стани, серцево-судинні та онкологічні захворювання в загальноклінічній практиці: розробка сучасних діагностичних та лікувальних заходів» (№ державної

реєстрації 0120U101587), термін виконання 2019-2023 роки, де здобувач є одним з виконавців.

**Новизна дослідження та одержаних результатів.** Автором вперше, в умовах тривалого призначення досліджуваних НПЛЗ (диклофенак, індометацин, ацетилсаліцилова кислота, мелоксикам) лабораторним щурам, вивчено молекулярні механізми токсичних та побічних ефектів, які пов'язані з їх здатністю негативно впливати на антиоксидантно-прооксидантну, тіол-дисульфідну системи, обмін пуринів, концентрацію HSP70-білків, греліну. Встановлено, що досліджувані НПЛЗ за тривалого застосування здатні підсилювати процеси метилювання та фрагментації ДНК, порушувати експресію TL4-рецепторів та дизрегулювати синтез білків Wnt- і Hedgehog-сигналіngu та гену c-kit. У проведеному дослідженні вперше встановлена кореляція патобіохімічних та генетичних змін у тканинах кишківника з накопиченням маркерів їх пошкодження MMP8, фекального кальпротектину та загальним профілем ульцерогенної дії НПЛЗ.

Вперше встановлений кореляційний зв'язок фрагментації ДНК з окисненим глутатионом та MMP8. Показано, що фрагментація ДНК відіграє ключову роль у виникненні пошкоджень слизової оболонки кишківника, а вплив окисненого глутатиону та MMP8 на цей процес підкреслює складний характер регуляції. З огляду на вірогідні побічні ефекти НПЛЗ, це дослідження розкриває можливу роль MeDNA, нітритрозинов та фрагментації ДНК у патогенезі пошкоджень слизової оболонки кишківника. Доведено, що ступінь тяжкості ушкоджень шлунково-кишкового тракту (ШКТ) може бути охарактеризований потенційним впливом окисненого глутатиону та MMP8 на маркери цих процесів. Математично доведений вплив маркерів оксидативного та нітрозуючого стресу на процеси метилювання та фрагментації ДНК, а також їх сильний кореляційний зв'язок з дизрегуляцією синтезу білків Wnt- і Hedgehog-сигналіngu та гену c-kit.

Вперше проведений порівняльний аналіз сили впливу індометацину, диіклофенаку, ацетилсаліцилової кислоти та мелоксикаму на маркери оксидативного/нітрозуючого стресу, обміну пуринів, концентрацію HSP70-білків, греліну, ступінь пошкодження кишківника, ступінь метилювання та фрагментації ДНК, експресії TL4-рецепторів, концентрації білків Wnt- і Hedgehog-сигналіngu та c-kit гену. Показано різноспрямований характер ефектів НЗЛП.

Незважаючи на обмежену дію мелоксикаму на показники оксидативного, нітрозуючого стресів та його мінімальну ульцерогенну дію, встановлено статистично достовірний епігенетичний вплив препарату, а саме підвищення кількості метильованої та фрагментованої ДНК та дизрегуляції білоксинтезуючої функції генів Wnt- і Hedgehog-сигналіngu та гену c-kit.

**Теоретичне значення отриманих результатів.** Результати дисертаційної роботи науково обґрунтовують сучасні підходи до встановлення нових молекулярно-генетичних механізмів небажаної побічної дії НПЛЗ в умовах їх тривалого застосування на підставі комплексного дослідження показників оксидативного/нітрозуючого стресів, тіол-дисульфідної системи, обміну пуринів, концентрації HSP70-білків, греліну, маркерів пошкодження кишківника, а також вивчення процесів метилювання та фрагментації ДНК, експресії TL4-рецепторів та синтезу білків Wnt- і Hedgehog-сигналіngu, гену c-kit у лабораторних щурів.

**Практичне значення отриманих результатів.** Дисертаційна робота присвячена дослідженню фундаментальної проблеми фармакології, а саме встановленню нових механізмів побічних ефектів НПЛЗ (індометацин, диклофенак, ацетилсаліцилова кислота, мелоксикам) з різною селективністю до ЦОГ-1 та ЦОГ-2. Досліджені можливі молекулярно-епігенетичні шляхи реалізації їх побічної дії (маркери оксидативного/нітрозуючого стресу, обміну пуринів, концентрацію HSP70-білків, греліну, пошкодження кишківника, ступінь метилювання та фрагментації ДНК, експресії TL4-рецепторів, концентрації білків Wnt- Hedgehogсигналіngu та c-kit гену). Математично доведено вплив цих показників на реалізацію ульцерогенної дії досліджуваних НПЛЗ.

