



## РЕЦЕНЗІЯ

декана другого міжнародного факультету, доцента кафедри патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології ЗДМФУ МОЗ України, кандидата медичних наук, доцента, Іваненка Тараса Васильовича 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.** Нестероїдні протизапальні засоби (НПЛЗ) займають лідируючі позиції за обсягами споживання в світі, що пояснюється високою ефективністю при больовому синдромі запального походження. Унікальність НПЛЗ, як класу лікарських препаратів, обумовлена не тільки протизапальним та знеболюючим ефектом, а також, жарознижуючою та антитромботичною дією.

Широко відомо, що механізм протизапальної та побічної дії НПЗЗ пов'язаний із пригніченням активності циклооксигенази (ЦОГ), як наслідок, зниженням синтезу простагландинів (ПГ). Терапевтичний ефект НПЗЗ реалізується за рахунок гальмування активності ЦОГ-2, а побічні ефекти з'являються при інгібуванні ЦОГ-1. Протизапальна дія НПЛЗ також пов'язана з гальмуванням перекисного окиснення ліпідів, стабілізацією лізосомальних мембран, гальмуванням перебігу утворення макроергічних зв'язків у процесах окисного фосфорилування, гальмуванням агрегації нейтрофілів, пригніченням синтезу, взаємодією з рецепторами, інактивацією інших медіаторів запалення (брадикінін, лімфокіні, лейкотрієни, фактори комплементу й ін.).

На сьогодні, характер застосування препаратів та дослідження механізмів розвитку небажаних побічних ефектів НПЛЗ, пов'язаний безпосередньо з їх фармакологічними властивостями. Однак, останніми роками почали з'являтися данні відносно можливого епігенетичного впливу НПЛЗ як потужного епігенетичного фактору.

В організмі існують молекулярно-біохімічні системи, які спрямовані на інактивацію ксенобіотиків, у тому числі і лікарських засобів, проте відомо, що

лікарські препарати змінюють не тільки молекулярні реакції, фізіологічні функції, а й здатні моделювати генну експресію. Відомо, що при тривалому застосуванні лікарські препарати можуть виступати у вигляді епігенетичних факторів.

Епігенетичні фактори впливають на активність експресії певних генів на декількох рівнях, що призводить до зміни фенотипу клітини. На епігенетичні зміни можуть впливати такі фактори: метали; стійкі органічні забруднення; ендокринні порушення, викликані хімічними речовинами; продукти харчування; лікарські засоби.

Є дані, що тривалий прийом НПЛЗ приводить до утворення ерозій, виразок і онкологічних захворювань шлунка та кишечника. Висловлюється припущення, що дані побічні ефекти є не тільки результатом пошкодження слизової оболонки під впливом НПЛЗ, але і можливим впливом НПЛЗ на гени, які регулюють клітинний цикл. Виходячи з вищевикладеного, цікавим є вивчення епігенетичного впливу НПЛЗ на гени, що регулюють клітинний цикл шлунка (CDH1, MHL1), а також кишечника (SEPT9, APC). Відомо що, ген SEPT9 кодує синтез білка septin-9. Метилування ДНК цього гена припиняє його активну роботу і «вимикає» синтез білка-супресора ракового зростання. Пошкодження експресії гена SEPT9 асоційоване з розвитком колоректального раку (КРР). Наявність в крові неактивного гена-супресора ракової пухлини свідчить про процеси розвитку пухлини в кишечнику, відображає такі події як проліферація клітин і ангіогенез в пухлині. Виходячи з цього, епігенетичні методи визначення метильованої ДНК гена SEPT9 можуть допомогти в організації молекулярного скринінгу колоректального раку.

APC білок є негативним регулятором концентрації бета-Катеніну і взаємодіє з E-кадгеріном, який відповідає за клітинну адгезію. За результатами численних досліджень аберантне метилування гена APC може призводити до розвитку колоректального раку.

Разом з цим, метилування CpG острівців є молекулярним фенотипом раку шлунка. Гени, що мають відношення до розвитку пухлини, такі як CDH1, MHL1, часто піддаються метилуванню. Також повідомлялося про те, що частіше причиною інактивації генів CDH1 і MLH1 є саме метилування промотора, а не мутації.

