



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИКО-ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИКО-ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

БУРЛАКА КРИСТИНА АНАТОЛІВНА

УДК: 616.33/.34-085.276.065:577.21:575.113]-092.9-074/-076

ДИСЕРТАЦІЯ

**ЕПІГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ ПОБІЧНОЇ ДІЇ НЕСТЕРОЇДНИХ
ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЗАСОБІВ
(ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)**

222 «Медицина»

22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття ступеня доктора філософії.

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

_____ К.А. Бурлака

Науковий керівник – **Павлов Сергій Васильович**, доктор біологічних наук,
професор

Запоріжжя – 2023

АНОТАЦІЯ

Бурлака К.А. Епігенетичні механізми побічної дії нестероїдних протизапальних засобів (експериментальне дослідження). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина» (22 – Охорона здоров'я). – Запорізький державний медико-фармацевтичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2023.

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2023.

Метою роботи було встановлення можливих молекулярних та епігенетичних механізмів побічної дії нестероїдних протизапальних лікарських засобів в умовах їх тривалого застосування у лабораторних щурів.

На підставі проведених комплексних біохімічних, молекулярних та генетичних досліджень були встановлені можливі молекулярні механізми епігенетичної дії нестероїдних протизапальних лікарських засобів.

Підтверджено наявність ульцерогенної дії у досліджуваних лікарських засобів, особливо індометацину та диклофенаку при їх тривалому введенні. Застосування мелоксикаму у дозі 0,1 мг/кг, практично не викликало виражених уражень слизових оболонок, були зафіксовані лише поодинокі пошкодження низького ступеня у 40% тварин. Окрім ульцерогенної дії, за тривалого введення НПЛЗ були зареєстровані прояви токсичності. Так, призначення мелоксикаму не чинило статистично достовірного впливу на масу тіла щурів: протягом 3 місяців, щури цієї експериментальної групи, мали достовірне збільшення маси тіла на 3 місяць експерименту, у порівнянні з вихідними даними, яке склало +9,2% по відношенню до значень маси тіла до початку експерименту. Разом з цим, введення диклофенаку, індометацину та, у меншому відсотку, ацетилсаліцилової кислоти, чинило деякий токсичний вплив на динаміку маси тіла, знижуючи її відповідно на 13%, 12% та 5,6% по відношенню до значень 1го місяця. Крім того, токсичні ефекти диклофенаку, індометацину, проявлялися також їх негативним

впливом на деякі показники периферичної крові (кількість лейкоцитів, тромбоцитів, еозинофілів), та біохімічні показники (концентрація білку, АлАт).

Впродовж 3х-місячного введення диклофенаку та індометацину спостерігався приріст 8-гідрокси-2-дезоксигуанозину та окисненого глутатіону в 3,6 та 4 рази, по відношенню до контрольної групи тварин. Важливо зазначити, що нами було встановлено позитивну кореляцію концентрації окисненого глутатіону з нітротирозином та 8-гідрокси-2-дезоксигуанозином на тлі призначення диклофенаку та індометацину (відповідно $r = 0,85$, $p < 0,0001$; $r = 0,91$, $p < 0,0001$; та $r = 0,88$, $p < 0,0001$; $r = 0,94$, $p < 0,0001$).

Небажані побічні ефекти НПЛЗ, особливо індометацину та диклофенаку, проявлялись в їх негативному впливі на обмін пуринів та сечової кислоти. Довготривале введення ацетилсаліцилової кислоти, диклофенаку та індометацину, статистично достовірно впливало на підвищення активності АДА (в 1,3, 3 та 3,5 рази відносно контрольної групи тварин), КО (у 2,2, 7,2 та 8 разів), а також сечової кислоти (в 1,4, 1,7 та 1,8 разів).

Отримані данні імуноферментних досліджень плазми крові щурів, при тривалому введенні НПЛЗ, показали що індометацин (0,6 мг/кг), ацетилсаліцилова кислота (0,6 мг/кг), мелоксикам (0,1 мг/кг), диклофенак (0,6 мг/кг) достовірно впливають на підвищення HSP70, в порівнянні з контрольною групою, причому найбільший вплив чинив індометацин, а найменший мелоксикам.

Вищезазначені патобіохімічні зміни відбувались на тлі підвищення вмісту MMP8 у плазмі крові тварин. У щурів, які отримували індометацин відмічалось підвищення вмісту MMP8 у середньому – на 86 %, ацетилсаліцилову кислоту – на 79 % і мелоксикам – на 66 % та диклофенак – на 85 %. Важливо зазначити, що математичний аналіз даних вмісту MMP8 показав позитивний кореляційний зв'язок середньої сили (індометацин, $r = 0,62$; ацетилсаліцилова кислота, $r = 0,57$; мелоксикам, $r = 0,50$; диклофенак, $r = 0,61$) між вмістом цього маркеру та ступенем пошкодження ШКТ у щурів.

Також, при призначенні диклофенаку та індометацину відбувалось зниження

концентрації греліну у плазмі крові (відповідно в 2,6 та 3,9 рази по відношенню до контрольної групи тварин). У тварин, з призначенням ацетилсаліцилової кислоти, спостерігалось його підвищення у порівнянні з контрольною групою (в 3,2 рази), мелоксикам сприяв менш вираженим (підвищення в 1,4 рази), порівняно до ацетилсаліцилової кислоти, ефектам.

Дизкоординація вмісту HSP70, MMP8 та греліну відбувалась на тлі вірогідного підвищення рівня фекального кальпротектину при застосуванні всіх досліджуваних препаратів. Враховуючи вищевикладене, цілком зрозумілою є необхідність оцінки токсичних ефектів НПЛЗ на тканини кишківника за допомогою цього маркеру.

Загальний результат проведеного комплексного дослідження, а саме аналіз вмісту HSP70, MMP8, греліну та фекального кальпротектину, дозволив зробити декілька проміжних висновків. Так, ацетилсаліцилова кислота, мелоксикам, та особливо індометацин і диклофенак впливали на вміст HSP70, MMP8, підвищуючи їх концентрацію, що може розглядатися як HSP70/MMP8-опосередкована побічна дія НПЛЗ, пов'язана з неоплазією тканин кишківника, оскільки відома роль як HSP70, так й MMP8, у руйнуванні екстрацелюлярного матриксу, ангиогенезі пухлини, інгібуванні апоптозу.

Важливим моментом, у комплексному дослідженні можливих механізмів побічних ефектів НПЛЗ, було встановлення їх епігенетичного впливу. Необхідно зазначити, що за ступенем епігенетичного впливу, дія досліджуваних НПЛЗ мала різний ступінь вираженості. Так, найбільший вплив на кількість метильованого ДНК чинило тривале призначення індометацину (збільшення на 99 % по відношенню до інтактної групи тварин), ацетилсаліцилова кислота та мелоксикам (відповідно на 56% та 41%). Аналогічна динаміка НПЛЗ була встановлена також при дослідженні ступеню загальної фрагментації ДНК.

Таким чином, проведеними нами експериментальними дослідженнями було встановлено здатність НПЛЗ, при їх тривалому введенні, збільшувати повногеномне метилювання ДНК та інтенсифікувати процеси їх фрагментації. Найбільш вираженими ефектами володів індометацин (збільшення метильованої

ДНК на 99%; фрагментації ДНК – на 90% по відношенню до інтакту). Також була встановлена висока позитивна кореляція концентрації фекального кальпротектину у тварин на тлі призначення ацетилсаліцилової кислоти, індометацину, та диклофенаку з експресією TLR4 (відповідно $r = 0,7$, $p < 0,0001$; $r = 0,91$, $p < 0,0001$; $r = 0,9$, $p < 0,0001$), з концентрацією 8-OHdG (відповідно $r = 0,8$, $p < 0,0001$; $r = 0,85$, $p < 0,0001$; $r = 0,84$, $p < 0,0001$) та нітротирозином (відповідно $r = 0,88$, $p < 0,0001$; $r = 0,75$, $p < 0,0001$; $r = 0,89$, $p < 0,0001$).

Нашими дослідженнями була показана здатність НПЛЗ, особливо індометацину та диклофенаку ініціювати у тканинах кишківника оксидативний стрес та гіперекспресію TLR4, що у подальшому може привести до серйозних небажаних побічних ефектів, зокрема, до пошкодження слизової оболонки кишківника, а також, в окремих випадках, до запуску неопластичних процесів.

Встановлена нами здатність НПЛЗ впливати на процеси метилювання ДНК, деякою мірою підтверджує припущення низки дослідників, щодо наявності у НПЛЗ епігенетичного механізму їх небажаних побічних ефектів та можливості ініціювати онкогенез. Дійсно, процеси гіперметилювання ДНК та її фрагментації, відбувались на тлі приросту у тканинах кишківника білків - молекулярних регуляторів Wnt та Hedgehog - сигналіngu – відповідно SMO та Shh. Найбільш вираженим ефектом володіли індометацин та диклофенак, збільшуючи вміст SMO та Shh-білки відповідно у 1,8 і 2,77 рази та в 2 і 2,9 разів. Подібна динаміка нами була встановлена при вивченні концентрації білку-проонкогену - c-kit. Ацетилсаліцилова кислота та мелоксикам менш виражено впливали на білки Wnt та Hedgehog сигналіngu. Разом з цим, мелоксикам, не мав статистично достовірного впливу на білок гену c-kit.

Таким чином, проведеними нами експериментальними дослідженнями було встановлено здатність НПЛЗ, при їх тривалому введенні, збільшувати повногеномне метилювання ДНК та інтенсифікувати процеси їх фрагментації, а також підвищувати концентрацію у тканинах кишківника білків Wnt та Hedgehog - сигналіngu – відповідно SMO та Shh, а також білку-проонкогену - c-kit.

Отже, об'єднані результати дослідження вказують на складний молекулярний

механізм епігенетичної дії НПЛЗ, в якому MeDNA, нітротирозин, GSS та MMP8 відіграють ключову роль у формуванні ульцерогенезу. Це відкриває нові перспективи для розуміння молекулярно-генетичних механізмів розвитку можливих побічних ефектів НПЛЗ.

На підставі математико-статистичного аналізу, можна стверджувати, що за допомогою регресійних моделей встановлено, що MeDNA та нітротирозин мають значущий вплив на розвиток ульцерогенної дії.

З точки зору молекулярних та епігенетичних механізмів реалізації можливих побічних ефектів НПЛЗ та розробки нових підходів до їх профілактики та лікування, важливо розглядати взаємодію молекулярних факторів у контексті їхнього впливу на експресійну активність генів. Потенційні зміни у метилюванні ДНК або інші епігенетичні маркери можуть відігравати регуляторну роль у реалізації побічної дії НПЛЗ, сприяючи або стримуючи виявлення певних молекулярних подій.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше, в умовах тривалого призначення досліджуваних НПЛЗ (диклофенак, індометацин, ацетилсаліцилова кислота, мелоксикам) лабораторним щурам, вивчено молекулярно-генетичні механізми деяких токсичних та побічних ефектів, які пов'язані з їх здатністю негативно впливати на антиоксидантно-прооксидантну, тіол-дисульфідну системи, обмін пуринів, концентрацію HSP70-білків, греліну.

Також встановлено, що досліджувані НПЛЗ здатні підсилювати процеси метилювання та фрагментації ДНК, порушувати експресію TL4-рецепторів та дизрегулювати синтез молекулярних регуляторів Wnt- Hedgehog сигналіngu та гену c-kit. У проведеному дослідженні показано кореляцію патобіохімічних та генетичних змін із накопиченням у тканинах кишківника маркерів його пошкодження - MMP8 та фекального кальпротектину.

Вперше встановлений кореляційний зв'язок 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 роль MeDNA, нітритрози та фрагментації ДНК у патогенезі пошкодження слизової оболонки кишківника та відкриває нові підходи до їх корекції.

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 сигналіну та гену c-kit.

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, експресію TL4-рецепторів, концентрацію білків Wnt- Hedgehog сигналіну та c-kit гену.

Показано різноспрямований характер побічних ефектів диклофенаку, індометацину, ацетилсаліцилової кислоти та мелоксикаму на вищезазначені показники. 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 білоксинтезуючої функції генів Wnt- Hedgehog сигналіну та гену c-kit.

Практичне значення отриманих результатів. Дисертаційна робота присвячена дослідженню фундаментальної проблеми фармакології, а саме встановленню нових механізмів побічних ефектів НПЛЗ (диклофенаку, індометацину, ацетилсаліцилової кислоти, мелоксикаму). 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- Hedgehog сигналіну 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.

Нові теоретичні положення дисертації використовуються у трьох напрямках: в навчальному процесі: 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 ХНМУ МОЗ України; в науковому процесі: у 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»; в лікувально-діагностичному процесі: у відділенні клініко-діагностичної лабораторії КНП «Міська лікарня №9» ЗМР та клініко-діагностичній лабораторії ННМЦ «Університетська клініка ЗДМФУ».

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 8 наукових праць: 3 статті, в наукових фахових виданнях України, 5 тез у матеріалах міжнародних і 8 Всеукраїнських з'їздів і науково-практичних конференцій.

Ключові слова: *нестероїдні протизапальні препарати, шлунково-кишковий тракт, протизапальні властивості, нітрозуючий стрес, тіол-дисульфідна система, білок теплового шоку HSP70, токсичність, щури, оксидативний стрес, сечова кислота та пуриновий обмін, гени, молекулярні регулятори, c-kit, Wnt-Hedgehog-сигналінг, інгібітори циклооксигенази.*

SUMMARY

Burlaka K.A. Epigenetic mechanisms of side effects of non -steroidal anti -inflammatory drugs (experimental study). - Qualification of scientific work on the rights

of the manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 222 Medicine (22 Health Care). – Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhzhia, 2023.

Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhzhia, 2023.

The aim of the work was to find out the possible molecular and epigenetic mechanisms of the side effects of NSAIDs based on a comprehensive study of indicators of oxidative/nitrosative stress, purine metabolism, concentration of HSP70 proteins, ghrelin, markers of intestinal damage, as well as studying the processes of methylation, DNA fragmentation, expression of TL4- receptors and the synthesis of Wnt-Hedgehog signaling proteins and the c-kit gene under the conditions of their long-term use in laboratory rats.

The general result of the conducted comprehensive study showed the presence of the ulcerogenic effect of the studied drugs, especially indomethacin and diclofenac with their long-term administration, while the use of meloxicam at a dose of 0.1 mg/kg practically did not cause lesions of the mucous membranes, only isolated lesions were recorded and low degree of damage in 40% of animals. In addition to the ulcerogenic effect of NSAIDs, we established the effect of long-term administration of NSAIDs on toxicity indicators. Thus, the appointment of meloxicam did not have a statistically significant effect on the body weight of rats: for 3 months, the rats of this experimental group had a significant increase in body weight on the 3rd month of the experiment, compared to the initial data, which amounted to +9.2% in relation to 1 month of observations. In addition, the toxic effects of diclofenac and indomethacin were also manifested by their negative impact on some indicators of peripheral blood (number of leukocytes, platelets, eosinophils) and biochemical indicators (protein concentration, AlAt).

Also, the 3-month administration of diclofenac and indomethacin caused an increase in 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and oxidized glutathione by 3.6 and 4 times, respectively, compared to the control group of animals. It is important to note that we

established a positive correlation of the concentration of oxidized glutathione with nitrotyrosine and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine against the background of diclofenac and indomethacin administration (respectively $r = 0.85$, $p < 0.0001$; $r = 0.91$, $p < 0.0001$; and $r = 0.88$, $p < 0.0001$; $r = 0.94$, $p < 0.0001$).

Undesirable side effects of NSAIDs, especially indomethacin and diclofenac, manifested in their negative impact on the metabolism of purines and uric acid. Long-term administration of acetylsalicylic acid, diclofenac, and indomethacin had a statistically significant effect on increasing the activity of ADA (1.3, 3, and 3.5 times, respectively, of the control group of animals), KO (2.2, 7.2, and 8 times), and also uric acid (1.4, 1.7 and 1.8 times).