Сукупність отриманих даних має важливе значення, як для розвитку сучасних уявлень щодо механізмів побічної дії НПЛЗ так і для використання нових інформативних біохімічно-генетичних маркерів для скринінгу їх небажаних побічних ефектів. Крім того, нові уявлення щодо молекулярних механізмів побічних ефектів НПЛЗ в подальшому дозволять розробити ефективні фармакологічні та технологічні підходи для їх нівелювання.

Практичні рекомендації теоретично обґрунтовані і чітко викладені. Результати дослідження впроваджені в практику та використовуються в лікувально-діагностичній роботі у відділенні клініко-діагностичної лабораторії КНП «Міська лікарня №9» ЗМР та клініко-діагностичній лабораторії ННМЦ «Університетська клініка ЗДМФУ».

Теоретичні положення дослідження і практичні рекомендації впроваджено у практику навчання студентів медичних факультетів на кафедрі клінічної медицини Київського національного університету ім. Тараса Шевченка МОН України, кафедрі фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова МОЗ України, кафедрі фармакології Запорізького державного медико-фармацевтичного університету МОЗ України, кафедрі клінічної лабораторної діагностики НФаУ МОЗ України; кафедрі клінічної лабораторної діагностики Харківського національного медичного університету; в науковому процесі та роботі навчального медико-лабораторного центру Запорізького державного медико-фармацевтичного університету МОЗ України, лабораторії фармакології ефекторних органів і систем ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». Впровадження підтверджуються відповідними актами.

**Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.** Сформульовані в дисертації положення, висновки базуються на експериментальних дослідженнях, проведених на достатній кількості лабораторних тварин (75 шурів) із застосуванням сучасних адекватних фармакологічних, токсикологічних, біохімічних, імуноферментних, молекулярних та математико-статистичних методів дослідження. Всі дослідження узгоджені Комісією з питань біоетики Запорізького державного медико-фармацевтичного університету (протокол № 9 від 09.11.2023 року), не містять даних, які суперечать сучасним вимогам біоетики та морально-етичних норм.

Достовірність первинних матеріалів дисертації здобувача ступеня доктора філософії Бурлаки К.А. перевірена комісією у складі: д.мед.н., професор Усачова О.В. (голова); члени комісії: д.мед.н., професор Тертишний С.І. (медико-біологічний напрямок), головний метролог Ребець В.С., створеною наказом ректора ЗДМФУ № 343 від 03.10.2023 року «Про склад комісії з перевірки первинної науково-дослідної документації ЗДМФУ». Всі документи оформлені відповідно до існуючих вимог, результати досліджень оброблені з використанням сучасних методів статистичного аналізу на персональному комп'ютері. Первинна документація за обсягом та характером досліджень повністю відповідає даним, наведеним в дисертаційній роботі. Робота виконана на метрологічно повіреній дослідницькій апаратурі та повіреним інструментом. За результатами перевірки дослідницької апаратури видано Експертний метрологічний висновок № 361 від 14.11.2023 року. Зазначене дало можливість автору сформулювати об'єктивні висновки та рекомендації.

**Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях.** Основні положення дисертації повною мірою відображені в 8 наукових працях: 3 статті в наукових фахових виданнях України, 5 тез у матеріалах міжнародних і Всеукраїнських з'їздів і науково-практичних конференцій. Автор не використовував у своїй роботі ідеї та розробки співавторів публікацій.

**Зміст викладення матеріалів дисертації, її завершеність в цілому.** Дисертаційна робота викладена на 188 сторінках друкованого тексту, складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаної

літератури, який містить 228 джерел (10 – кирилицею, 218 – латиною) та 5 додатків. Дисертація ілюстрована 12 таблицями та 12 рисунками.

Дисертаційна робота представляє собою завершене наукове дослідження, в якому чітко визначені мета і завдання, правильно обрані методологічні і методичні інструменти, а також дотримана послідовність наукового пошуку, яка включає порівняльний аналіз отриманих даних. Дисертаційна робота побудована та оформлена відповідно до вимог Постанови Кабінету Міністрів України №44 від 12 січня 2022 р. «Порядок присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії»; в ній наявні усі необхідні структурні елементи.