Таким чином, необхідно зазначити, що на сьогодні широко вивчені ульцерогенні ефекти НПЗЗ, механізм яких обумовлений інгібуванням ЦОГ-1 і ЦОГ-2, проте комплексні генетичні і біохімічні дослідження щодо інших механізмів побічних ефектів не проводилися. Відомо, що система клітинних шаперонів здатна захищати макромолекули, ДНК, РНК клітин від епігенетичного впливу ксенобіотиків, за рахунок активації системи шаперонів

(білки HSP). Однак, комплексні дослідження у цьому напрямку не проводились. За останні роки є лише поодинокі дослідження в переважній більшості *in vitro*. Наразі є перспективним проведення досліджень з вивчення епігенетичного впливу НПЛЗ.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота була частиною 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.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність і новизна.** Представлена дисертаційна робота є експериментальною роботою у галузі фармакології, та присвячена дослідженням епігенетичних та молекулярних механізмів побічної дії НПЛЗ.

Дисертантом було проведено самостійний інформаційний пошук, вивчено сучасну наукову літературу з теми роботи, визначено мету та завдання дослідження і розроблено його дизайн. Окрім того, автор особисто виконав біохімічні, фармакологічні, токсикологічні та математико-статистичні дослідження крові експериментальних тварин. Здобувач самостійно систематизував отримані результати, написав всі розділи дисертаційної роботи, підготував до друку наукові праці та впровадив наукові розробки в роботу початкових закладів України. Важливо відзначити, що автор не використав ідеї та розробки співавторів публікацій.

Достовірність отриманих результатів дисертації забезпечена вірними методологічними підходами та статистичним аналізом. Організація дослідження та методологія відповідають меті та завданням, використовуються сучасні методи та відповідне лабораторне обладнання для представлення отриманих даних на науковому рівні.

Автор визначив профіль токсичності нестероїдних протизапальних лікарських засобів (НПЛЗ), таких як диклофенак, індометацин, ацетилсаліцилова кислота та мелоксикам. Досліджено їх вплив на показники оксидативного та нітрозуючого стресу, тіол-дисульфідної системи та обміну пуринів у тканинах кишківника щурів. Також проведено дослідження впливу НПЛЗ на концентрацію HSP70, інтермедіатів системи APUD та маркерів

тканинного пошкодження. Автор також оцінив вплив НПЛЗ на метилювання та фрагментацію ДНК, концентрацію білків у сигнальних шляхах Wnt і Hedgehog, гену c-kit та експресію рецепторів TL-4.

На основі отриманих результатів автор провів математичний аналіз кореляційних зв'язків між параметрами та визначив їх вплив на метилювання та фрагментацію ДНК, а також прояв побічних ефектів НПЛЗ. Зазначені сучасний методологічний підхід, висока інформативність використаних методів та адекватний статистичний аналіз дозволяють розглядати результати дослідження, наукові положення, висновки та рекомендації як достовірні та науково обґрунтовані.

**Новизна дослідження та одержаних результатів.** Автором вперше, в умовах тривалого призначення досліджуваних НПЛЗ (диклофенак, індометацин, аспірин, 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 здатні підсилювати процеси метилювання та фрагментації ДНК, порушувати експресію TL4-рецепторів та дизрегулювати синтез білків Wnt- Hedgehog сигналіngu та гену c-kit. У проведеному дослідженні показана кореляція патобіохімічних та генетичних змін із накопиченням у тканинах кишківника маркерів їх пошкодження MMP8 та фекального кальпротектину та загального профілю ульцерогенної дії НПЛЗ.

Вперше встановлена кореляційна взаємодія фрагментації ДНК з окисненим глутатіоном та MMP8. Показано, що фрагментація ДНК відіграє ключову роль у виникненні пошкоджень слизової оболонки кишківника, а вплив окисненого глутатіону та MMP8, на цей процес, підкреслює складний характер регуляції. З погляду можливих побічних ефектів, це дослідження розкриває можливу роль MeDNA, нітротирозину та фрагментації ДНК у патогенезі пошкоджень слизової оболонки кишківника. Також показано, що потенційний вплив окисненого глутатіону та MMP8, на маркери цих процесів, може характеризувати ступінь тяжкості ульцерогенних ушкоджень ШКТ.