The obtained data in the blood plasma of rats, with long-term administration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, showed that indomethacin (0.6 mg/kg), acetylsalicylic acid (0.6 mg/kg), meloxicam (0.1 mg/kg), diclofenac (0.6 mg/kg) significantly affect the increase of HSP70 compared to the control group, with indomethacin having the greatest effect, and meloxicam the least.

The above-mentioned pathobiochemical changes occurred against the background of an increase in the content of MMP8 in the blood plasma of animals. Rats treated with indomethacin had an average increase in MMP8 by 86%, acetylsalicylic acid by 79%, meloxicam by 66%, and diclofenac by 85%. It is important to note that the mathematical analysis of the MMP8 content data showed a positive correlation of medium strength (indomethacin, $r = 0.62$; acetylsalicylic acid, $r = 0.57$; meloxicam, $r = 0.50$; diclofenac, $r = 0.61$) between the content of this marker and the degree of gastrointestinal damage in rats.

Thus, when diclofenac and indomethacin were prescribed, the concentration of ghrelin in the blood plasma decreased (2.6 and 3.9 times, respectively, in relation to the control group of animals). At the same time, its increase was observed in animals prescribed acetylsalicylic acid compared to the control group of animals (by 3.2 times), meloxicam contributed to less pronounced (increase by 1.4 times), in relation to acetylsalicylic acid, effects.

Discoordination of the content of HSP70, MMP8 and ghrelin occurred against the

background of a probable increase in the level of fecal calprotectin when using all the studied drugs. Considering the above, it is quite understandable to assess the toxic effects of NSAIDs on intestinal tissues using this marker.

The general result of the conducted comprehensive study, namely the analysis of the content of HSP70, MMP8, ghrelin and fecal calprotectin, made it possible to draw several intermediate conclusions. Thus, acetylsalicylic acid, meloxicam, and especially indomethacin and diclofenac affected the content of HSP70, and MMP8, increasing their concentration, which can be considered as an HSP70/MMP8-mediated side effect of NSAIDs associated with neoplasia of intestinal tissues, since the role of both HSP70 and MMP8, as in the destruction of the extracellular matrix, tumor angiogenesis, inhibition of apoptosis.

An important point in the comprehensive study of possible mechanisms of side effects of NSAIDs was the establishment of their epigenetic influence. It is important to note that according to the degree of epigenetic influence, the effect of the studied NPLZ was of different degrees of severity. Thus, the greatest effect on the number of MspI/HpaII was exerted by the long-term administration of indomethacin (increase by 99% compared to the intact group of animals), followed by acetylsalicylic acid and meloxicam (by 56% and 41%, respectively). A similar dynamic of NPLZ was also established when studying the degree of total DNA fragmentation. Several studies have shown that NSAIDs can cause oncological diseases of the gastrointestinal tract with their long-term use.

Thus, our experimental studies established the ability of NSAIDs, with long-term administration, to increase whole-genome DNA methylation and intensify their fragmentation processes. Indomethacin had the most pronounced effects (increase of MspI/HpaII by 99%; DNA fragmentation by 90% compared to intact). Thus, a high positive correlation of the concentration of fecal calprotectin in animals against the background of acetylsalicylic acid, indomethacin, and diclofenac was established with the expression of TLR4 (respectively $r = 0.7$, $p < 0.0001$; $r = 0.91$, $p < 0.0001$; $r = 0.9$, $p < 0.0001$), with the concentration of 8-OHdG (respectively, $r = 0.8$, $p < 0.0001$; $r = 0.85$, $p < 0.0001$; $r = 0.84$, $p < 0.0001$) and nitrotyrosine ($r = 0.88$, $p < 0.0001$; $r = 0.75$,

$p < 0.0001$; $r = 0.89$, $p < 0.0001$, respectively.

Our studies have shown the ability of NSAIDs, especially indomethacin and diclofenac, to initiate oxidative stress and overexpression of TLR4 in intestinal tissues, which can subsequently lead to serious unwanted side effects, in particular, to damage to the intestinal mucosa, as well as, in some cases, to the initiation of oncogenesis.

Our established ability of NSAIDs to influence DNA methylation processes, to some extent, confirms the assumptions of several researchers regarding the presence of NSAIDs with an epigenetic mechanism of their unwanted side effects and the possibility of initiating oncogenesis. Indeed, the processes of DNA hypermethylation and its fragmentation took place against the background of an increase in the intestinal tissues of Wnt and Hedgehog - signaling proteins - SMO and Shh, respectively. Indomethacin and diclofenac had the most pronounced effect, increasing the content of SMO and Shh-protein by 1.8, respectively; 2.77 times and in 2; 2.9 times. Similar dynamics were established by us when studying the concentration of the pro-oncogene protein - c-kit. Acetylsalicylic acid and meloxicam had a less pronounced effect on Wnt and Hedgehog signaling proteins. Together with this, meloxicam did not have a statistically significant effect on the c-kit gene protein.

Thus, our experimental studies established the ability of NSAIDs with their long-term administration to increase whole-genome DNA methylation and intensify their fragmentation processes, as well as to increase the concentration of Wnt and Hedgehog signaling proteins in the intestinal tissues - SMO and Shh, respectively, as well as the pro-oncogene protein - c-kit.

Therefore, the combined results of the study indicate a complex molecular mechanism in which MeDNA, nitrotyrosine, GSS, and MMP8 play a key role in the formation of mucosal ulcers. This opens new perspectives for understanding the molecular genetic mechanisms of the development of possible side effects of NSAIDs.

Based on mathematical and statistical analysis, it can be stated that with the help of regression models, it was established that MeDNA and nitrotyrosine have a significant influence on the development of ulcerogenic action.

From the point of view of molecular and epigenetic mechanisms of realizing

possible side effects of NSAIDs, it is important to consider the interaction of molecular factors in the context of their influence on genetic expression. Potential changes in DNA methylation or other epigenetic markers may play a regulatory role in ulcer development by promoting or inhibiting the detection of certain molecular events.

The scientific novelty of the obtained results. For the first time, in the conditions of long-term administration of the studied NSAIDs (diclofenac, indomethacin, aspirin, meloxicam) to laboratory rats, the molecular mechanisms of toxic and side effects were studied, which are associated with their ability to negatively affect the antioxidant-prooxidant, thiol-disulfide systems, purine exchange, the concentration of HSP70 proteins, ghrelin.

It was established that the studied NSAIDs are capable of enhancing DNA methylation and fragmentation processes, disrupting the expression of TL4 receptors and dysregulating the synthesis of Wnt- Hedgehog signaling proteins and the c-kit gene. The study showed the correlation of pathobiochemical and genetic changes with the accumulation in intestinal tissues of the markers of their damage, MMP8 and fecal calprotectin.

The correlative interaction of DNA fragmentation with oxidized glutathione and MMP8 was established for the first time. It is shown that DNA fragmentation plays a key role in the occurrence of damage to the intestinal mucosa, and the influence of oxidized glutathione and MMP8 on this process emphasizes the complex nature of regulation. In terms of possible side effects, this study reveals the role of MeDNA, nitrotyrosine, and DNA fragmentation in the pathogenesis of intestinal mucosal damage.

The influence of markers of oxidative and nitrosative stress on the processes of DNA methylation and fragmentation, as well as their strong correlation with the dysregulation of the synthesis of Wnt-Hedgehog signaling proteins and the c-kit gene, has been mathematically proven.

For the first time, a comparative analysis was conducted between the studied NSAIDs, according to the strength of their effect, on markers of oxidative/nitrosative stress, purine metabolism, concentration of HSP70 proteins, ghrelin, intestinal damage, degree of DNA methylation and fragmentation, expression of TL4 receptors,

concentration of Wnt-Hedgehog proteins signaling and c-kit gene.

The multidirectional nature of side effects of diclofenac, indomethacin, acetylsalicylic acid and meloxicam on the above indicators is shown. Despite the limited effect of meloxicam on indicators of oxidative and nitrosative stress and its minimal ulcerogenic effect, its statistically reliable epigenetic effect was established, namely an increase in the amount of methylated and fragmented DNA and dysregulation of the protein-synthesizing function of the Wnt-Hedgehog signaling genes and the c-kit gene.

Practical significance of the obtained results. The dissertation work is devoted to the study of a fundamental problem of pharmacology, namely the establishment of new mechanisms of side effects of NSAIDs (diclofenac, indomethacin, aspirin, meloxicam). Possible molecular and epigenetic ways of realizing their side effects were investigated (markers of oxidative/nitrosative stress, purine metabolism, concentration of HSP70 proteins, ghrelin, intestinal damage, degree of DNA methylation and fragmentation, expression of TL4 receptors, concentration of Wnt-Hedgehog signaling proteins and c-kit gene). The influence of these indicators on the realization of the ulcerogenic action of the studied NSAIDs has been mathematically proven.

The totality of the obtained data is important both for the development of modern ideas about the mechanisms of side effects of NSAIDs and for the use of new informative biochemical and genetic markers for the screening of unwanted side effects of NSAIDs. In addition, new insights into the molecular mechanisms of side effects of NSAIDs have been obtained, which will allow the development of effective pharmacological and technological approaches to their reduction.

The new theoretical provisions of the dissertation are used in three directions: in the educational process: at the Department of Clinical Medicine of Kyiv National University named after Taras Shevchenko of the Ministry of Health of Ukraine, Department of Pharmacology of Vinnytsia National Medical University named after E. Pirogov of the Ministry of Health of Ukraine, the department of pharmacology of the Zaporizhzhya State Medical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of Ukraine, the department of clinical laboratory diagnostics of the National Institute of

Health of the Ministry of Health of Ukraine, Department of Clinical Laboratory Diagnostics of the Kharkiv National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine; in the scientific process: in the work of the educational medical laboratory center of the Zaporizhzhya State Medical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of Ukraine, the laboratory of pharmacology of effector organs and systems of the State University "Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Sciences of Ukraine"; in the treatment-diagnostic process: in the department of the clinical-diagnostic laboratory of the KNP "City Hospital No. 9" of ZMR and the clinical-diagnostic laboratory of the NNMC "University Clinic of ZDMFU".

Publications. Based on the materials of the dissertation, 8 scientific works were published: 3 articles in scientific specialized publications of Ukraine, 5 theses in the materials of international and 8 All-Ukrainian congresses and scientific-practical conferences.

Keywords: *non-steroidal anti-inflammatory drugs, scilicointestinal tract, anti-inflammatory power, nitrogen stress, thiol-disulfide system, heat shock protein HSP70, toxicity, rats, oxidative stress, sechoic acid and purine metabolism, genes, molecular regulators, c-kit, Wnt-Hedgehog -signaling, cyclooxygenase inhibitor.*

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ НА ТЕМУ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Бурлака, К. А., & Павлов, С. В. (2022). MMP8- і HSP70-опосередкована ульцерогенна дія нестероїдних протизапальних засобів за тривалого введення. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 15(6), 372–379. <https://doi.org/10.33250/15.06.372> (Дисертант виконала набір матеріалу, імуноферментне дослідження та статистичну обробку результатів).
2. Burlaka, K. A. (2023). Influence of long-term administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the level of whole genome dna methylation and its fragmentation in rats. *Bulletin of problems biology and medicine*, 1(168), 114–119. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2023-1-168-114-119> (Дисертант виконала набір матеріалу, статистичну обробку результатів, узагальнення, написання та оформлення статті).
3. Бурлака, К. А., & Павлов, С. В. (2023). TL-4-рецептор-опосередкована побічна дія нестероїдних протизапальних лікарських засобів при їх тривалому застосуванні. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 17(4), 240–247. <https://doi.org/10.33250/17.04.240> (Дисертант виконала набір матеріалу, імуноферментне дослідження та статистичну обробку результатів).
4. Павлов, С.В., & Бурлака, К.А. (2020). Вплив нестероїдних протизапальних лікарських засобів на обмін вітаміну Д у щурів при їх тривалому застосуванні. *Збірник тези доповідей наукової конференції студентів ЗДМУ «Досягнення сучасної медичної та фармацевтичної науки»* (16 груд. 2020 р., м. Запоріжжя). 77-78. (Дисертант виконала набір матеріалу, імуноферментне дослідження та статистичну обробку результатів, написання та підготовку тез до друку, усна доповідь).
5. Павлов, С.В., & Бурлака, К.А. (2020). Можливий епігенетичний вплив нестероїдних протизапальних лікарських засобів на шлунково-кишковий тракт. *Тези науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасні питання*

молекулярно-біохімічних досліджень та лабораторного скринінгу у клінічній та експериментальній медицині 2020». (05-06 бер. 2020 р., м. Запоріжжя). 42. (Дисертант виконала набір матеріалу, імуноферментне дослідження та статистичну обробку результатів, написання та підготовку тез до друку, усна доповідь).

6. Павлов, С.В., & Бурлака, К.А. (2022). Молекулярний механізм ульцерогенної дії нестероїдних протизапальних лікарських засобів при їх тривалому введенні у щурів. *Тези I Міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики та громадського здоров'я»* (15 лист. 2022 р., м. Житомир). 212. (Дисертант виконала набір матеріалу, імуноферментне дослідження та статистичну обробку результатів, написання та підготовку тез до друку, усна доповідь).

7. Павлов, С.В., & Бурлака, К.А. (2023). Вплив тривалого введення нестероїдних протизапальних лікарських засобів на розвиток оксидативного, нітрозуючого стресів, метаболізм пуринів, сечової кислоти та вміст фекального кальпротектину у тканих кишківника. *Матеріали V науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації»* (18 трав. 2023 р., м. Харків). 90-92. (Дисертант виконала набір матеріалу, імуноферментні, біохімічні дослідження та статистичну обробку результатів, написання та підготовку тез до друку, усна доповідь).

