

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

завідувачки кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, д.мед.н., професора Волощук Наталії Іванівни 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, що створена відповідно до наказу ректора Запорізького державного медико-фармацевтичного університету від 20.12.2023 року № 439 на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина»

Актуальність теми дисертації. В арсеналі сучасних лікарських засобів, нестероїдні протизапальні лікарські засоби (НПЗЗ) займають одні з лідируючих позицій за показаннями до застосування, терапевтичної ефективності та відносної біобезпечності. Разом з цим, окрім терапевтичних переваг, НПЗЗ також можуть викликати небажані побічні ефекти, особливо при їх тривалому застосуванні. Останні десятиріччя розуміння молекулярних механізмів розвитку небажаних побічних ефектів НПЗЗ трансформувалась від пригнічення секреції гастропротективних простагландинів до тонких молекулярних механізмів модуляції імунної відповіді, епігенетичних впливів та структурних змін у молекулярній будові функціонально активних молекул.

Окремими дослідженнями показаний зв'язок прийому НПЗЗ із зниженим ризиком розвитку різних видів раку, таких як рак кишечника, молочної, передміхурової залози, яєчників тощо.

Разом з цим існує обмежена кількість наукових звітів щодо можливого збільшення ризику розвитку онкопатології внаслідок використання НПЗЗ. Деякі з них стосуються епігенетичних впливів, і механізми, відповідальні за збільшення ризику, є менш чітко визначеними. Отже питання стосовно цього аспекту побічних ефектів цього класу препаратів залишається відкритим.

Сучасні дослідження фармакодинаміки НПЗЗ виходять за рамки класичних уявлень про механізм побічних ефектів, пов'язаних із блокадою ЦОГ-1 та ЦОГ-2. Останні дослідження вказують на те, що НПЗЗ можуть негативно впливати на молекулярні ланцюги антиоксидантної-прооксидантної рівноваги, імунної системи та виступати як потужні епігенетичні фактори, що порушують експресійну активність окремих генів. Епідеміологічні дослідження свідчать про можливість ініціації неопластичних процесів ШКТ внаслідок тривалого застосування окремих НПЗЗ.

З урахуванням вищезазначеного, дослідження нових молекулярних та можливих епігенетичних механізмів побічних ефектів НПЗЗ при їх тривалому використанні є актуальною задачею для медичної науки. Зазначена дисертаційна робота Кристини Анатоліївни Бурлаки, присвячена вирішенню цих завдань, є актуальною та важливою з наукового та практичного погляду.

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 роки 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, одним з виконавців яких є здобувач.

Новизна дослідження та одержаних результатів. Автором отримані нові дані щодо молекулярних механізмів побічних ефектів найбільш широко вживаних НПЗЗ (диклофенак, індометацин, ацетилсаліцилова кислота, мелоксикам) у тривалому експерименті. Вивчено їх вплив на антиоксидантно-прооксидантні та тіол-дисульфідні системи, обмін пуринів, концентрацію

білків HSP70 та греліну. Встановлено, що ці НПЗЗ сприяють процесам метилювання та фрагментації ДНК, порушують експресію TL4-рецепторів та дизрегулюють синтез білків в рамках сигнальних шляхів Wnt- Hedgehog та гена c-kit.

У проведеному дослідженні виявлено кореляцію між патобіохімічними та генетичними змінами та накопиченням маркерів пошкодження, таких як матриксна металопротеїназа 8 (MMP8) та фекальний кальпротектин, в супернатантах слизової оболонки кишківника. Вперше встановлена кореляційна взаємодія фрагментації ДНК з окисненим глутатіоном та MMP8.

Досліджено роль фрагментації ДНК у виникненні пошкоджень слизової оболонки кишківника, а вплив окисненого глутатіону та MMP8 на цей процес підкреслює складний характер його регуляції. Отримані дані вказують на можливу роль MeDNA, нітротирозину та фрагментації ДНК у патогенезі пошкоджень слизової оболонки кишківника. Також підтверджено, що потенційний вплив окисненого глутатіону та MMP8 на маркери цих процесів може характеризувати ступінь тяжкості гастро- та ентеротоксичності препаратів цієї групи.