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 Wnt- Hedgehog сигналіngu та гену c-kit.

Автором вперше, проведено порівняльний аналіз між досліджуваними НПЛЗ, за силою їх впливу, на маркери оксидативного/нітрозуючого стресу, обміну пуринів, концентрацію HSP70-білків, греліну, пошкодження кишківника, ступінь метилювання та фрагментації ДНК, експресії TL4-рецепторів, концентрації білків Wnt- Hedgehog сигналіngu та c-kit гену.

Показано різноспрямований характер побічних ефектів диклофенаку, індометацину, ацетилсаліцилової кислоти та мелоксикаму на маркери оксидативного/нітрозуючого стресу, обміну пуринів, концентрацію HSP70-білків, греліну, пошкодження кишківника, ступінь метилювання та фрагментації ДНК, експресії TL4-рецепторів, концентрації білків Wnt-Hedgehog сигналіngu та c-kit гену. Незважаючи на обмежену дію мелоксикаму на показники оксидативного, нітрозуючого стресів та його мінімальну ульцерогенну дію, встановлено його статистично достовірний епігенетичний вплив, а саме підвищення кількості метильованої та фрагментованої ДНК та дизрегуляції білоксинтетуючої функції генів Wnt- Hedgehog сигналіngu та гену c-kit.

### **Теоретичне і практичне значення результатів дослідження.**

Дисертаційна робота присвячена дослідженню актуальної проблеми фармакології з встановлення нових механізмів побічних ефектів ліків. Автором досліджені 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-Hedgehog сигналіngu 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 небажаних побічних ефектів НПЛЗ. Крім того, отримано нові уявлення щодо молекулярних механізмів побічних ефектів НПЛЗ, що вподальшому дозволить розробити ефективні фармакологічні та технологічні підходи для їх нівелювання.

Результати дослідження впроваджено в практику: в навчальний процес 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; в науковий процес - 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»; в лікувально-діагностичний процес - у відділенні клініко-діагностичної лабораторії КНП «Міська лікарня

№9» ЗМР та клініко-діагностичній лабораторії ННМЦ «Університетська клініка ЗДМФУ».

**Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності.** У дисертаційній роботі Бурлаки Кристини Анатоліївни «Епігенетичні механізми побічної дії нестероїдних протизапальних засобів (експериментальне дослідження)» не встановлено ознак академічної недоброчесності. Робота перевірена ліцензійною антиплагіатною системою StricePlagiarism, за результатами якої встановлено, що в дисертації відсутні порушення академічної доброчесності, текстових запозичень не виявлено, наявні посилання на відповідні джерела.

**Зміст 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 джерела (з них 10 – кирилицею, 218 – латиною) та 5 додатків. Дисертація ілюстрована 12 таблицями та 12 рисунками.

Вступна частина відповідає всім вимогам для дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора філософії. У вступі розглянута актуальність обраної проблеми, чітко сформульована мета та завдання дослідження, представлено особистий внесок автора, наукову новизну та практичні рекомендації.

Розділ 1. Огляд літератури написаний змістовно, використано достатній об'єм вітчизняних та закордонних джерел. Автором представлені сучасні напрямки досліджень механізмів небажаних побічних ефектів НПЛЗ.

Розділ 2. Матеріали та методи дослідження. Описані методи дослідження.

Розділ 3. Автор викладає дані щодо впливу тривалого введення НПЛЗ на токсичність, стан слизової оболонки кишківника, показники оксидативного та нітрозуючого стресів, метаболізм пуринів та сечової кислоти

Розділ 4. Автором представлені дані про щодо впливу НПЛЗ на дослідження факторів ендогенної цитопротекції (HSP70), маркерів пошкодження тканини (MMP8) та маркерів APUD системи (грелін, фекальний кальпротектин).

Розділ 5. Викладено дані, щодо дослідження впливу НПЛЗ на процеси метилювання ДНК, TL-4-рецептор білки Wnt та Hedgehog сигналіngu та гену c-kit.