8. Павлов, С.В., & Бурлака, К.А. (2023). Вплив тривалого введення нестероїдних протизапальних засобів на рівень повногеномного метилювання днк, її фрагментації, вміст білків wnt, hedgehog - сигналіну та гену c-kit. *Матеріали VI науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція»* (16 лист. 2023 р., м. Харків). 118-120. (Дисертант виконала набір матеріалу, ПЛР, імуноферментне дослідження та статистичну обробку результатів, написання та підготовку тез до друку).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ ТА СКОРОЧЕНЬ.....		21
ВСТУП.....		23
РОЗДІЛ 1	Молекулярний профіль механізмів небажаної побічної дії нестероїдних протизапальних лікарських засобів (Огляд літератури).....	31
1.1	Молекулярні механізми розвитку небажаних побічних реакцій	31
1.2	Вплив НПЛЗ на показники антиоксидантної та тіол-дисульфідної системи у тканинах шлунково-кишкового тракту.....	34
1.3	Вплив НПЛЗ на фактори ендогенної цитопротекції (HSP 70) та маркерів пошкодження тканини (MMP8) у тканинах шлунково-кишкового тракту на тлі їх тривалого введення....	40
1.4	Вплив НПЛЗ на процеси повногеномного метилювання ДНК та її фрагментації. Toll-like receptor-опосередкована побічна дія НПЛЗ. Проблема епігенетичних взаємодій.....	53
РОЗДІЛ 2	МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	63
2.1	Матеріали дослідження.....	63
2.1.1	Дизайн дослідження.....	64
2.2	Методи дослідження.....	66
2.2.1	Підготовка біологічних зразків для досліджень	66
2.2.2	Дослідження антиоксидантної та тіол-дисульфідної системи, обміну пуринів та сечової кислоти.....	67
2.2.3	Дослідження факторів ендогенної цитопротекції (HSP70), маркерів пошкодження тканини (MMP8), маркерів APUD системи (грелін) та фекального кальпротектину.....	70

2.2.4	Дослідження впливу НПЛЗ на метилювання ДНК та Toll-like рецептори, концентрацію молекулярних регуляторів WNT, hedgehog сигналінги, білку гену c-kit.....	72
2.2.5	Дослідження токсичної та ульцерогенної дії НПЛЗ.....	73
2.2.6	Методи статистичного аналізу.....	74
РОЗДІЛ 3	ВПЛИВ ТРИВАЛОГО ВВЕДЕННЯ НПЛЗ НА ТОКСИЧНІСТЬ, СТАН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ КИШКІВНИКА, ПОКАЗНИКИ ОКСИДАТИВНОГО ТА НІТРОЗУЮЧОГО СТРЕСІВ, МЕТАБОЛІЗМ ПУРИНІВ ТА СЕЧОВОЇ КИСЛОТИ.....	76
3.1	Макроскопічне дослідження ульцерогенної дії НПЛЗ при їх тривалому введенні. Вивчення токсичності НПЛЗ.....	77
3.2	Вплив тривалого введення НПЛЗ на розвиток оксидативного та нітрозуючого стресів, стан тіол-дисульфідної системи та метаболізм пуринів, сечової кислоти.....	81
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.....	91
4.1	Вплив нестероїдних протизапальних лікарських засобів на синтез білків теплового шоку.....	92
4.2	Вплив нестероїдних протизапальних лікарських засобів на вміст маркерів пошкодження тканин при їх тривалому застосуванні.....	96
4.3	Вплив нестероїдних протизапальних лікарських засобів на вміст греліну при їх тривалому застосуванні.....	98

4.4	Вплив нестероїдних протизапальних лікарських засобів на вміст фекального кальпротектину при їх тривалому застосуванні.....	100
РОЗДІЛ 5	ВПЛИВ НЕСТЕРОЇДНИХ ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ НА МЕТИЛЮВАННЯ ДНК, TL-4-РЕЦЕПТОР, КОНЦЕНТРАЦІЮ МОЛЕКУЛЯРНИХ РЕГУЛЯТОРІВ WNT ТА HEDGEHOG СИГНАЛІНГУ, ГЕНУ C-KIT ПРИ ЇХ ТРИВАЛОМУ ЗАСТОСУВАННІ.....	104
5.1	Експериментальне дослідження тривалого впливу НПЛЗ на рівень метилювання ДНК та її фрагментації у щурів.....	105
5.2	Експериментальне дослідження тривалого впливу НПЛЗ на TL-4-рецепторів.....	108
5.3	Вплив НПЛЗ на Hedgehog та Wnt сигналінги, білку гена c-kit при їх тривалому застосуванні.....	111
РОЗДІЛ 6	АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	123
	ВИСНОВКИ.....	140
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	143
	ДОДАТОК А АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ.....	173
	ДОДАТОК Б СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ НА ТЕМУ ДИСЕРТАЦІЇ.....	182
	ДОДАТОК В ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ.....	184
	ДОДАТОК Г КОРЕЛЯЦІЙНА МАТРИЦЯ МІЖ ПОКАЗНИКАМИ РАНГУ СПІРМЕНА.....	185
	ДОДАТОК Д ТОЧКОВІ ДІАГРАМИ ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКУ ЗМІННИХ	186

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ ТА СКОРОЧЕНЬ

АДА	– аденозиндезаміназа
АлАт	– аланінамінотрансфераза
АсАт	– аспартатамінотрансфераза
АФК	– активні форми кисню
ГПР	– глутатіонпероксидаза
ГР	– глутатіонредуктаза
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота
ЕМТ	– епітеліально-мезенхімальний перехід
ЗЗК	– запальні захворювання кишківника
КО	– ксантинооксидази
Контроль	– інтактні щури лінії Wistar
КРР	– колоректальний рак
НПЛЗ	– нестероїдні протизапальні лікарські засоби
ПЕ	– побічні ефекти
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
ТДС	– тіол-дисульфідна система
ЦОГ	– циклооксигеназа
ШКТ	– шлунково-кишковий тракт
8-OhG	– 8-гідрокси-2-дезоксигуанозин
APUD	– Amine Precursore Uptake and Decarboxylation
DNMTs	– ДНК-метилтрансфераза
fCAL, ФК	– фекальний кальпротектин
GSH	– глутатіон
GSS	– Glutathione synthetase
Hh	– Hedgehog
HIF-1 α	– індукбельний гіпоксією фактор - 1 α
HSP70	– білки теплового шоку 70
IL-6	– інтерлейкін-6

iNOS	– індукцiбельна синтаза оксиду азоту
MMP8	– матриксні металопротеїнази 8
MspI/HpaII	– повногеномне метилювання ДНК
SAM	– S-аденілметіоніну
Shh	– Sonic hedgehog protein
SMO	– Smoothened
TIMP-1	– тканинний інгібітор металопротеїназ-1
TLR4	– Toll like receptor 4
TNF	– Tumor Necrosis Factor

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. 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 жарознижуючими, безболісними та протизапальними властивостями. З клінічної точки зору, вони корисні для полегшення болю при багатьох станах, починаючи від менструального та післяопераційного болю до болю при артриті. Ці препарати є добре відомими протизапальними засобами і проявляють свою дію через пригнічення синтезу простагландинів шляхом блокування ферменту циклооксигенази (ЦОГ) [1]. За останні кілька десятиліть, зростає кількість досліджень, щодо використання НПЛЗ у лікуванні та профілактиці раку, в той час, як зв'язок між хронічним запаленням і раком виявлено дослідженнями останнього десятиріччя [2].

В опублікованій літературі є численні звіти про захисні ефекти НПЛЗ при онкогенезі. Багато з цих досліджень мають епідеміологічний характер, у яких ці препарати досліджувались у площині їх здатності пригнічувати канцерогенез при різних типах раку, наприклад молочної залози [3], передміхурової залози [4], яєчників [5], а також рак голови та шиї [6]. Однак роль НПЛЗ у профілактиці раку залишається незрозумілою через суперечливі та непослідовні висновки. У той час, як деякі дослідження показали зниження ризику раку, інші продемонстрували відсутність зв'язку між раком і використанням НПЛЗ, і навпаки підвищенням захворюваності. Наприклад, у проспективному дослідженні, за участю приблизно 20 000 жінок (віком 58–76 років) було показано, що неаспіринові НПЛЗ не пов'язані з ризиком раку яєчників і матки [7].

Взаємозв'язок між раком і використанням НПЛЗ є складним і висновок про те, що препарати, які мають протизапальну дію, також захищають від раку, безсумнівно, є надмірним спрощенням. Попередні дослідження показали, що

використання НПЛЗ пов'язане з підвищеним ризиком або смертністю від певних типів раку [8]. Крім того, тривале застосування НПЛЗ часто пов'язане з багатьма серйозними серцево-судинними, шлунково-кишковими, нирковими та іншими побічними ефектами [9].

Зараз широко визнано, що хронічне запалення бере участь у канцерогенезі. Основна етіологія розвитку раку, в результаті запалення, може бути інфекційної або неінфекційної природи. Наприклад, інфекція *Helicobacter pylori* пов'язана з гастритом, виразковою хворобою, лімфомою лімфоїдної тканини слизової оболонки (MALT) і аденокарциномою шлунка [10]. З іншого боку, колоректальний рак є серйозним ускладненням запального захворювання кишківника. Повідомлялося, що пацієнти з колітом мають від двох до восьми разів вищий відносний ризик колоректального раку порівняно із загальною популяцією [11].

НПЛЗ містять в своєму класі багато різноманітних активних фармацевтичних інгредієнтів, серед яких досить часто застосовуються: ібупрофен, мелоксикам, аспірин і диклофенак. Ці лікарські засоби, незважаючи на свою різноманітну хімічну структуру, мають одну спільну властивість - здатність блокувати фермент циклооксигеназу (ЦОГ) або простагландин-ендопероксид H-синтазу (PGHS). Роль НПЛЗ, у розвитку раку, найкраще розглядати у взаємозв'язку між ЦОГ, синтезом простагландинів і запаленням [2].

Порівняно з дослідженнями НПЛЗ, щодо захисту від раку, існує відносно менше наукових повідомлень щодо впливу НПЛЗ на підвищення ризику виникнення злоякісних новоутворень. Дослідження, які висвітлювали роль НПЛЗ у збільшенні ризику раку, здебільшого є епігенетичними, а механізми, що лежать в основі підвищення ризику, менш чітко окреслені. Проте, питання їхньої інформаційної цінності залишається відкритим та певною мірою, суперечливими [12-14].

На нашу думку цікавим є встановлення нових молекулярних та можливих епігенетичних механізмів, токсичних та побічних ефектів НПЛЗ при їх тривалому застосуванні.

Існує припущення, що, в теперішній час, дослідження НПЛЗ не обмежуються класичними уявленнями щодо механізму побічної дії пов'язаних лише з блокадою ЦОГ-1 та ЦОГ-2. Дослідженнями останнього п'ятиріччя показана здатність НПЛЗ негативно впливати на тонкі молекулярні ланцюги антиоксидантної - прооксидантної, імунної систем, виступати у ролі потужних епігенетичних факторів, порушувати експресійну активність окремих генів. Епідеміологічними дослідженнями встановлена можливість НПЛЗ ініціювати неопластичні процеси ШКТ на тлі їх тривалого застосування.

Для розуміння молекулярних механізмів епігенетичного впливу НПЛЗ, на нашу думку, є доцільним проведення комплексного дослідження показників оксидативного/нітрозуючого стресів, тіол-дисульфідної системи, обміну пуринів, концентрації HSP70-білків, греліну, маркерів пошкодження кишківника, а також вивчення процесів метилювання, фрагментації ДНК, експресії TL4-рецепторів та молекулярних регуляторів Wnt- Hedgehog сигналіngu, гену c-kit в умовах їх тривалого застосування у лабораторних щурів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. 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.

Мета дослідження. Встановити можливі молекулярні та епігенетичні механізми побічної дії нестероїдних протизапальних засобів в умовах їх тривалого застосування у лабораторних щурів.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні завдання:

1. Дослідити профіль токсичності нестероїдних протизапальних

лікарських засобів (диклофенаку, індометацину, ацетилсаліцилової кислоти, мелоксикаму) на тлі їх тривалого (3-місячного введення) лабораторним щурам.

2. Визначити вплив нестероїдних протизапальних лікарських засобів (диклофенаку, індометацину, ацетилсаліцилової кислоти, мелоксикаму) на показники оксидативного/нітрозуючого стресів, тіол-дисульфідної системи, обміну пуринів у тканинах кишківника щурів.

3. Вивчити характер концентрації у тканинах кишківника HSP70, інтермедіатів APUD системи (грелін) та маркерів пошкодження тканини (MMP8, фекальний кальпротектин) у щурів на тлі тривалого введення нестероїдних протизапальних лікарських засобів (диклофенаку, індометацину, ацетилсаліцилової кислоти, мелоксикаму).

4. Оцінити характер впливу нестероїдних протизапальних лікарських засобів (індометацину, диклофенаку ацетилсаліцилової кислоти, мелоксикаму) на ступінь метилювання та фрагментації ДНК, впливу на концентрацію білків Wnt-Hedgehog сигналіngu, гену c-kit та експресію TL-4 рецепторів.

5. На підставі отриманих результатів, провести математичний аналіз кореляційних зав'язків параметрів, що вивчаються, а також з'ясувати їх ступінь впливу на метилювання та фрагментацію ДНК, а також реалізацію побічної дії НПЛЗ.

Об'єкт дослідження: Нестероїдні протизапальні лікарські засоби, механізми токсичної та побічної дії.

Предмет дослідження: маркери оксидативного/нітрозуючого стресу, тіол-дисульфідної системи, обміну пуринів, концентрація HSP70-білків, греліну, маркери пошкодження шлунково-кишкового тракту, ступінь метилювання та фрагментації ДНК, експресія TL4-рецепторів, концентрація молекулярних регуляторів Wnt- Hedgehog сигналіngu та c-kit гену у комплексному дослідженні механізмів токсичних та побічних ефектів нестероїдних протизапальних лікарських засобів на тлі їх тривалого введення лабораторним щурам.

Методи дослідження: у роботі були використані сучасні фармакологічні, токсикологічні, молекулярно-генетичні, математико-статистичні методи.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше, в умовах тривалого призначення досліджуваних НПЛЗ (диклофенак, індометацин, ацетилсаліцилова кислота, мелоксикам) лабораторним щурам, вивчено молекулярно-генетичні механізми деяких токсичних та побічних ефектів, які пов'язані з їх здатністю негативно впливати на антиоксидантно-прооксидантну, тіол-дисульфідну системи, обмін пуринів, концентрацію HSP70-білків, греліну.

Також встановлено, що досліджувані НПЛЗ здатні підсилювати процеси метилювання та фрагментації ДНК, порушувати експресію TL4-рецепторів та дизрегулювати синтез молекулярних регуляторів Wnt- Hedgehog сигналіngu та гену c-kit. У проведеному дослідженні показано кореляцію патобіохімічних та генетичних змін із накопиченням у тканинах кишківника маркерів його пошкодження - MMP8 та фекального кальпротектину.

Вперше встановлено кореляційний зв'язок 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 роль MeDNA, нітротирозину та фрагментації ДНК у патогенезі пошкоджень слизової оболонки кишківника та відкриває нові підходи до їх корекції.

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.

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, експресію TL4-рецепторів, концентрацію білків Wnt- Hedgehog сигналіngu та c-kit гену.

Показано різноспрямований характер побічних ефектів диклофенаку, індометацину, ацетилсаліцилової кислоти та мелоксикаму на вищезазначені

показники. 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 сигналінгу та гену c-kit.

Практичне значення отриманих результатів. Дисертаційна робота присвячена дослідженню фундаментальної проблеми фармакології, а саме встановленню нових механізмів побічних ефектів НПЛЗ (диклофенаку, індометацину, ацетилсаліцилової кислоти, мелоксикаму). 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- Hedgehog сигналінгу 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.

Нові теоретичні положення дисертації використовуються у трьох напрямках: в навчальному процесі 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 ХНМУ МОЗ України; в науковому процесі у 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»; в лікувально-діагностичному процесі у відділенні клініко-діагностичної лабораторії КНП «Міська лікарня №9» ЗМР та клініко-діагностичній лабораторії ННМЦ «Університетська клініка ЗДМФУ». Апробація дисертаційної роботи відбулася на спільному засіданні кафедр Запорізького державного медико-фармацевтичного університету 01 грудня 2023 року.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно проведено інформаційний пошук, проаналізовано сучасну наукову літературу з теми роботи, сформульовано мету та завдання дослідження, розроблено дизайн його виконання. Автором самостійно проведено біохімічні, фармакологічні, токсикологічні, математико-статистичні дослідження у біологічних рідинах експериментальних тварин. Здобувачем особисто систематизовано отримані результати, написано всі розділи дисертаційної роботи, підготовлено до друку наукові праці, впроваджено наукові розробки в роботу наукових установ, лікувальних та начальних закладів України. Автором не запозичені ідеї та розробки співавторів публікацій.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на міжнародних та всеукраїнських наукових форумах: International conference «Modern Molecular-biochemical Markers in Clinical and Experimental Medicine» – 2019 (м. Прага, 2019 р.); Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Сучасні питання молекулярно-біохімічних досліджень та лабораторного скринінгу у клінічній та експериментальній медицині - 2019 р». (м. Запоріжжя, 2019р.); Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Сучасні питання молекулярно-біохімічних досліджень та лабораторного скринінгу у клінічній та експериментальній медицині-2020». (м. Запоріжжя, 2020р.); 81 всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини та фармації – 2021». (м. Запоріжжя, 2021 р.); «I Міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання

лабораторної діагностики та громадського здоров'я» - 2022. (м. Житомир, 2022 р.), V науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» - 2023. (м. Харків, 18 травня 2023 року).

Апробація дисертаційної роботи відбулася на спільному засіданні кафедр Запорізького державного медико-фармацевтичного університету 01 грудня 2023 року.