Математично доведено вплив маркерів оксидативного та нітрозуючого стресу на процеси метилювання та фрагментації ДНК, а також їх сильний кореляційний зв'язок з дизрегуляцією синтезу білків в рамках сигнальних шляхів Wnt- Hedgehog та гена c-kit. Проведено порівняльний аналіз впливу різних НПЗЗ на маркери оксидативного/нітрозуючого стресу, обмін пуринів, концентрацію білків HSP70, греліну, пошкодження кишківника, ступінь метилювання та фрагментації ДНК, експресію TL4-рецепторів, концентрацію білків в рамках сигнальних шляхів Wnt- Hedgehog та гена c-kit. Виявлено неоднорідний характер побічних ефектів диклофенаку, індометацину, ацетилсаліцилової кислоти та мелоксикаму на вказані маркери.

Незважаючи на відсутність статистично вірогідного впливу мелоксикаму на показники оксидативного та нітрозуючого стресу та його мінімальну ulcerогенну дію, встановлено його статистично достовірний епігенетичний

вплив, а саме підвищення кількості метильованої та фрагментованої ДНК та дизрегуляцію білоксинтетуючої функції генів в рамках сигнальних шляхів Wnt- Hedgehog та гена c-kit.

Теоретичне значення отриманих результатів. Результати дисертаційної роботи дають наукове обґрунтування для сучасних підходів до встановлення нових молекулярно-генетичних механізмів небажаної дії нестероїдних протизапальних лікарських засобів. В ході дослідження були досліджені нові молекулярно-генетичні механізми побічних ефектів найпоширеніших препаратів серед НПЗЗ, можливі молекулярно-епігенетичні шляхи, які визначають побічну дію цих препаратів, включаючи маркери оксидативного та нітрозуючого стресу, обмін пуринів, концентрацію HSP70-білків, грелін, пошкодження кишківника, метилювання та фрагментацію ДНК, експресію TL4-рецепторів, концентрацію білків у сигнальних шляхах Wnt- Hedgehog та гену c-kit. Математично доведено, що ці показники мають значний вплив на розвиток ульцерогенної дії досліджуваних препаратів.

Практичне значення отриманих результатів.

Отримана сукупність даних має велике значення для використання нових біохімічно-генетичних маркерів у скринінгу та визначенні небажаних побічних ефектів. Крім того, отримані уявлення про молекулярні механізми відкривають можливості для розробки ефективних фармакологічних та технологічних підходів для зменшення цих побічних ефектів.

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 у роботі навчального медико-лабораторного центру Запорізького державного медико-фармацевтичного університету МОЗ України, лабораторії фармакології ефektorних 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. Достовірність первинних матеріалів дисертації доктора філософії Бурлаки К.А. була перевірена комісією, до складу якої входили голова - д.мед.н., професор Усачова О.В., та члени комісії: д.мед.н., професор Тертишний С.І. (медико-біологічний напрям), головний метролог Ребець В.С. Комісія була створена відповідно до наказу ректора ЗДМФУ № 343 від 03.10.2023 року. Всі документи відповідають вимогам і результати оброблені сучасними статистичними методами на персональному комп'ютері.

Первинна документація щодо обсягу та характеру досліджень повністю відповідає даним, викладеним у дисертаційній роботі. Робота виконана на метрологічно повіреній дослідницькій апаратурі та повіреним інструментарієм. Результати повірки дослідницької апаратури були підтверджені Експертним метрологічним висновком № 361 від 14.11.2023 року, що дало можливість автору сформулювати об'єктивні висновки та рекомендації.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях.

Основні положення дисертації в повній мірі 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 праця займає обсяг у 188 сторінок друкованого тексту та складається з таких розділів: анотація, вступ, огляд літератури, матеріали та методи дослідження, три розділи власних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів, висновки, а також список використаної літератури, який включає 228 джерел (з них 10 – кирилицею, 218 – латиною), і 5 додатків. У дисертації використано 12 таблиць та 12 рисунків.

Дисертаційна робота Бурлаки К.О. є закінченим науковим дослідженням, в якому чітко сформульовані мета і завдання, а також вдало вибрані методологічні та методичні інструменти.

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

У **вступі** обґрунтування вибору теми дослідження виявляється достатньо переконливим, а актуальність її відзначається належним обґрунтуванням. Сформульована мета дослідження виражена чітко та конкретно, а завдання розкриті логічно та відображають послідовність вивчення питань.