**Анотація** написана українською та англійською мовами та в стислій формі відображає основні наукові положення та результати дисертації, демонструє наукову новизну та практичну значущість дослідження.

У **вступі** достатньо переконливо обґрунтовані доцільність вибору і актуальність теми наукового дослідження. Мету і завдання дослідження сформульовано чітко і конкретно. Дизайн дослідження логічний і послідовний.

**Розділ 1** (Огляд літератури) містить чотири підрозділи. У першому розглядаються основні молекулярні механізми розвитку небажаних побічних реакцій НПЛЗ. Другий підрозділ висвітлює вплив НПЛЗ на показники антиоксидантної та тіол-дисульфідної системи у тканинах шлунково-кишкового тракту. У третьому підрозділі ідеться про вплив НПЛЗ на фактори ендогенної цитопротекції (HSP 70) та маркерів пошкодження тканини (MMP8) у тканинах шлунково-кишкового тракту. Четвертий підрозділ підкреслює основний вплив НПЛЗ на процеси повногеномного метилування ДНК та її фрагментації, Toll-like рецептор-опосередковану побічну дію НПЛЗ. Огляд літератури завершується узагальненням, яке обґрунтовує вибір теми дисертаційного дослідження, його мету і завдання. У розділі аналітично оцінюється значна кількість вітчизняних та іноземних літературних джерел, викриті протиріччя в існуючих наукових дослідженнях та ідентифіковані проблемні питання, які потребують глибшого вивчення. Зміст предмету дисертаційного дослідження написаний в аналітичному ключі повноцінно.

У **Розділі 2** (Матеріали та методи дослідження) представлено дизайн дослідження, методи дослідження. В розділі також подано обґрунтування використання сучасних методів статистичної обробки даних, які відповідають поставленим завданням.

**Розділ 3** (Вплив тривалого введення НПЛЗ на токсичність, стан слизової оболонки кишківника, показники оксидативного та нітрозуючого стресів, метаболізм пуринів та сечової кислоти) складається з двох підрозділів. В першому наводяться результати макроскопічного дослідження ульцерогенної дії та вивчення окремих показників загальної токсичності НПЛЗ за їх тривалого введення. Другий підрозділ присвячений впливу тривалого введення НПЛЗ на розвиток оксидативного та нітрозуючого стресів, стан тіол-дисульфідної системи та метаболізм пуринів.

**Розділ 4** (Вплив нестероїдних протизапальних лікарських засобів на дослідження факторів ендогенної цитопротекції (HSP70), маркерів пошкодження тканини (MMP8) та маркерів APUD системи (грелін) та фекального кальпротектину) складається з чотирьох підрозділів, в яких здобувач описує вплив НПЛЗ за тривалого введення на синтез білків теплового шоку, вміст маркерів пошкодження тканин, вміст греліну та фекального кальпротектину.

У **розділі 5** (Вплив нестероїдних протизапальних лікарських засобів на метилування ДНК, TL4-рецептор, концентрацію молекулярних регуляторів Wnt- та Hedgehog-сигналіну, гену c-kit при їх тривалому застосуванні) здобувач доводить ключову роль фрагментації ДНК у виникненні пошкоджень слизової оболонки кишківника, обґрунтовує тісний зв'язок між процесами метилування/фрагментації ДНК та активацією TL4-рецепторів. Знайдений значущий кореляційний зв'язок між експресією білків Wnt- та

Hedgehog-сигналінгів вказує на можливу взаємодію цих сигнальних шляхів у клітинних процесах за тривалого застосування НПЛЗ.

**У розділі 6** (Аналіз та узагальнення результатів дослідження) здобувачем проведено обговорення отриманих в ході дослідження і представлених у попередніх розділах результатів у порівняльному аспекті з даними світової літератури.

**Висновки** дисертації чітко сформульовані, обґрунтовані та логічно витікають з поставлених завдань, відображають результати дослідження.

**Практичні рекомендації** містять реальні настанови для практичних лікарів та можуть бути легко імплементовані в рутинну клінічну практику.