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

Структура та обсяг дисертації. 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.

РОЗДІЛ 1

МОЛЕКУЛЯРНИЙ ПРОФІЛЬ МЕХАНІЗМІВ НЕБАЖАНОЇ ПОБІЧНОЇ ДІЇ НЕСТЕРОЇДНИХ ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Молекулярні механізми розвитку небажаних побічних реакцій

Нестероїдні протизапальні лікарські засоби є одними з найпопулярніших безрецептурних препаратів у всьому світі, складаючи 5% всіх ліків, що призначаються [15].

Традиційно, НПЛЗ класифікувалися на основі їх хімічних характеристик, при цьому більшість популярних НПЛЗ відносять до основних похідних саліцилової кислоти, оцтової кислоти, енолевої кислоти, антранілової кислоти або пропіонової кислоти. Однак, з розвитком наукових знань, класифікація була змінена відповідно до їх селективності в інгібуванні ферментів циклооксигенази/простагландин-ендопероксидсинтази (PGHS), які є основними мішенями цих препаратів. Крім того, було розроблено систему класифікації НПЛЗ на основі періоду їх напіввиведення. Проте, незважаючи на міжкласову різноманітність, їх функції схожі. НПЛЗ, в основному, використовуються для лікування пацієнтів, які страждають від болю та запальних станів, таких як хронічний біль, остеоартрит, ревматоїдний артрит, післяопераційні хірургічні стани, менструальні спазми, і навіть широко використовуються, як анальгетики та жарознижувальні засоби [16].

Загальний механізм дії НПЛЗ включає інгібування циклооксигенази/простагландин-ендопероксидсинтази (PGHS-1 і PGHS-2), регуляторних ферментів, що беруть участь у біосинтезі простагландину (ПГ), який бере активну участь у запаленні. Вважається, що PGHS-1 виконує багато біологічних функцій, включаючи захист слизової оболонки шлунка, тоді як PGHS-2 відповідає за запалення. Деякі нестероїдні протизапальні засоби є

неспецифічними інгібіторами обох ферментів, в той час як інші є специфічними, особливо «коксиби», які специфічно інгібують PGHS-2. Раніше вважалося, що інгібітори PGHS-1, інгібуючи синтез ПГ у слизовій оболонці шлунка, можуть викликати шлунково-кишкові ускладнення. Разом з цим, останніми роками з'явилися зворотні дані [17]. Перехід на коксиби вважався ефективним, оскільки PGHS-2 є індукбельним і не має прямого відношення до захисту слизової оболонки шлунка, а скоріше бере участь у запаленні. Інгібування PGHS-2 коксибами мало бути достатнім для безпечного використання та нівелювання шлунково-кишкових та інших ускладнень [18]. Але низка проведених експериментально-клінічних досліджень поставили під сумнів цю теорію. З'явилось кілька наукових повідомлень про побічні ефекти інгібіторів PGHS-2 на серцево-судинну систему, а подальші плацебо-контрольовані дослідження також показали, що ці інгібітори пов'язані з підвищеним ризиком атеротромботичних судинних процесів [18, 19].

Відомо, що побічні ефекти, у вигляді утворення виразок, можливо, зумовлені пригніченням циклооксигенази-1 (ЦОГ-1), яка відповідає за синтез простагландинів, що захищають слизову оболонку шлунка. Ці ушкодження більш ймовірні у пацієнтів, які у минулому мали пептичну виразку. Оскільки ця проблема є специфічною для ЦОГ-1, використання селективних НПЛЗ - інгібіторів ЦОГ-2, на сьогоднішній день, є альтернативою, яка може зменшити загальну кількість та вираженість побічних реакцій, хоча з деяким погіршенням ефективності [20].

Одночасно з класичним уявленням щодо розвитку PGHS/PG-залежного типу токсичності НПЛЗ, почали з'являтися дослідження, в яких продемонстровано прямий вплив НПЛЗ на мітохондрії з подальшою генерацією ними клітинного окислювального стресу та індукцією апоптозу. Дослідники розглядають розвиток окислювального стресу, на сьогодні, як один з незалежних шляхів НПЛЗ-токсичності [18].

Останнім десятиріччям спостерігається постійне збільшення кількості НПЛЗ, а також розширення показань до їх застосування. Слід зауважити, що пацієнти, у

більшості випадків, власноруч встановлюють режим дозування та обирають показання до застосування. Цілком логічним є ріст кількості небажаних побічних реакцій, у тому числі, тяжких. У зв'язку з цим дуже важливим є точне розуміння молекулярного механізму та сигнальних шляхів, що беруть участь, як у реалізації терапевтичних так і побічних ефектів НПЛЗ. Крім того, розроблюються нові, ефективні фармако-технологічні шляхи, що підвищують, по-перше, ефективність НПЛЗ; по-друге, обмежують розвиток їх токсичних та побічних ефектів. Так, Food and Drug Administration (FDA) запропоновано хімічну модифікацію нестероїдних протизапальних засобів шляхом модифікації фармакофорів, яка спрямована на зниження їх токсичних ефектів та поліпшення їх біодоступності без шкоди для терапевтичного ефекту. Вже проведено великі дослідження з аналізу ефектів НПЛЗ на молекулярному рівні, а також розробку нових комбінованих препаратів у вигляді НПЛЗ-проліків з підвищеною ефективністю [15].

Крім того, почали з'являтися дані щодо можливого впливу НПЛЗ на неопластичні процеси, зокрема у ШКТ. Деякі дослідження пов'язують ці ефекти як з впливом НПЛЗ на антиоксидантно-прооксидантну систему, а також їх епігенетичними ефектами, механізм яких, також обумовлений оксидативним стресом.

Таким чином, на сьогодні, класичний механізм ульцерогенної дії НПЛЗ, пов'язаний з блокадою ЦОГ1, не задовольняє запити дослідників, враховуючи різноманітний профіль токсичної та побічної дії НПЛЗ, що обумовлює перспективність досліджень у цьому напрямку. Особливу увагу, на сьогодні, мають дослідження, які направлені на розкриття механізмів можливих неопластичних ефектів НПЛЗ. Аналіз літературних джерел вказує на перспективність досліджень молекулярних механізмів побічних ефектів НПЛЗ у площині їх впливу на антиоксидантно-прооксидантну систему, характер імунної відповіді, пошкодження нуклеїнових кислот (метилування або фрагментація), а також НПЛЗ-опосередкованої індукції експресії молекулярних регуляторів онкогенів та сигналінгів клітинного циклу [18-20].

1.2. Вплив НПЛЗ на показники антиоксидантної та тіол-дисульфідної системи у тканинах шлунково-кишкового тракту

Відомо, що в нормі, існує баланс між вільними радикалами кисню і системами антиоксидантного захисту і втрата цього балансу викликає окислювальний стрес. Низькі концентрації активних форм кисню (АФК) можуть слугувати сигнальними молекулами та регулювати важливі метаболічні шляхи, Разом з цим, гіперконцентрації АФК можуть викликати окисне пошкодження молекул та клітин, виступаючи у ролі дизрегуляторів молекулярно-біохімічних клітинних процесів [21].

Втрата фізіологічного балансу окислювально-відновної передачі сигналів, яка життєво важлива для регуляції оновлення, проліферації та диференціювання клітин, сприяє патогенезу шлунково-кишкових розладів та ініціюванню в них неопластичних процесів. За останніми даними, порушення між оксидантним і антиоксидантним статусом виявлені при хронічному гастриті, кишковій метаплазії, виразковій хворобі, а також раку шлунка та кишківника з багатьма різними патологічними шляхами та кінцевими продуктами в широкому спектрі [22]. В умовах гіперпродукції АФК та розвитку оксидативного стресу, активізується синтез тіолових інтермедіаторів тіол-дисульфідної системи, який направлений на інактивацію АФК та відновлення оксидантно-прооксидантного статусу клітини [23]. Тіолові групи (меркаптани) є потужними антиоксидантними молекулами і включають водневі та сульфгідрильні групи, які відіграють важливу роль у нейтралізації АФК ферментативним або неферментативним шляхом. Тіоли можуть піддаватися реакції окислення за допомогою окислювачів і утворювати дисульфідні зв'язки. Дисульфідні зв'язки, що утворилися в нормальних умовах, можуть знову відновлюватися до тіолових груп, при цьому динамічний тіол-дисульфідний гомеостаз продовжує підтримуватися [23].

Як індикатор антиоксидантної здатності, тіол-дисульфідний гомеостаз регулює детоксикацію, механізми клітинного сигналу, апоптоз, транскрипцію та

механізми антиоксидантного захисту. Крім того, порушення регуляції тіолового/дисульфідного гомеостазу виявлено при раку простати, раку легень, кардіотоксичності та захворюваннях шлунково-кишкового тракту [24, 25].

Нестероїдні протизапальні препарати зазвичай призначаються практикуючими лікарями при багатьох клінічних станах для симптоматичного лікування болю та лихоманки. Завдяки своїм протизапальним властивостям ці препарати досліджувалися щодо їх протиракової дії у численних дослідженнях. Це пов'язано з тим, що хронічні запалення давно асоціюються з канцерогенезом. Вважається, що протизапальні препарати мають певні позитивні ефекти у лікуванні та профілактиці раку. Дослідження останніх десятиліть показали, що НПЛЗ можуть знизити ризик розвитку деяких видів раку. Однак, зростає кількість досліджень, що доводять протилежне, особливо при їх тривалому застосуванні [2]. Враховуючи важливу роль оксидативного стресу у ініціації онкогенезу, особливу увагу, заслуговують дослідження, в яких вивчено вплив НПЛЗ на стан антиоксидантно-прооксидантної та тіол-дисульфідних систем.

Так, нестероїдні протизапальні препарати ефективні для зменшення больового ефекту та запалення. Однак широке, тривале та без рецептурне застосування нестероїдних протизапальних засобів може викликати у пацієнтів різні побічні ефекти. Nawaz Н. та співавт. було вивчено хронічний вплив НПЛЗ на окисний стрес та антиоксидантний статус у хворих на ревматоїдний артрит (РА). У дослідження було включено 100 жінок, розділених на чотири основні групи: контрольна група, що складається зі здорових людей відповідного віку та статі, особи, які приймають НПЛЗ, без будь-якого анамнезу РА, особи з РА, які мають в анамнезі РА, але не приймали НПЛЗ та особи з хронічним РА і приймають НПЛЗ протягом тривалого періоду. Сироватку учасників аналізували щодо окислювального стресу та антиоксидантного статусу. Було доведено, що тривале застосування нестероїдних протизапальних засобів значно посилювало окислювальний стрес і знижувало антиоксидантний потенціал, як у хворих на ревматоїдний артрит, так і у осіб з неревматоїдним артритом [26].

В іншому дослідженні, в кишківнику щурів, вивчали дію двох селективних

інгібіторів циклооксигенази-2 (ЦОГ-2), целекоксибу та німесулід, порівняно з неселективним інгібітором ЦОГ1, 2 - аспірином. Самок щурів розділили на чотири групи: 1 (контроль), група 2 – аспірин, група 3 – німесулід та група 4 – целекоксиб. Через 35 днів лікування, тварин умертвляли, видаляли кишківник та вивчали вплив на систему антиоксидантного захисту, склад та функції мембран, а також мембраноспецифічні ферменти у різних відділах кишківника. Дослідження показало значне збільшення рівнів маркерів перекисного окиснення ліпідів, за винятком групи, яка отримувала целекоксиб. Значне зниження активності глутатіону (GSH), супероксиддисмутази (СОД), глутатіон-S-трансферази та каталази спостерігалось також у групі аспірину та німесулід, у той час як целекоксиб викликав підвищення активності глутатіонредуктази. Ці результати показують, що целекоксиб можна вважати безпечнішим препаратом з точки зору загальної шлунково-кишкової токсичності порівняно з аспірином та німесулідом [27].

В іншому дослідженні, для оцінки впливу трьох нестероїдних протизапальних препаратів з різною селективністю циклооксигенази, вивчався статус антиоксидантних ферментів у тканинах тонкого кишківника при введенні канцерогену - 1,2-диметилгідразину (ДМГ). Самців щурів розділили на п'ять різних груп: група 1 (контрольна); група 2 (лікування ДМГ, 30 мг/кг маси тіла на тиждень, підшкірно); група 3 (ДМГ + аспірин 60 мг/кг маси тіла); група 4 (ДМГ + целекоксиб 6 мг/кг маси тіла); 5-та група (ДМГ + еторикоксиб 0,64 мг/кг маси тіла). Мітохондріальна фракція була виділена з сегментів кишківника і вивчені різні параметри, такі як маркерні продукти пероксидації ліпідів, відновлений та загальний глутатіон, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-S-трансфераза, оксид азоту. Через 6 тижнів лікування НПЛЗ результати свідчили про їх позитивний вплив на деякі компоненти антиоксидантного захисту кишківника, особливо їх позитивний вплив на активність ключових ферментів антиоксидантної системи. Таким чином, дослідження демонструє можливий механізм хіміопрофілактичної дії нестероїдних протизапальних засобів на тлі ДМГ-опосередкованому канцерогенезі [28].

Разом з цим, дослідженнями Okoroama С.Е. та співавт. було показано здатність ібупрофену, навпаки індукувати розвиток оксидативного стресу. Ними було проведено експериментальне дослідження, яке складалось із двох частин; в першій частині, викликали ушкодження нирок, а в другій, визначали захисну роль антиоксидантів проти пошкодження нирок, спричиненого ібупрофеном. Тварини були розділені на п'ять груп, причому групи 1-4 мали три підгрупи, які отримували 120 мг/кг ібупрофену та градуйовані дози вітаміну Е, вітаміну С та кверцетину відповідно, а п'ята група служила контролем. Через 14 днів спостерігали значне ($p < 0,05$) збільшення рівнів малонового діальдегіду, сечовини, креатиніну та сечової кислоти після введення ібупрофену. І навпаки, відбувалося достовірне ($p < 0,05$) зниження показників нирок після одночасного застосування антиоксидантів з ібупрофеном за значного збільшення антиоксидантних ферментів. Розрахунковий відсоток антиоксидантного захисту показав, що вітамін Е забезпечує найбільший захист нирок від ушкоджень, спричинених ібупрофеном, серед інших. Доведено, що антиоксиданти, такі як α -токоферол, вітамін С, кверцетин, захищають пошкодження нирок, спричиненого ібупрофеном, у щурів лінії Вістар [29].

Лікування хронічних запальних захворювань обумовлює постійне тривале застосування НПЛЗ, які поряд з терапевтичним ефектом викликають пошкодження слизової оболонки шлунка, або дванадцятипалої кишки у вигляді пептичних виразок. Тривалий час, вважалось, що традиційні НПЛЗ, наприклад такі, як диклофенак, ацетилсаліцилова кислота, ібупрофен, мефенамінова кислота, кетопрофен та інші, які інгібують простагландини Е2 та безпосередньо впливають на виникнення пошкоджень слизової оболонки шлунка. Ця гіпотеза спонукала до розробки селективних НПЛЗ до циклооксигенази-2 – целекоксибу, рофекоксибу, вальдекоксибу, парекоксибу, еторикоксибу, луміракоксибу та інших. Проте, проведені дослідження на 124514 пацієнтах щодо тривалого застосування НПЛЗ різноманітних селективних та неселективних інгібіторів циклооксигенази-2 включаючи напроксен, диклофенак, ібупрофен, еторикоксиб, рофекоксиб, вальдекоксиб і інших, підтвердили підвищений ризик виникнення пошкоджень

верхніх відділів шлунково-кишкового тракту при застосуванні всіх вищезазначених НПЛЗ. Показано, що механізм цих пошкоджень, обумовлений простагландин опосередкованим розвитком оксидативного стресу. Крім того, селективні інгібітори циклооксигенази-2 можуть мати серцево-судинну токсичність, тому їх призначення обмежене низьким дозуванням та короткочасним застосуванням, що, не в повній мірі, відповідає вимогам тривалого використання НПЛЗ при хронічних проявах хвороби [30, 31, 32, 33].