Розділ 6. Представлений аналіз і узагальнення результатів дослідження, включає узагальнення отриманих даних та їх порівняння з сучасними дослідженнями у цьому напрямку.

Висновки дисертації сформульовані повністю відповідають поставленій меті та завданням. Дисертаційне дослідження містить дані, що складають новизну в теоретичному і практичному відношеннях.

**Повнота викладу основних результатів дисертації в опублікованих працях.** Основні результати і нові наукові положення дисертації повністю опубліковані в наукових журналах та в матеріалах науково-практичних конференцій.

За матеріалами дисертації опубліковано 8 наукових праць: 3 статей в науковому фаховому виданні України, 5 тез у матеріалах міжнародних і Всеукраїнських з'їздів і науково-практичних конференцій. Матеріали дисертації були оприлюднені на 5 конференціях і конгресах у формі виступів.

Дисертація оформлена згідно існуючих вимог і містить повноту інформації щодо основних положень, наукових трактувань, заключень, висновків та практичних рекомендацій. Фактичний матеріал добре систематизовано. Робота написана чіткою науково-літературною мовою.

**Завершеність дисертаційної роботи та зауваження щодо її змісту та оформлення.** Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням, у якому чітко зазначені мета і завдання, вірно обрані методологічні і методичні інструменти, витримана послідовність наукового пошуку з наступним порівнянням аналізу даних. Вищесказане дозволяє вважати, сформульовані в дисертації положення, висновки і практичні рекомендації є науково обґрунтованими.

**Загальна оцінка дисертаційної роботи позитивна, проте в процесі рецензування виникли наступні зауваження:**

1. Висновки надто великі та перевантажені фактичним матеріалом.
2. В огляді літератури доцільно висвітлити різні сигналінги, що регулюють клітинний цикл та обґрунтувати вибір саме дослідження Wnt та Hedgehog сигналінгу.

Зазначені зауваження не мають принципового характеру, не зменшують цінності наукового дослідження, мають рекомендаційний характер і не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

Оцінюючи в цілому роботу позитивно, хотілося б у порядку уточнення окремих положень одержати відповіді на наступні запитання:

1. Як Ви вважаєте, вплив досліджуваних НПЛЗ на вміст ММР8 це окрема ланка механізму їх побічної дії, або наслідок, і цей показник Ви розглядаєте виключно як маркер деструкції тканин кишківника?

2. Чому дослідження білків *Wnt* та *Hedgehog* сигналіну та гену *c-kit* було Вами проведено у гомогенаті кишківника, а не, наприклад, шлунка?

### **Висновок.**

Дисертаційна робота Бурлаки Кристини Анатоліївни Епігенетичні механізми побічної дії нестероїдних протизапальних засобів (експериментальне дослідження)», є закінченим науковим дослідженням, у якому вирішена важлива наукова задача – дослідження нових молекулярно-генетичних механізмів небажаних побічних реакцій НПЛЗ.

Дисертаційна робота повністю відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44 та вимогам оформлення дисертацій, затвердженим наказом № 40 Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 р., а її автор заслуговує на присудження ступеня доктора філософії у галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина».

### **Рецензент:**

декан другого міжнародного факультету,  
доцент кафедри патологічної фізіології  
з курсом нормальної фізіології ЗДМФУ  
МОЗ України, кандидат медичних наук,  
доцент

Тарас ІВАНЕНКО



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: ІВАНЕНКО ТАРАС ВАСИЛЬОВИЧ 3125101110;  
Належність до Юридічної особи: ФІЗИЧНА ОСОБА;  
Код юридичної особи в ЄДР: 3125101110;  
Серійний номер кваліфікованого сертифіката: 5E984D526F82F38F04000000AAFD290164CF8304;  
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): 09:06 31.01.2024;  
Чинний на момент підпису. Підтверджено позначкою часу для підпису від АЦСК (кваліфікованого надавача електронних довірчих послуг)  
Час та дата підпису (позначка часу для даних): 09:06 31.01.2024;  
Чинний на момент підпису. Підтверджено позначкою часу для даних від АЦСК (кваліфікованого надавача електронних довірчих послуг)