**Зауваження до дисертації щодо її змісту та оформлення.**

Матеріал дисертації викладений логічно і послідовно, повною мірою відповідає на визначені метою та задачами питання. Робота відповідає існуючим вимогам за структурою, змістом та технічним оформленням. Істотні недоліки в дисертаційній роботі відсутні, хоча у тексті зустрічаються поодинокі друкарські помилки, невдалі формулювання, наприклад: «вплив тривалого введення НПЛЗ на розвиток оксидативного та нітрозуючого стресів...» (показники не вивчалися в динаміці, тому, на нашу думку, некоректно говорити про вплив на розвиток); «вплив НПЛЗ на дослідження...» (НПЛЗ не впливають на дослідження, а впливають на обрані показники); надмірне використання словосполучення «при їх тривалому використанні» (усі дослідження виконані лише за умов тривалого використання НПЛЗ, тому подібна акцентуація недоцільна). Виявлені недоліки не носять принципового характеру і ніяким чином не впливають на значущість і цінність проведеного дослідження.

Окрім зауважень, маю декілька запитань:

1. Які критерії були покладені в основу вибору для дослідження саме індометацину, диклофенаку, ацетилсаліцилової кислоти та мелоксикаму?
2. Обґрунтуйте, будь-ласка, обрану експозицію (доза та тривалість впливу)?
3. Які з вивчених біомаркерів Ви вважаєте за доцільне використовувати для прогнозування уражень кишківника при дії НПЛЗ, визначенні потенційного впливу НПЛЗ на онкогенез?
4. Чи можна на даному етапі спрогнозувати зміни у функціонуванні досліджених систем при використанні НПЛЗ за експериментальної патології (запалення, больовий синдром, пухлинний ріст)?

## ВИСНОВОК

Дисертаційна робота К.А. Бурлаки «Епігенетичні механізми побічної дії нестероїдних протизапальних засобів (експериментальне дослідження)», представлена на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина» є цілісним і завершеним науковим дослідженням. Ця дисертаційна робота, присвячена дослідженню нових молекулярних та можливих епігенетичних механізмів токсичних та побічних ефектів НПЛЗ при їх тривалому застосуванні, є актуальною для медичної науки у цілому, та сучасної фундаментальної фармакології зокрема. Робота являє собою самостійно виконану завершену наукову працю, яка проведена із застосуванням сучасних адекватних методів дослідження, має наукову новизну, практичну значимість, містить достовірні висновки. В дисертаційній роботі та в опублікованих наукових працях відсутні порушення академічної доброчесності.

Таким чином, дисертаційна робота К.А. Бурлаки «Епігенетичні механізми побічної дії нестероїдних протизапальних засобів (експериментальне дослідження)» повністю відповідає вимогам до оформлення дисертацій, затвердженим наказом Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 року № 40, та «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженому

Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року № 44,а її автор заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина», галузь знань 22 «Охорона здоров'я».

**Офіційний опонент:**

головний науковий співробітник

ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН

України» (м. Київ),

д-р мед. наук, член-кореспондент

НАМН України

Тетяна БУХТІАРОВА



На електронний документ накладено: 1 (Один) підписи чи печатки:  
На момент друку копії, підписи чи печатки перевірено:  
Програмний комплекс: eSign v. 2.3.0;  
Засіб кваліфікованого електронного підпису чи печатки: ПТ Користувач ЦСК-1  
Експертний висновок: №04/05/02-1277 від 09.04.2021;  
Цілісність даних: не порушена;

Підпис № 1 (реквізити підписувача та дані сертифіката)  
Підписувач: БУХТІАРОВА ТЕТЯНА АНАТОЛІВНА 1899904169;  
Належність до Юридічної особи: ФІЗИЧНА ОСОБА;  
Код юридичної особи в ЄДР: 1899904169;  
Серійний номер кваліфікованого сертифіката: 5E984D526F82F38F04000000233B44019416C504;  
Видавець кваліфікованого сертифіката: КНЕДП АЦСК АТ КБ "ПРИВАТБАНК";  
Тип носія особистого ключа: Незахищений;  
Тип підпису: Удосконалений;  
Сертифікат: Кваліфікований;  
Час та дата підпису (позначка часу для підпису): 11:20 30.01.2024;  
Чинний на момент підпису. Підтверджено позначкою часу для підпису від АЦСК (кваліфікованого надавача електронних довірчих послуг)  
Час та дата підпису (позначка часу для даних): 11:20 30.01.2024;  
Чинний на момент підпису. Підтверджено позначкою часу для даних від АЦСК (кваліфікованого надавача електронних довірчих послуг)