Таким чином, вищенаведеними дослідженнями показана здатність певних НПЛЗ, у певних дозах, особливо на тлі їх тривалого призначення, дійсно ініціювати розвиток оксидативного стресу та чинити окисну деструкцію макромолекул.

Водночас, паралельними дослідженнями було висвітлено провідну роль саме оксидативного, нітрозуючого стресів у молекулярних механізмах онкогенезу.

Так, рак легень є однією з найчастіших причин смертності у всьому світі. Підвищений синтез активних форм кисню відбувається при ушкодженні клітин, а цистеїн є важливим фактором запобігання окислювального ушкодження завдяки своїй функціональній тіоловій групі. Şener M. U. зі спіавт. було оцінено взаємозв'язок між тіол-дисульфідним гомеостазом (ТДГ) та факторами ризику, тяжкістю захворювання, та фізичним станом пацієнтів з раком легень. В цьому проспективному контрольованому дослідженні брали участь здорові добровольці та пацієнти з діагнозом рак легень. Серед пацієнтів було 45 чоловіків (90%) та п'ять жінок (5%) (середній вік 64 ± 9 років), а також 41 чоловіків (82%) та дев'ять жінок (18%) здорових добровольців (середній вік 65 ± 17 років). Загалом рівні тіолів були нижчими у пацієнтів, ніж у контрольній групі ($p < 0,001$). Середній рівень нативного тіолу становив 275 ± 72 мкмоль/л у групі пацієнтів та 414 ± 80 мкмоль/л у контрольній групі, а середній рівень загального тіолу становив 309 ± 74 та 451 ± 79 мкмоль/л відповідно. Однак параметр дисульфїду статистично значимо не відрізнявся між двома групами. Кореляції між розміром пухлини та загальною виживаністю, а також рівнями загального тіолу, нативного тіолу та дисульфїду не виявлено. Це дослідження показало, що існує значний зв'язок між раком легень та

ТДГ, але кореляції зі стадією захворювання та клінічним станом не виявлено [34].

Відомо, що тіол-дисульфідний гомеостаз регулює детоксикацію, модулює механізми клітинного сигналу, апоптоз, транскрипцію та механізми антиоксидантного захисту. За останніми даними, порушення регуляції тіол-дисульфідного гомеостазу виявлено при різних типах раку ШКТ. Mutlu Hizal та спіавт. оцінено тіол-дисульфідний гомеостаз у хворих на рак шлунка на пізніх стадіях. До дослідження було включено пацієнтів з діагностованим раком шлунка та здорові особи контрольної групи. Зразки сироватки, для тіол-дисульфідного тесту, були отримані під час встановлення діагнозу. Тести тіол-дисульфідного гомеостазу вимірювали автоматизованим спектрофотометричним методом. Рівні нативного тіолу (NT) та загального тіолу (TT) у групі пацієнтів були значно нижчими порівняно з контролем ($p = 0,001$ та $p < 0,001$). У групі з високим вмістом СЕА ($\geq 5,4$ нг/мл) співвідношення дисульфідиду/нативного тіолу (DS/NT) було вищим порівняно з групою з низьким вмістом СЕА ($< 5,4$ нг/мл) ($p = 0,024$). У групі з високим рівнем СА19-9 ($\geq 28,3$ кЕд/л) як DS, так і співвідношення DS/NT були значно вищими порівняно з групою з низьким рівнем СА19-9 ($< 28,3$ кЕд/л) ($P < 0,05$ в обох випадках). Кореляція між рівнями РЕА та ЦД також була значущою ($p = 0,02$). Також спостерігалася позитивна кореляція між рівнями СЕА та співвідношенням NT /TT ($p = 0,01$). Порушення тіол-дисульфідного гомеостазу може відігравати певну роль у патогенезі раку шлунка, а більш високий рівень окисного стресу може бути пов'язаний з метастазуванням та прогресуванням злякисного новоутворення [35].

Разом з цим, взаємозв'язок між раком і застосуванням НПЛЗ складний, і висновок про те, що препарати, які мають протизапальну дію, також захищають від раку, безсумнівно, є надмірним спрощенням. Попередні дослідження показали, що використання НПЛЗ пов'язане з підвищеним ризиком прогресування та смертності при деяких типах раку [8, 36]. Крім того, тривале застосування нестероїдних протизапальних засобів часто пов'язане з багатьма серйозними побічними ефектами на серцево-судинну систему, шлунково-кишковий тракт, нирки [9, 37].

Вищевикладене є обґрунтуванням доцільності вивчення механізмів можливих побічних ефектів у площині їх впливу на показники оксидативного, нітрозуючого стресів, тіол-дисульфідної системи.

1.3 Вплив НПЛЗ на фактори ендогенної цитопротекції (HSP 70) та маркерів пошкодження тканини (MMP8) у тканинах шлунково-кишкового тракту на тлі їх тривалого введення

Відомо, що НПЛЗ, як і всі ксенобіотики, можуть мати різний вплив на клітинні процеси, включаючи експресію білків теплового шоку (HSP), таких як HSP70. З однієї сторони, HSP70 є так званими факторами цитопротекції, та відіграють одну з ключових ролей у каскаді знешкодження та деінактивації шкідливих факторів зовнішнього середовища, у тому, числі ксенобіотиків [20, 38]. Разом з цим, білки теплового шоку, включаючи HSP70, є групою молекулярних шаперонів, які відіграють вирішальну роль у підтримці клітинного гомеостазу та захисті клітин від стресових факторів, а також виступати у ролі регуляторів клітинного циклу [38].

За даними літературних джерел, НПЛЗ можуть впливати на HSP70 по-різному:

✓ Індукцією HSP70: Деякі НПЛЗ, такі як аспірин та індометацин, можуть індукувати експресію HSP70. Ця індукція може бути частиною клітинної реакції для протидії стресу та запаленню, спричиненим самими НПЛЗ. Індукція HSP70 вважається захисною реакцією на клітинний стрес [39].

✓ Протизапальною дією: в першу чергу діють, зменшуючи запалення і таким чином вони можуть опосередковано впливати на експресію HSP70. Запальні процеси можуть призводити до регуляції різних білків, що реагують на стрес, включаючи HSP70. Зменшуючи запалення, НПЛЗ можуть зменшити потребу клітин у виробленні HSP70 у відповідь на запальний стимул [40].

✓ Взаємодією з клітинною сигналізацією: НПЛЗ можуть впливати на різні клітинні сигнальні шляхи. Деякі з цих шляхів можуть брати участь у

регуляції експресії HSP70. Наприклад, інгібуванням ЦОГ-2, НПЛЗ може впливати на вироблення простагландинів, що, у свою чергу, може впливати на клітинні сигнальні каскади, які регулюють експресію HSP70 [41].

✓ Тип впливу залежить від типу клітин та мікрооточення. Так, різні клітини можуть по-різному реагувати на вплив НПЛЗ, що призводить до варіацій експресії HSP70. Показана роль HSP-білків у процесах онкогенезу, зокрема, їх здатність підтримувати життя онкозмінених клітин та регулювати їх клітинний цикл [42, 43].

✓ Цитопротекторна дія: хоча НПЛЗ в основному використовуються через їх протизапальні властивості, вони також можуть мати цитопротекторну дію. Деякі дослідження показали, що НПЛЗ, зокрема аспірин, можуть захищати клітини від пошкоджень, спричинених різними стресовими факторами, потенційно залучаючи регуляцію HSP70, як частину цього захисного механізму [44].

Крім того, низкою досліджень показано, що HSP70 білки можуть відігравати роль у регуляції епігенетичних процесів, таких як метилювання ДНК та модифікація хроматину. Встановлено, що HSP70-білки можуть взаємодіяти з ферментами, відповідальними за метилювання ДНК. Ця взаємодія може впливати на активність цих ферментів і, таким чином, змінювати рівні метилювання ДНК, що може мати епігенетичні наслідки. HSP70 також можуть впливати на модифікацію хроматину, таку як ацетилювання та метилювання гістонів. Дослідження показують, що зміни в рівнях HSP70 можуть впливати на активність гістонових метилтрансфераз та ацетилтрансфераз, що, в свою чергу, може змінювати структуру хроматину [44, 45].

Специфічний вплив НПЛЗ, на експресію HSP70, може відрізнятися залежно від препарату, дози, тривалості впливу та специфічного клітинного контексту. Крім того, клінічні наслідки цих взаємодій все ще залишаються активною областю досліджень, і необхідні додаткові дослідження, щоб повністю зрозуміти механізми та наслідки індукованих НПЛЗ змін експресії HSP70 [45]. Є дані, що запалення може впливати на експресію теплових шоківих білків, включаючи

HSP70. Таким чином, зміни в рівнях HSP70, викликані НПЛЗ, можуть впливати на епігенетичні процеси в контексті запалення.

Запальні захворювання кишківника (ЗЗК) являють собою хронічні ідіопатичні розлади, включаючи хворобу Крона (ХК) та неспецифічний виразковий коліт (НВК), при яких одним із пускових факторів є аберантні імунні взаємодії між кишковим епітелієм та кишковою мікробіотою. Вивчення білків теплового шоку, як етіологічних і патогенетичних факторів цих патологічних станів, набуває все більшого інтересу. Виявлено, що HSP диференційовано експресуються в тканинах кишківника пацієнтів з ХК та ЗЗК. Показано, що HSP можуть відігравати подвійну роль у розвитку захворювання, залежно від стадії прогресування. Вони можуть ініціювати та підтримувати запальний процес, але також можуть діяти як захисні фактори під час прогресування захворювання або перед виникненням одного з найважчих ускладнень хронічних ЗЗК - колоректального раку та ініціації неопластичних процесів. Крім того, HSP здатні опосередковувати взаємодію між кишковою мікробіотою та епітеліальними клітинами кишківника. Показана участь HSP-білків у розвитку ЗЗК, враховуючи їх генетичну, епігенетичну, імунну та молекулярну роль, посилаючись на найновіші роботи, представлені в літературі. Встановлені окремі функції HSP-білків, або, молекулярної системи шаперонів (CS) при ЗЗК: різні молекули CS, включаючи HSP, можуть мати діагностичний, прогностичний, терапевтичний, та інколи, онкогенний потенціали [46, 47, 48].

Показано вплив диклофенаку на HSP 70 -білки. Зокрема, дослідженнями Kim (2016) зі співавт. показано, що диклофенак послаблює запальні реакції, які індуковані 27-гідроксихолестерином, за рахунок HSP взаємодії, що вказує на його потенційний протизапальний ефект. Sakai (1996) продемонстровано, що диклофенак пригнічує експресію молекул адгезії в ендотеліальних клітинах, стимульованих ліпополісахаридом. Nackiewicz (2020) зі співавт. показано, що диклофенак зазнає трансформації в присутності октакарбокситалоціаніну заліза (II), що свідчить про його вплив на каталітичну активність ферментів антиоксидатного захисту. Дослідженнями Sokołowska (2022) зі співавт. виявлено,

що диклофенак зменшує концентрацію прозапальних цитокінів, індуковану тунікаміцином в ендотеліальних клітинах, що вказує на його потенційну роль у відновленні гомеостазу. Ці дані, в сукупності, дозволяють припустити, що диклофенак може впливати на HSP70 через свої протизапальні властивості, а також впливом на каталітичну активність ферментів антиоксидантного захисту та модуляцію шляхів розгорнутої цитокінової відповіді [49, 50, 51, 52].

Разом з цим, низкою досліджень показано, що HSP70 часто надекспресується у ракових клітинах, та за рахунок своєї шаперонної активності, може сприяти процесу утворення пухлини. Таким чином, фармакологічний вплив на концентрацію HSP70 у ракових клітинах може бути ефективним засобом запобігання прогресуванню пухлин. Так, низкою досліджень показано, що ібупрофен помітно пригнічує експресію HSP70 у клітинах, отриманих з аденокарциноми легені і підвищує їхню чутливість до цисплатину у поєднанні зі збільшенням мітохондріального апоптотичного каскаду, при цьому він не сприяв процесам апоптозу онкозмінених клітин *in vitro*. Залежні від цисплатину події, що відбуваються до і після руйнування мітохондрій, прискорювалися під час лікування ібупрофеном. Збільшення індукованого цисплатином апоптозу, викликане виснаженням HSP70 з допомогою РНК-інтерференції, свідчить про те, що посилення процесів клітинної загибелі, опосередковано через його негативний вплив на HSP70. Дослідники показують, що пригнічення HSP70 ібупрофеном, сприяє підвищенню чутливості до цисплатину за рахунок посилення апоптозу на декількох стадіях мітохондріального каскаду. Таким чином, ібупрофен може бути потенційним терапевтичним агентом, який здатний знизити дози цисплатину та обмежити розвиток багатьох побічних ефектів, пов'язаних з його токсичністю та розвитком толерантності. Разом з цим, слід зазначити, що ці дослідження проводились *in vitro*, на сьогодні існує багато суперечливих даних, щодо впливу НПЛЗ на концентрацію HSP70 на макроорганному рівні [42, 53, 54].

При протидії розвитку ulcerогенної дії НПЛЗ, важливо не лише запобігти подальшому утворенню виразок, але й прискорити їх загоєння. В умовах негативного впливу НПЛЗ на клітини ШКТ, індукується експресія білків

теплого шоку, що робить клітини стійкими до подразників. Експериментальними дослідженнями на мишах, було показано, що білки теплового шоку, особливо HSP70, запобігають утворенню НПЛЗ-опосередкованої виразки шлунка. Загоєння виразки шлунка - процес, що включає проліферацію та міграцію клітин по краях виразки та ангиогенез у грануляційній тканині. Так, дослідженнями Ishihara T. та співавт. вивчено роль HSP70 у загоєнні виразки шлунка. Встановлено, що експресія HSP70 індукувалася, як у краях виразки шлунка так і в грануляційній тканині. У порівнянні з мишами дикого типу, загоєння виразки шлунка прискорювалося у трансгенних мишей, що експресують HSP70, також посилювалася проліферація клітин по краях виразки шлунка та ангиогенез у грануляційній тканині. Пероральне введення геранілгеранілацетону, індуктора HSP, мишам, до або після утворення виразки, не тільки індукувало експресію HSP70 у шлунку, але й прискорювало загоєння виразки шлунка. З іншого боку, пероральне введення очищеного рекомбінантного HSP70 до утворення виразки, стимулювало загоєння виразки шлунка. Це дослідження надає перші докази, що HSP70 прискорює репаративні процеси у тканинах ШКТ. Результати також дозволяють припустити, що в цьому прискореному процесі загоєння беруть участь як HSP70, що виробляється до утворення виразки і вивільняється з пошкоджених клітин, так і HSP70, що виробляється після виразки, як можлива компенсаторна реакція [55, 56, 57].

У зв'язку з удосконаленням діагностичних процедур щодо виявлення уражень кишківника стало зрозуміло, що нестероїдні протизапальні препарати, такі як індометацин, викликають ураження не лише шлунка, а й кишківника. Проте клінічні протоколи лікування НПЛЗ-індукованих уражень тонкої кишки не створено. Відомо, що білки теплового шоку (HSP), особливо HSP70, забезпечують захист від різних стресорів, а нещодавно була виявлена протизапальна активність HSP70. Дослідниками, вивчено вплив експресії HSP70 на викликані індометацином ураження тонкої кишки. Ступінь викликаних індометацином уражень тонкої кишки був знижений у трансгенних мишей, що експресують HSP70, порівняно з контрольною групою. Пероральне введення індометацину

збільшувало експресію HSP70 у тонкому кишківнику. Введення індометацину також індукувало апоптоз клітин слизової оболонки та експресію прозапальних цитокінів у тонкому кишківнику контрольних мишей, при цьому обидві ці відповіді пригнічувалися у трансгенних мишей. Геранілгеранілацетон (GGA), що клінічно використовується як противиразковий препарат, збільшував експресію HSP70 у тонкому кишківнику і пригнічував викликані індометацином ураження тонкого кишківника у мишей. Ці результати дозволяють припустити, що індуковане індометацином збільшення експресії HSP70 зменшує ступінь ураження тонкої кишки за рахунок пригнічення апоптозу клітин слизової оболонки та запальних реакцій [58, 59].