Розділ 1 «Огляд літератури» містить чотири підрозділи. У першому розділі розглядаються основні молекулярні механізми, що лежать в основі розвитку небажаних побічних реакцій НПЗЗ. Другий розділ розкриває вплив цих препаратів на показники антиоксидантної та тіол-дисульфідної систем у тканинах шлунково-кишкового тракту. У третьому розділі детально аналізується вплив небажаних побічних реакцій НПЗЗ на фактори ендогенної цитопротекції, зокрема HSP 70, та маркери пошкодження тканини, такі як

MMP8, у тканинах шлунково-кишкового тракту при тривалому введенні. Четвертий розділ акцентує увагу на основному впливу небажаних побічних реакцій НПЗЗ на процеси повногеномного метилювання ДНК та фрагментації, а також на Toll-like receptor-опосередковану побічну дію цих препаратів. Огляд літератури завершується узагальненням, яке обґрунтовує вибір теми дисертаційного дослідження та формулює його мету та завдання. У розділі аналітично оцінюється велика кількість вітчизняних та іноземних літературних джерел, виявляються протиріччя в існуючих наукових дослідженнях та визначаються проблемні питання, які вимагають подальшого уточнення. Зміст предмету дисертаційного дослідження висвітлений у аналітичному ключі повноцінно.

У **Розділі 2 «Матеріали та методи дослідження»** представлено дизайн дослідження, методи дослідження. У даному розділі наведено аргументацію застосування певних методів статистичної обробки даних, що відповідають поставленим в завданні цілям, та отриманими числовими даними.

Розділ 3 «Вплив тривалого введення НПЗЗ на токсичність, стан слизової оболонки кишківника, показники оксидативного та нітрозуючого стресів, метаболізм пуринів та сечової кислоти» складається з двох підрозділів. У першому розділі представлено макроскопічне дослідження ульцерогенної дії НПЗЗ під час їх тривалого введення та аналіз токсичності цих препаратів. Другий підрозділ присвячений вивченню впливу тривалого введення НПЗЗ на розвиток оксидативного та нітрозуючого стресів, стан тіол-дисульфідної системи, а також метаболізму пуринів та сечової кислоти.

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 розглядає вплив тривалого застосування нестероїдних протизапальних препаратів на синтез білків теплового шоку, рівень маркерів пошкодження тканин, а також вміст греліну та фекального кальпротектину.

Розділ 5 «Вплив нестероїдних протизапальних лікарських засобів на метилювання ДНК, Tl-4-рецептор, концентрацію молекулярних регуляторів Wnt та Hedgehog сигналіngu, гену c-kit при їх тривалому застосуванні» здобувач доводить, що фрагментація ДНК відіграє ключову роль у виникненні пошкоджень слизової оболонки кишківника. На основі отриманих даних можна зробити висновок про тісний взаємозв'язок між процесами метилювання ДНК, фрагментації ДНК та активацією TL4-рецепторів. Крім того, виявлено значущий кореляційний зв'язок між експресією білків у сигнальних шляхах Wnt та Hedgehog, що свідчить про можливу взаємодію цих сигнальних шляхів у клітинних процесах.

У розділі 6 «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» здобувачем проведено обговорення результатів, отриманих в попередніх розділах, та порівняно їх з результатами світової літератури.

Список використаних літературних джерел містить достатню кількість публікацій вітчизняних та закордонних авторів, оформлений коректно та відповідає вимогам ДАК України. Роботу характеризує високий методичний рівень, використання сучасних інформативних методик, системний підхід до статистичного аналізу результатів дослідження. Матеріал у вигляді таблиць і графіків сприяє розумінню значущості змін аналізованих параметрів.

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 клінічну практику лікувально-діагностичних закладів.

Зауваження до дисертації щодо її змісту та оформлення. Принципових недоліків в роботі не виявлено, однак є ряд певних зауважень, на які слід звернути увагу:

В розділі «Матеріали та методи» слід було більш детального обґрунтувати вибір доз препаратів, режимів та тривалості їх введення.

При викладанні методів дослідження бажано наводити аргументацію, чому саме цей метод був обраний для дослідження певної ланки метаболізму, або маркеру, а також наводити їх більш детальний опис.

3. В роботі зустрічаються окремі невдалі та некоректні вирази (С. 24 «лімфома лімфоїдної тканини»; С. 24 «Дослідження, які висвітлювали роль НПЛЗ у збільшенні ризику раку, здебільшого є епігенетичними»; С. 27 «Показано різноспрямований характер побічних ефектів); технічні та стилістичні неточності (Табл.3.2. – немає одиниць вимірювання; інформація про апробацію продубльована двічі - с.28 та с.30; невдалою є назва 4 розділу). Крім того, автор зазначає, що вимірювала показники в «тканинах кишечника», що є не коректним, більш точним та правильним є «гомогенат/супенатант кишечника».