Селективні інгібітори зворотного захоплення серотоніну нещодавно стали потенційними кандидатами на новий терапевтичний підхід до лікування виразкової хвороби та шлунково-кишкових кровотеч. HSP70 відіграє важливу роль у підвищенні клітинної резистентності до нестероїдних протизапальних препаратів. Khotib J. та співавт. досліджував вплив селективного інгібітора зворотного захоплення серотоніну на розвиток виразкової хвороби шлунка, викликаній нестероїдними протизапальними засобами, стресом та можливою участю у цьому HSP70-білків. Індукція стресу здійснювалася за допомогою методу «занурення у воду щурів, плюс утримання». Виразка шлунку, викликана прийомом нестероїдних протизапальних засобів, була індукована пероральним прийомом індометацину. Селективний інгібітор зворотного захоплення серотоніну був введений перорально за 30 хвилин до індукції стресу та лікування індометацином. Наприкінці дослідження з'ясувалося, що стрес та лікування індометацином значно збільшували виразковий індекс та частоту виникнення кровотеч ШКТ. Стрес та введення індометацину призводило також до значного приросту HSP70-білків, що розглядалось дослідниками, як можлива компенсаторно-адаптаційна реакція [60].

Протилежну динаміку концентрації HSP70-білків, на тлі призначення НПЛЗ, було продемонстровано дослідженнями Beyer I. та співавт. Відомо, що запалення, у літніх людей, асоціюється з квалістю, кахексією та може призводити до

інвалідності. Лікування НПЛЗ, в комплексі з антибіотикотерапією, у літніх пацієнтів з гострою інфекцією, швидко знижувало рівень запальних цитокінів і мало терапевтичний потенціал для покращення результатів лікування. Авторами було проведено подвійне сліпе контрольоване дослідження за участю геріатричних пацієнтів, госпіталізованих з приводу гострої інфекції. Пацієнти були рандомізовані на групи з призначенням 10 мг піроксикаму та плацебо, віком ≥ 70 років з рівнем С-реактивного білка >10 мг/л на тлі гострого інфекційного процесу. Цито-/хемокіни, а також білки теплового шоку HSP27 та HSP70 вимірювали в перші 4 дні, а потім щотижня до виписки. У дослідженні було включено 30 пацієнтів європеїдної раси (середній вік 84,5 років, 67% жінок, середній рівень С-реактивного білка 87,5 мг/л). У групі піроксикаму рівень інтерлейкіну 6 (IL-6) та IP-10/CXCL10 значно знизився протягом періоду дослідження. Взаємозв'язки між цитокінами були порушені в групі піроксикаму: для 12 з 20 цитокінів кількість кореляцій між змінами сироваткових рівнів була значно нижчою порівняно з плацебо. Рівень HSP70, в сироватці крові, значно знизився в групі піроксикаму, але не в групі плацебо. Рівні HSP70, в моноцитах, знижувались в обох групах, тоді як HSP27 в моноцитах підвищувались при застосуванні піроксикаму зі значною різницею порівняно з плацебо через 3 тижні. Піроксикам, у цьому контексті, дослідники розглядали не лише як протизапальний препарат, а більшою мірою, як імуномодулятор. Необхідні подальші дослідження, щоб встановити, чи можуть ці ефекти змінити функціональні результати у геріатричних пацієнтів [61].

Захист слизової оболонки кишківника від дії нестероїдних протизапальних препаратів залишається невирішеною проблемою. Встановлено, що апоптоз в епітеліальних клітинах, внаслідок пошкодження мітохондрій, є важливою ланкою патогенезу індометацин-індукованого пошкодження слизової оболонки шлунку. У дослідженні Lee J. та співавт. показано *in vitro* вплив гіперекспресії білку HSP70 на індукований індометацином апоптоз та оксидативний стрес. Для цього використано клітини слизової оболонки шлунка щурів (клітини 7018-RGM-1) та контрольні клітини (клітини рВК-СМV-12), які гіперекспресували HSP70 та

обробляли 0-500 мкМ індометацину протягом 24 год. Життєздатність клітин та цитотоксичність вимірювали за допомогою тесту WST-8 та тесту на вивільнення лактатдегідрогенази. Процеси апоптотичної загибелі клітин вивчали за допомогою флуоресцентної мікроскопії з фарбуванням Hoechst та етидіумом. Експресію білків Bcl-2, активацію каспази-3 та 4-гідрокси-2-ноненал (4-HNE)-модифікованих білків оцінювали за допомогою вестерн-блот-аналізу. Було встановлено, що гіперекспресія HSP70 може потенціювати стійкість до апоптозу та оксидативного стресу за індукованим індометацином пошкодженням епітеліальних клітин шлунка, що може розглядатись як потенційно небезпечний фактор ініціації неопластичних процесів ШКТ [62, 63].

Епідеміологічні дані свідчать про те, що нестероїдні протизапальні препарати та інгібітори циклооксигенази 2 можуть чинити хіміопрофілактичну та протипухлинну дію при багатьох видах неоплазій. Це особливо стосується раку товстої кишки (РТК), де, як було доведено, ці препарати мають хіміопрофілактичну та хіміотерапевтичну дію. З кінця 90-х років з'являється все більше експериментальних даних, які вказують на те, що антипроліферативні ефекти НПЛЗ та ЦОГіб при РТК можуть залежати від інгібування ЦОГ. Були розглянуті деякі з цих незалежних від ЦОГ клітинних шляхів, приділяючи особливу увагу тим, які беруть участь у пригніченні проліферації клітин при ХК через перехресні впливи транскрипційних факторів [64, 65, 66].

Численні епідеміологічні дослідження повідомляють, що тривале застосування нестероїдних протизапальних препаратів пов'язане зі значним зниженням захворюваності на рак і уповільненням прогресування злоякісних захворювань. Застосування НПЛЗ також пов'язане зі зниженням ризику смертності від раку та віддалених метастазів. Доведено, що деякі НПЛЗ, які відпускаються за рецептом, такі як суліндак, спричиняють регресію передракових станів. На жаль, тривале застосування НПЛЗ з метою хіміопрофілактики призводить до потенційно фатальних побічних ефектів, пов'язаних з їхньою ЦОГ-інгібуючою активністю та пригніченням синтезу простагландинів, активацією клітинних шаперонів, у тому числі, HSP-білків. Хоча, в основі інгібування

пухлинного росту, ймовірно, лежить множинний вплив НПЛЗ на пухлинні клітини та їхнє мікрооточення, численні дослідники дійшли висновку, що основний механізм не повністю пояснюється інгібуванням ЦОГ. Тому, можливо, доцільно розробити безпечніші та ефективніші ліки, які здатні впливати на ЦОГ-незалежні механізми. Похідні або метаболіти НПЛЗ, які не мають ЦОГ-інгібуючої активності, але зберігають або мають покращену протиракову активність, підтверджують цю можливість. Експериментальні дослідження свідчать, що індукція апоптозу та пригнічення β -катенін-залежної транскрипції є важливими аспектами їхньої протипухлинної активності. Дослідження показують, що останнє пов'язане з інгібуванням фосфодіестерази та підвищенням внутрішньоклітинного рівня циклічного гуанозинмонофосфату [67, 68, 69].

Важливим доказом зв'язку між запаленням і раком є те, що нестероїдні протизапальні препарати, такі як аспірин, знижують ризик і смертність від багатьох видів раку. Той факт, що НПЛЗ інгібують ейкозаноїдний шлях, спонукав до розробки ліків, механізм дії яких, базується циклооксигеназному механізмі протизапальної дії. Підвищений рівень простагландину E2 та гіперекспресія ЦОГ-2 в товстій кишці та багатьох інших видах раку стали підставою для клінічних випробувань інгібіторів ЦОГ-2 для профілактики або лікування раку. В огляді Kolawole, O. R. зі співавт. було показано вплив НПЛЗ та селективних інгібіторів ЦОГ-2 на інші мішені, окрім ЦОГ-2, які виявилися важливими у боротьбі з багатьма видами раку. Зокрема, висвітлені спеціалізовані медіатори, що сприяють розсмоктуванню запалення (SPM), які біосинтезуються локально і, в залежності від часу, сприяють розсмоктуванню запалення і подальшому загоєнню тканин. Розглядаються різні класи SPM, підкреслюється потенціал аспірину в запуску синтезу цих медіаторів, що сприяють розсмоктуванню (резолінів, ліпоксинів, протеїнів і марезинів), які є перспективними для пригнічення росту і метастазування раку [70, 71].

Також є данні, що застосування нестероїдних протизапальних препаратів асоціюється зі зниженням ризику розвитку колоректального раку (КРР). Однак механізм, за допомогою якого НПЛЗ пригнічують колоректальний пухлиногенез,

залишається незрозумілим. Показано, що НПЛЗ вибірково вбивають пухлинні клітини, що розвиваються, через сигналізацію рецепторів смерті (DR) та активацію апоптозу, опосередковану проапоптотичним білком родини BID. У дослідженні Fletcher R. та співавт. було продемонстровано, що НПЛЗ індукують стрес ендоплазматичного ретикулуму для активації сигналізації DR та BID у пригніченні пухлин. Експериментальні результати показали залежний від стресу та BID імуногенний ефект НПЛЗ, який може мати вирішальне значення для пригнічення пухлин. Лікування НПЛЗ індукувало ознаки імуногенної клітинної смерті (ІКЗ) у клітинах КРР та епітеліальних клітинах товстої кишки, а також підвищувало рівень пухлино-інфільтруючих лімфоцитів (TILs) у поліпах мишей APCMin/+. Інгібування стресу ендоплазматичного ретикулуму або видалення BID нівелювало протипухлинні та імуногенні ефекти НПЛЗ. Крім того, підвищений стрес ендоплазматичного ретикулуму і TILs були виявлені в прогресуючих аденомах у пацієнтів, які отримували НПЛЗ. Разом ці результати свідчать про те, що НПЛЗ індукують ІКЗ, опосередковану стресом ендоплазматичного ретикулуму та TILs, для відновлення імунологічного нагляду та пригнічення утворення колоректальних пухлин [72, 73, 74].

Незважаючи на ад'ювантну хіміотерапію, від 20 до 50 % пацієнтів з колоректальним раком (КРР) II/III стадії страждають від рецидиву, як правило, у вигляді невиліковного метастатичного захворювання. Спроби підвищити ефективність ад'ювантних режимів за допомогою біологічних препаратів виявилися невдалими, тому існує нагальна потреба в нових терапевтичних підходах. Медіатори запалення, включаючи сімейство ферментів циклооксигенази, зазвичай посилено регулюються при КРР і, як відомо, сприяють росту пухлини в досліджах *in vitro*. Інгібування ЦОГ аспірином та іншими нестероїдними протизапальними препаратами може мати протипухлинний ефект. Незважаючи на клінічні дані щодо профілактики КРР аспірином, та нові дані, які демонструють, що регулярний прийом аспірину знижує частоту метастазів після резекції КРР, його застосування не набуло широкого поширення через побоювання щодо токсичності та ульцерогенності. Однак, нещодавнє виявлення

біомаркерів, які можуть прогнозувати користь аспірину, відновило інтерес до цієї проблеми. Великі рандомізовані контрольовані дослідження, що проводились/завершуються, повинні надати остаточні докази ефективності аспірину/НПЛЗ як допоміжної терапії при КРР [75].

Незважаючи на різноманітні дослідження (як клінічного, так й експериментального характеру) щодо протиракової активності НПЛЗ, існують багато епідеміологічних даних, в котрих показаний зв'язок прийому НПЛЗ з ризиком розвитку, прогресування та метастазування різних видів раку [2]. Зазвичай дослідження, які повідомляють про збільшення ризику раку при використанні НПЛЗ, базуються на епідеміологічних методах, і механізми, що лежать в основі цього підвищення ризику, менше визначені. Існують деякі звіти про взаємозв'язок між використанням НПЛЗ та підвищеним ризиком раку нирок. Дослідженнями Singer E. A. Та співавт., яке тривало 16 років для 77 525 жінок і 20 років для 49 403 чоловіків, було зафіксовано 333 випадки карциноми ниркових клітин. Виявлено дозозалежний зв'язок між тривалістю вживання НПЛЗ, крім аспірину і ризиком карциноми нирки [76]. Епідеміологічні дослідження можуть наводити на думку, але не є вирішальними, що спонукає до більш докладного вивчення механізмів впливу НПЛЗ на рак.

Також, у недавньому дослідженні, що базується на даних з Northwestern Medicine Enterprise Data Warehouse, всі пацієнти без злоякісної меланоми від 18 до 89 років були відстежені протягом 5 років після щоденного вживання аспірину протягом ≥ 1 року. Результати дослідження свідчили про загальне збільшення ризику злоякісної меланоми, при щоденному вживанні аспірину в дозозалежному режимі, особливо серед чоловіків. Однак механізми, що лежать в основі цих висновків, залишаються невизначеними. Важливо відзначити, що дослідження обмежувалося неможливістю перевірки певної інформації, такої як дотримання вживання аспірину, історія впливу сонця та фототип шкіри пацієнтів [13]. Незважаючи на суперечливі точки зору стосовно ефектів довготривалого вживання аспірину при меланомі, питання про те, чи аспірин збільшує чи зменшує ризик меланоми, залишається предметом обговорення. У недавньому

дослідженні Kumar D. та співавт. вивчали інгібіторні властивості аспірину, використовуючи лінії клітин меланоми та меланоцитів, а також модельних патологіях на тваринах. Дослідження показало, що аспірин та целекоксиб значно знизили рухомість клітин, утворення колоній та вироблення меланіну *in vitro*. Було додатково продемонстровано, що спостерігається зменшення зростання та проліферації пухлин меланоми у мишей NOD/SCID при щоденному довготривалому вживанні аспірину. Миші, яким трансплантовано пухлини меланоми із застосуванням аспірину, показали зниження рівнів PGE2 в плазмі та пухлинах, а також збільшення активності білка-кінази 5'-аденозинмонофосфат (АМРК) у пухлинах. З урахуванням суперечливих висновків різних досліджень, потрібне додаткове дослідження перед будь-якими висновками щодо ролі аспірину в меланомі [14].

Паралельними дослідженнями, показані MMP-опосередковані побічні ефекти НПЛЗ, у тому числі, пов'язані з онкогенезом. Відомо, що матриксні металопротеїнази є групою Zn^{2+} -залежних позаклітинних ферментів, які активні при нейтральному рН і відіграють ключову роль у ремоделюванні нормальних та патологічних тканин, таких як розвиток, загоєння ран, атеросклероз, пухлинна інвазія та артритні захворювання. Члени сімейства матричних металопротеїназ цинкзалежних протеїназ були запропоновані як біомаркери та терапевтичні мішені для різних видів раку. Ці протеїнази здебільшого вважалися сприяючими розвитку пухлин факторами через їх безперечну роль в одній із ознак прогресування раку — деградації позаклітинного матриксу, що корелює з інвазією ракових клітин і метастазами [77, 78].

При колоректальному раку виявлено кореляцію між поступовим підвищенням рівня MMP8 і злоякісністю пухлини [79, 80]. Väyrynen та співавт. виявлено білок MMP8 переважно в некротичних ділянках і нейтрофілах [81]. Подібно до раку шлунка рівень MMP8 був вищим у добре диференційованих пухлинах, але це не вплинуло на виживання пацієнтів. Навпаки, Laitinen та співавт. виявили, що негативне фарбування MMP8 було пов'язане зі стадією раку I, стадією пухлини T1 [82].