Ці зауваження не зменшують наукової та практичної цінності роботи.

В якості наукової дискусії хотілось би почути відповіді на **наступні запитання:**

1. Як, на Вашу думку, яким чином епігенетичні механізми можуть бути залучені до різноманітних фармакодинамічних ефектів та токсичності НПЗЗ?

2. Як Ви можете пояснити, що незважаючи на підвищення кількості метильованої та фрагментованої ДНК та дизрегуляції білоксинтетуючої функції генів Wnt- Hedgehog сигналінгу та гену c-kit на тлі дії мелоксикаму, у нього виявили незначний ульцерогенний потенціал?

3. Які ще механізми, окрім впливу на ЦОГ, залучені в розвитку побічних ефектів НПЗЗ, в тому числі і на ШКТ?

4. Як можна пояснити вибір сечовини та креатиніну серед інших маркерів ушкодження ШКТ? Які ще показники можуть додатково свідчити про зміни оксидантно-антиоксидантної рівноваги?

Відсутність (наявність) порушень академічної доброчесності

На підставі фахового аналізу тексту, в т.ч. кількісних даних дисертації і наукових праць здобувача, публікацій інших авторів за близькою тематикою не виявлено ознак академічного плагіату або самоплагіату, фабрикації або фальсифікації. З використанням on-line сервісу Strike Plagiarism підтверджено високий рівень оригінальності тексту. Обсяг подібностей складає 6,77% (КП1), 2,90% (КП2), 0,46% (КЦ). Таким чином наявності порушень академічної доброчесності не виявлено. Усі запозичення з друкованих та електронних джерел, а також із захищених раніше науково-дослідних робіт, кандидатських і докторських дисертацій мають відповідні посилання та цитування, оформлені у відповідності до діючих правил.

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота К.А. Бурлаки під назвою «Епігенетичні механізми побічної дії нестероїдних протизапальних засобів (експериментальне дослідження)» представляє собою вичерпне та завершене наукове дослідження, призначене для здобуття ступеня доктора філософії у галузі знань 22 «Охорона здоров'я», за спеціальністю 222 «Медицина». Ця дисертаційна праця є цілісною та самостійною науковою роботою, яка відзначається використанням сучасних методів дослідження, науковою новизною, практичною важливістю та достовірними висновками. Дослідження, викладене в дисертації, відповідає вимогам академічної доброчесності, що додатково підтверджує відсутність порушень у роботі та опублікованих наукових працях автора.

У контексті викладеного, вивчення нових молекулярних та епігенетичних механізмів токсичних та побічних ефектів нестероїдних протизапальних засобів при їх тривалому застосуванні представляє собою актуальну проблему для сучасної медичної науки.

Дисертаційна робота К.А. Бурлаки повністю відповідає встановленим вимогам до оформлення дисертацій, викладеним в наказі Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 року № 40 та Постанові Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року № 44 «Порядок присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії». Автор дисертації, Бурлака К.А., заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина», галузь знань 22 «Охорона здоров'я».

Офіційний опонент:

завідувачка кафедри фармакології
Вінницького національного медичного
університету ім. М.І. Пирогова (м. Вінниця),
д.мед.н., професор

Наталія ВОЛОЩУК

30 січня 2024 року

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 16:44:22 30.01.2024

Назва файлу з підписом: Відгук Волощук Н.І..pdf.p7s
Розмір файлу з підписом: 655.3 КБ

Перевірені файли:
Назва файлу без підпису: Відгук Волощук Н.І..pdf
Розмір файлу без підпису: 638.1 КБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: ВОЛОЩУК НАТАЛІЯ ІВАНІВНА
П.І.Б.: ВОЛОЩУК НАТАЛІЯ ІВАНІВНА
Країна: Україна
РНОКПП: 2421105744
Організація (установа): ФІЗИЧНА ОСОБА
Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 16:44:19
30.01.2024
Сертифікат виданий: КНЕДП АЦСК АТ КБ "ПРИВАТБАНК"
Серійний номер: 5E984D526F82F38F04000000251D1D0125D1C904
Алгоритм підпису: ДСТУ 4145
Тип підпису: Удосконалений
Тип контейнера: Підпис та дані в одному файлі (CAAdES enveloped)
Формат підпису: З повними даними ЦСК для перевірки (CAAdES-X Long)
Сертифікат: Кваліфікований

Версія від: 2023.12.21 13:00