Колоректальний рак (КРР) є одним із найпоширеніших злоякісних новоутворень і причин смерті від раку. Дослідженнями Sirnio P. та співавт. було показано, що сироваткові рівні MMP-8 підвищуються при КРР і корелюють із віддаленими метастазами [81]. Це привело їх до гіпотези, що високі рівні MMP-8 у сироватці крові можуть бути пов'язані з несприятливим результатом для пацієнта. Тому в новому дослідженні, вони виявили підвищені рівні MMP-8 пов'язані з вищим рівнем mGPS і вищими рівнями С-реактивного білку у сироватці крові та кількох цитокінів, включаючи IL-1ra, IL-7 та IL-8 ($p < 0,001$ для всіх). Сироватковий MMP-8 негативно корелював з тучними клітинами, що інфільтрують пухлину (інвазивний край: $p = 0,005$, центр пухлини: $p = 0,010$). Пацієнти з високим рівнем MMP-8 у сироватці (>100 нг/мл) мали низьку специфічну виживаність при раку, незалежно від стадії пухлини, ступеня, лімфатичної інвазії, віку пацієнта, імуногістохімії BRAF VE1, дефіциту репарації невідповідності. Було встановлено, що високі рівні MMP8, у сироватці, пов'язані із системним запаленням і несприятливим наслідком КРР [83].

Майже всі компоненти позаклітинного матриксу (ECM) можуть бути розщеплені ендопротеїназами матричних металопротеїназ. Важливими регуляторами MMP, а отже, позаклітинного середовища, є тканинні інгібітори металопротеїназ (TIMP), особливо TIMP-1. Дослідники включили 337 пацієнтів з колоректальним раком і 47 пацієнтів контрольної групи, яким проводили хірургічне втручання в університетській лікарні Гельсінкі у Фінляндії. Серед пацієнтів, із пізньою стадією захворювання, сироваткові рівні MMP8 і TIMP-1 були підвищені. MMP8 і TIMP-1 у сироватці, розглядались як маркери негативного прогнозу з КРР. Серед пацієнтів, у яких відсутня системна запальна відповідь, MMP-8 і TIMP-1 можуть асоціюватися з прогресуванням тяжкості перебігу ККР [84].

Враховуючи здатність деяких НПЛЗ впливати на синтез та накопичення у тканинах матриксних металопротеїназ, зокрема MMP8, актуальним та перспективним є дослідження механізмів побічної дії з урахуванням їх можливого впливу на матриксні металопротеїнази.

Підсумовуючи вищевикладене та проаналізувавши літературні джерела, на нашу думку, цілком обґрунтованим, з точки зору дослідження молекулярних механізмів розвитку побічних ефектів НПЛЗ, є вивчення їх можливого впливу на систему шаперонів, зокрема, HSP70, матриксні металопротеїнази MMP8 та оцінка цих ефектів відносно ступеню пошкодження тканини ШКТ.

1.4 Вплив НПЛЗ на процеси повногеномного метилювання ДНК та її фрагментації. Toll-like receptor-опосередкована побічна дія НПЛЗ. Проблема епігенетичних взаємодій

Останнім часом, з'являються непоодинокі дослідження, які присвячені можливому епігенетичному впливу ксенобіотиків. Окремі лікарські засоби, можуть виступати, навіть, у ролі епігенетичних факторів. Епігенетика фокусується на особливостях та модифікаціях геному [85], включаючи посттрансляційні модифікації гістонів, цитозинові модифікації ДНК, розташування нуклеосом та взаємодію просторової конформації між геномними областями та доступними геномними локусами² [86]. Виявлено, що метилювання ДНК, може відігравати провідну роль у прогресуванні злоякісних пухлин [87, 88]. Було показано, що аберантне метилювання ДНК впливає на клітинні цикли генів, молекулярні регулятори клітинного сигналіngu та процеси системного запалення [89, 90]. Крім того, інші дослідження показали, що метилювання корелює з негативним прогнозом у пацієнтів із раком шлунково-кишкового тракту на ранній стадії [91].

Wang, X. та співавт. було проведено аналіз даних щодо метилювання ДНК та експресію генів, відповідних за розвиток раку товстого кишківника. Було встановлено підвищення рівнів метилювання більш ніж на 100 ділянках цих генів. Також було показано, що рівень метилювання ДНК негативно корелював з експресією антиапоптотичних генів. Нові дані щодо епігенетичних механізмів впливу на експресійну активність генів супресорів/активаторів онкогенезу допоможуть зрозуміти молекулярний патогенез раку товстої кишки. Авторами

було проведено комплексне дослідження молекулярних механізмів раку товстої кишки, які ґрунтувались на вивченні рівнів як повногеномного метилювання ДНК так й епігенетичного впливу на окремі гени [92].

Широке застосування НПЛЗ, крім позитивних терапевтичних ефектів, часто призводить до побічних ефектів з боку різних органів або систем. Останнім часом, в науковій літературі, з'являються припущення щодо можливих епігенетичних механізмів впливу НПЛЗ на організм людини. На початку минулого століття, вперше було виявлено закономірність гіперчутливості до ацетилсаліцилової кислоти, наявності поліпозу носу та бронхіальної астми у пацієнтів, яку пізніше почали називати аспіриновою тріадою (аспіриновою бронхіальною астмою). Це особливий варіант бронхіальної астми, який характеризується підвищеною чутливістю до НПЛЗ та саліцилатам природного походження, має важкий характер течії, складно контролюється введенням бронхолітичних препаратів, та часто потребує введення інгаляційних глюкокортикоїдів. Точні механізми патогенезу наразі невідомі, проте припускають, що в розвитку даного патологічного процесу приймають участь генетичні фактори та фактори навколишнього середовища. Порушення метаболізму арахідонової кислоти може викликати дисбаланс, який призводить до гіперпродукції цистеїніллейкотрієнів (CysLT), а також недостатньої продукції простагландинів E2 (PGE2), що в результаті призводить до виникнення еозинофільних інфільтратів в дихальних шляхах [93, 94, 95].

Останні дослідження в області механізмів виникнення аспіринової астми висвітлюють припущення щодо наявності епігенетичних модифікацій геному, які призводить до розвитку цього стану. Так, проводилися дослідження щодо вивчення рівня метилювання ДНК у тканинах поліпів носа у пацієнтів з аспіриновою астмою. Встановлено, що метилювання 332 CpG-сайтів у 296 генах було значно підвищене у пацієнтів з аспіриновою астмою у порівнянні з контрольною групою аспірин - толерантною астмою. Аналіз шляхів гіпометилюваних генів показав підвищення проліферації та активації імунних клітин, продукції цитокінів, імунних та запальних реакцій. Зміна цих шляхів через

диференціальну регуляцію генів може бути причиною поширення запалення дихальних шляхів, що призводить до розвитку поліпозу носа. Зокрема, були змінені патерни метилювання чотирьох генів (PGDS, ALOX5AP, PTGES і LTB4), які визначають шлях метаболізму арахідонової кислоти, який порушується при аспіриновій астмі. PGDS, ALOX5AP були гіпометильовані, тоді як PTGES був гіперметильований, що дозволяє припустити, що змінені патерни метилювання, які регулюють експресію цих генів, можуть лежати в основі підвищеної чутливості до аспірину. Крім того, два гени, що кодують цитокіни Th2, IL5RA та IL10, також були диференційовано метильовані. Ці дані свідчать про те, що відмінності в регуляції генів метаболізму арахідонової кислоти та генів імунної відповіді, що експресуються у верхніх і нижніх дихальних шляхах, можуть пояснювати фенотипічні відмінності, які спостерігаються між аспіриновою астмою та астмою толерантною до аспірину. Встановлено, що PTGES, ген, який кодує мікросомальну PGE-синтазу (mPGES-1), яка перетворює PGH2 на PGE2, був гіперметильований у тканині назального поліпа у пацієнтів з аспіриновою астмою. Крім того, фібробласти з назальних поліпів мали нижчу експресію рецепторного білка COX-2, PGE2 та EP2 порівняно з контрольною групою, толерантною до аспірину [96, 97, 98].

Hoang Kim Tu Trinh та співавт. висловлюється припущення щодо безпосереднього впливу НПЛЗ на виникнення реакцій гіперчутливості до ліків. Так, інгібування ферментів циклооксигенази НПЛЗ може порушувати метаболізм арахідонової кислоти. Клінічні фенотипи гіперчутливості до НПЛЗ різноманітні і їх можна класифікувати на перехресну реакцію або селективну відповідь. Досліджені патогенетичні механізми, в яких генетичні та епігенетичні зміни беруть участь у реалізації різних реакцій гіперчутливості, спричинених НПЛЗ. Незважаючи на певну схожість між пацієнтами, деякі генетичні поліморфізми відрізняються у тих, хто має респіраторні або шкірні симптоми. Крім того, було продемонстровано, що рівні експресії, а також статус метилювання генів, пов'язаних з імунними відповідями, беруть участь у реакціях гіперчутливості, спричинених НПЛЗ. Експресія генів модулюється кількома механізмами,

включаючи модифікацію ДНК та гістонів. На рівні ДНК, CpG модифікуються 5-метилцитозином (5mC), 5-гідроксиметицитозином (5hmC), 5-формілцитозином (5fC) та 5-карбоксилцитозином (5caC). 5hmC може сприяти транскрипції генів, 5mC, 5fC та 5caC, що зменшує транскрипцію генів, пригнічуючи зв'язування транскрипційного фактору та сприяє конденсації хроматину. Різний рівень експресії генів, пов'язаних з імунною відповіддю та/або порушенням регуляції активності цистеїнових ділянок, свідчить про залучення епігенетичних механізмів у патофізіологію гіперчутливості до НПЛЗ [99, 100, 101].

Використання нестероїдних протизапальних препаратів пов'язане зі зниженням/підвищенням ризику деяких видів раку. НПЛЗ здатні змінювати епігенетичний профіль нормального епітелію товстої кишки і можуть, в залежності від мікрооточення, підвищувати або знижувати ризик раку товстої кишки цим шляхом; проте вплив застосування нестероїдних протизапальних засобів на профіль метилювання ДНК інших тканин, включаючи цільну кров, є суперечливим. Використовуючи когорту Sister Study, дослідники вивчили зв'язок між використанням нестероїдних протизапальних засобів і закономірностями метилювання всього геному в ДНК крові. Статус метилювання ДНК крові на 27 589 сайтах CpG оцінювався у 871 жінок з використанням бісерного чіпа Illumina Infinium HumanMethylation27, а також у реплікаційній вибірці з 187 жінок на 485 512 сайтах CpG з використанням бісерного чіпа Infini. Була ідентифікована низка сайтів CpG, які були диференційно метильовані у постійних, тривалих користувачів НПЛЗ [102].

Дослідженнями Marra P.S. та співавт. Було показано здатність НПЛЗ чинити епігенетичний вплив на окремі гени, відповідні за розвиток деменції у осіб похилого віку. В цьому дослідженні продемонстровано потенційну користь НПЛЗ у зниженні ризику делірію та смертності. Авторами був проведений диференційний аналіз профілів метильованих генів, відповідних за розвиток деменції та повногеномний епігенетичний профіль. Було продемонстровано сайти диференціально метильованих генів та біологічних шляхів, які пов'язані з впливом НПЛЗ на профіль метилювання ДНК по всьому геному у пацієнтів, які

приймали і не приймали НПЛЗ в анамнезі. Результати свідчать про потенційну роль епігенетики в механізмах дії НПЛЗ. У цьому контексті, важливим є розуміння, що можливість епігенетичного впливу НПЛЗ не завжди обумовлює розвиток небажаних побічних ефектів, але може бути окремою ланкою розвитку певних терапевтичних та біологічних ефектів [103].

Разом з цим, існують повідомлення, що показують епігенетичну роль НПЛЗ у ініціації онкогенезу раку шлунково-кишкового тракту. Гіперметилування CpG-острівців (СІНМ) генів-супресорів пухлини є важливим ланцюгом канцерогенезу. Було досліджено статус СІНМ неракової слизової оболонки шлунку у пацієнтів на тлі тривалого використання НПЛЗ та у тих, хто не приймає їх. Також було оцінено прямий вплив НПЛЗ на рівень гіперметилування СІНМ. Зразки слизової оболонки шлунка були отримані від 51 пацієнта з хронічним застосуванням НПЛЗ та 180 осіб, які не приймали НПЛЗ. Високий рівень СІНМ визначався, як метилування двох або більше острівців CpG. Багатомірний логістичний регресійний аналіз з поправкою на стать, вік, інфекцію *Helicobacter pylori* та застосування НПЛЗ показав, що вживання НПЛЗ корелювало з усіма чотирма СІНМ та їх високим рівнем. Крім того, довготривале застосування нестероїдних протизапальних засобів пригнічувало СІНМ у слизовій оболонці шлунка людини, що може розглядатись у контексті епігенетичних механізмів їх побічних ефектів та обумовлює необхідність подальших досліджень у цьому напрямку [104].

Разом з цим, епігенетична взаємодія НПЛЗ може бути реалізована, як на гени-супресори онкогенезу, так й промоторів, що у подальшому, може бути ключовою подією у про- або проти-ракових ефектів НПЛЗ. В зв'язку з цим, на нашу думку, яка збігається з думкою низки дослідників, оцінку характеру епігенетичної дії НПЛЗ доцільно вивчати лише у контексті комплексного дослідження їх впливу на інші метаболічні шляхи, медіатори, клітинне мікрооточення, імунний статус, стан антиоксидантної системи.

Низкою дослідників приділено увагу, експресії ТL-рецепторів, тим паче є переконливі дані, щодо впливу НПЛЗ на ці рецептори. Сімейство Toll-like receptors (TLR) є відповідальними за розпізнавання шаблонів у вродженому

імунітеті, що робить їх основними білками, залученими до виявлення патогенів і викликання імунних відповідей. Найбільш вивчений представник цієї родини, TLR4, був у центрі уваги щодо його внеску в розвиток багатьох запальних та неопластичних захворювань. Примітно, що зростає кількість доказів, які доводять, що цей рецептор аберантно експресується на пухлинних клітинах і мікрооточенні пухлини в широкому діапазоні типів раку, і він пов'язаний з ініціацією онкогенезу, а також прогресуванням пухлини та стійкістю до ліків. Терапія раку з використанням інгібіторів TLR4 нещодавно привернула увагу вчених і багатообіцяючі результати таких досліджень можуть прокласти шлях для додаткових досліджень у найближчому майбутньому [105].

Низкою досліджень Watanabe T. та співавт. було показано, що Toll-подібний рецептор 4 (TLR4) розпізнає ліпополісахарид (LPS), що призводить до активації запального каскаду через допоміжний білок MyD88. Індометацин вводили перорально щурам і мишам, задля ініціації пошкодження тонкого кишківника. Ступінь ушкодження оцінювали шляхом вимірювання ушкодженої області, забарвленої у темно-синій колір синім Евансом. Щурам перорально вводили антибіотики (ампіцилін або ванкоміцин) або внутрішньочеревинно ЛПС (ліганд TLR4) або нейтралізуючі антитіла проти нейтрофілів, фактору некрозу пухлини (TNF)-альфа або моноцитарного хемотаксичного білка (MCP). Крім того, кишкову ульцерогенність індометацину досліджували на мишах з мутацією TLR4, TLR4(-/-) та MyD88(-/-). В результаті, було показано, що індометацин викликав ушкодження тонкого кишківника зі збільшенням експресії TNF-альфа та MCP-1, як у щурів, так і у мишей. Антитіла проти нейтрофілів, TNF-альфа та MCP-1 пригнічували пошкодження на 83%, 67% та 63%. Ампіцилін та азтреонам також інгібували це пошкодження та зменшували кількість грамнегативних бактерій у вмісті тонкого кишківника щурів. Введення LPS, через 1 годину після індометацину, посилювало пошкодження, тоді як попередня обробка LPS пригнічувала його зі зниженням експресії TLR4 та цитокінів. У мишей з мутацією TLR4 пошкодження та експресія цитокінів були помітно інгібовані. Миші TLR4(-/-) та MyD88(-/-) також були стійкі до пошкодження. Таким чином, було

встановлено, що індометацин може пошкоджувати тонку кишку за допомогою TLR4/MyD88 залежного шляху [106].

Дослідженнями Nadatani Y. та співавт. було проведено вивчення вивільнення амфотерину (HMGB1) з пошкоджених клітин, який бере участь у багатьох типах тканинних пошкоджень, активує запальні шляхи шляхом стимуляції безлічі рецепторів, включаючи Toll-подібний рецептор 2 (TLR2), TLR. Зокрема, дослідниками було визначено роль HMGB1 у пошкодженні тонкого кишківника, спричиненому дією НПЛЗ. Пероральне введення індометацину (10 мг/кг) викликало пошкодження тонкого кишківника та було пов'язано зі збільшенням експресії HMGB1 у тканинах кишківника та рівнів HMGB1 у сироватці крові. У мишей, рекомбінантний людський HMGB1 посилював ушкодження тонкого кишківника, спричинене індометацином; підвищувало рівень експресії мРНК фактора некрозу пухлини (TNF- α), стимулювало фосфорилування мітоген-активованих протеїнкіназ p38, кінази регульованої позаклітинними сигналами (ERK), та N-кінцевої кіназової c-Jun (JNK). Разом з цим, блокування дії HMGB1, за допомогою нейтралізуючих антитіл, запобігало пошкодженню тканин та інгібувало, як надекспресію запальних цитокінів, так і активацію цих внутрішньоклітинних сигнальних шляхів. Миші з типом TLR2 (KO) і RAGE-KO демонстрували високу чутливість до пошкоджень, викликаних індометацином, подібно до мишей дикого типу, тоді як миші TLR4-KO демонстрували менш виражене пошкодження кишківника і нижчі рівні експресії мРНК TNF- α . Екзогенний HMGB1 посилював пошкодження кишківника у мишей TLR2 та RAGE-KO, але не впливав на пошкодження у мишей TLR4-KO. Таким чином, результати демонстрували, що HMGB1 сприяє НПЛЗ-індукованому пошкодженню тонкої кишки через TLR4-залежні сигнальні шляхи [107].

Відомо, що поширеним побічним ефектом лікування ревматоїдного артриту (РА) нестероїдними протизапальними препаратами є гастропатія, яка пов'язана з імунними реакціями кишківника на антиендотоксин (ЕТ) та поліморфізмом Toll-подібного рецептора 4. Biloglasov V. та співавт. було проведено клінічне дослідження, у котрому, під спостереженням знаходилися 75 хворих на РА у віці

від 19 до 68 років з порушенням функції суглобів другого ступеня, які були поділені на дві клінічні групи: 1-а група - хворі на РА без НПЛЗ-гастропатії та 2-га група - хворі на РА з НПЛЗ-гастропатією. Контрольну групу становили 19 здорових донорів. У хворих на РА з НПЛЗ-гастропатією був встановлений гетерозиготний варіант гену Asp299Gly TLR4, пов'язаний із зміненими відповідями на ЕТ, а також sIgA, анти-ЕТ-sIgA в 2 рази менше, ніж у контрольній групі ($p < 0,01$).) і нижче, ніж у хворих на РА без НПЛЗ-гастропатії. Концентрації анти-ЕТ-IgG у групі пацієнтів з гастропатією РА були в 1,8 рази вищими, ніж у пацієнтів з РА без гастропатії ($p < 0,01$), тоді як рівні анти-ЕТ-IgM у будь-якій групі пацієнтів з РА не відрізнялися від контрольної групи. Пацієнти з РА та НПЛЗ-гастропатією мали поліморфізм у генах TLR 4, який індукував змінену відповідь на ендотоксин та дефіцит sIgA анти-ЕТ-антитіл, що, можливо, призводило до дисфункції як слизової оболонки, так і системного антиендотоксинового імунітету [108].

Дослідженнями Steckling F. M. Та співавт. було продемонстровано вплив диклофенаку на експресію TLR4, запальний статус та маркери окислювального стресу в печінці. Встановлено, що протизапальна модуляція, викликана лікуванням диклофенаком, була пов'язана із збільшенням часу до втоми під час тренувань. Разом з цим, виснажливі вправи та призначення диклофенаку збільшували утворення продуктів пероксидації ліпідів, та призводили до дизбалансу співвідношення GSH/GSSG [109].

Здатність НПЛЗ впливати на експресію TL-рецепторів, має право, на нашу думку, розглядатись як один з можливих механізмів побічних ефектів НПЛЗ. Активація TLR призводить до індукції протизапальних цитокінів і хемокінів, що сприяє активації інативного та адаптивного імунітету. Крім того, зростає кількість досліджень, які показують зв'язок між епігенетичними змінами генів, експресією TLR та раком. Зокрема, шлях сигналізації рецептора типу Toll 4 (TLR4) пов'язаний з запальною відповіддю та прогресією раку [110].

Крім того, враховуючи дані, щодо можливої індукції онкогенезу НПЛЗ у розрізі їх епігенетичної дії, на нашу думку, можливі епігенетичні ефекти НПЛЗ

(рівень метилювання, фрагментації ДНК) необхідно розглядати у комплексі з певними сигнальними шляхами, зокрема Wnt і Hedgehog. Патологічну роль шляхів Wnt і Hedgehog виявили дослідження, які показали високу частоту специфічних ракових захворювань людини, пов'язаних з мутаціями, які конститутивно активують транскрипційну відповідь цих шляхів.

Обґрунтування можливого негативного впливу НПЛЗ крізь призму сигнальних шляхів Wnt і Hedgehog та епігенетичних взаємодій, може включати наступні аспекти [111]:

1. Суперечливість впливу: НПЛЗ, хоч і мають протизапальний потенціал, також можуть викликати суперечливі ефекти, особливо при тривалому вживанні або високих дозах. Вони можуть активувати запальні відгуки, які, в свою чергу, можуть сприяти карциногенезу через зміни в тканинному середовищі.

2. Можливість дисбалансу в сигнальних шляхах, а саме негативний вплив на Wnt і Hedgehog - сигналінг. Тривале призначення НПЛЗ може викликати дисбаланс в сигнальних шляхах Wnt і Hedgehog, що призводить до неконтрольованого росту клітин і, як наслідок, до розвитку пухлин.

3. Можливе сприяння онкогенезу через імуномодуляцію. Зниження імунного контролю: НПЛЗ можуть мати імуномодулюючий вплив, що визначається не тільки їхнім протизапальним ефектом, але й здатністю змінювати імунний відгук, зокрема опосередковано через TL4. Це може призвести до втрати контролю імунною системою над раковими клітинами.

4. Можливість створення сприятливого середовища для ракового росту. Зміни в мікросередовищі пухлини. Вживання НПЛЗ може призвести до змін у мікросередовищі пухлини, що сприяє її розвитку, наприклад, через вплив на ангиогенез, апоптоз та взаємодію клітин.

5. Ризик для певних типів раку та варіації в залежності від типу раку: Негативний вплив НПЛЗ може бути варіабельним залежно від типу раку та індивідуальних особливостей організму.

Резюме. Таким чином, підсумовуючи аналіз літературних джерел щодо

дослідження молекулярно-генетичних механізмів розвитку небажаних побічних реакцій НПЛЗ, можливо зробити висновок, щодо пріоритетності наступних напрямків досліджень, а саме, вивчення можливого впливу НПЛЗ на стан антиоксидантно-прооксидантної, тіол-дисульфідної систем, системи клітинних шаперонів (HSP70) у комплексі з маркерами пошкодження тканин (ММР8, фекальний кальпротектин), а також на епігенетичні зміни ДНК (метилування, фрагментація) та молекулярні регулятори Wnt і Hedgehog-сигналіngu.

Враховуючи, що на сьогодні, в клінічній практиці, в якості НПЛЗ, широко застосовуються препарати різного механізму дії, для оцінки їх епігенетичного впливу на ШКТ доцільно використати лікарські засоби з селективною та неселективною дією на ЦОГ, наприклад, такі, як: диклофенак, індометацин, ацетилсаліцилова кислота, мелоксикам.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено на базі кафедри клінічної лабораторної діагностики, клініко-діагностичної лабораторії Навчально-наукового медичного центру "Університетська клініка Запорізького державного медико-фармацевтичного університету" (свідоцтво про технічну компетентність № 015210 від 20.04.2021, чинне до 18.04.2024), Навчального медико-лабораторного центру ЗДМФУ МОЗ України (свідоцтво про технічну компетентність № 033/18 від 26.12.2018, чинне до 25.12.2023).

Для встановлення молекулярних механізмів епігенетичного впливу НПЛЗ, при їх тривалому застосуванні, було проведено комплексне дослідження, що включало токсикологічні, імуноферментні, біохімічні, молекулярні, фармакологічні методи, а також статистичний аналіз отриманих результатів.

Враховуючи те, що на сьогодні, клінічне застосування мають, як селективні так і неселективні інгібітори ЦОГ, нами, для дослідження, був обраний наступний перелік НПЛЗ: диклофенак, індометацин, ацетилсаліцилова кислота, мелоксикам.

2.1 Матеріали дослідження

Використані в експерименті тварини були отримані з розплідника ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ». Всі дослідження були проведені в осінньо-зимовий період у віварії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету. Тварини знаходилися в приміщенні при температурі повітря +20-25 °С із вільним доступом до їжі та води.

Експериментальну частину дослідження виконували в суворій відповідності з національними «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах» (Україна, 2012), узгодженими з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових задач» (Страсбург, 1985), «Положенням про використання тварин в біомедичних дослідженнях» та з директивою Ради

2010 / 63EU Європейського парламенту і Ради від 22 вересня 2010 року по захисту тварин, які використовуються для наукових цілей [112, 113].

Робота з тваринами проводилась згідно з міжнародних вимог про гуманне ставлення до тварин та з дотриманням вимог директиви 86/609/ЕЕС з питань захисту тварин, а також відповідно рекомендаціям «Посібника з лабораторних тварин та альтернативних моделей у біомедичних технологіях» та «Guide for the care and use of laboratory animals». Тварин утримували на стандартному раціоні при природній зміні дня і ночі. Усі маніпуляції, які можуть завдавати болю, у тому числі евтаназію, проводили під тіопентал-натрієвим наркозом (40 мг/кг внутрішньочеревинно) [114, 115, 116].

Протокол дослідження погоджено з локальним етичним комітетом - Комітетом з біоетики ЗДМФУ (№9 від 09.11.2023р) та встановлено, що проведені експериментальні дослідження не суперечать сучасним вимогам біоетики, морально-етичним нормам та міжнародним положень стосовно проведення експериментальних досліджень.

Усі прилади, які використовувались для дослідження, сертифіковані та проходять щорічну метрологічну експертизу (протокол № 361 від 14.11.2023р.).

Об'єктом дослідження, в експериментальних щурів, була плазма крові, гомогенат тканин кишківника, кал.

2.1.1 Дизайн дослідження

Дослідження проведені на 75 білих нелінійних щурах – самцях масою 200-400 грамів, віком 6-10 місяців. Піддослідні тварини були розподілені на 5 експериментальних груп, що утримувались на стандартному харчовому раціоні ПП «Біомодель сервіс» з вільним доступом до їжі та води. Тварин утримували на стандартному раціоні при природній зміні дня і ночі. Робота з тваринами проводилась згідно з міжнародних вимог про гуманне ставлення до тварин. Дизайн дослідження схематично представлено на рис. 2.1.

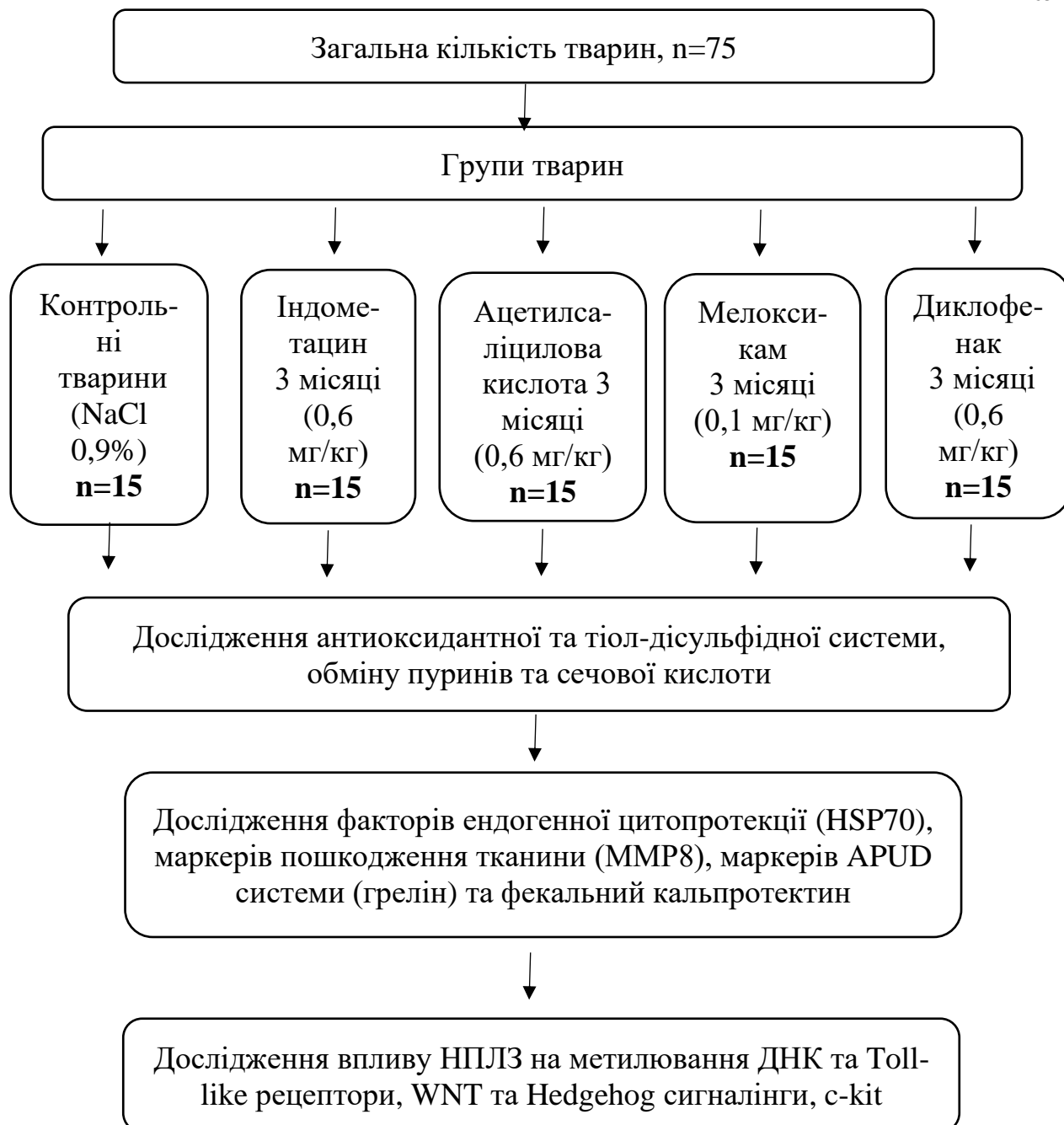


Рисунок 2.1 – Схема дизайну дослідження, та розподіл тварин за групами.

Для дослідження було взято 75 щурів, поділених на 5 груп:

- Перша група - це контрольні тварини, котрим щоденно вводилось упродовж 3 місяців розчин натрію хлориду 0,9%.
- Друга група - це лабораторні щури, котрим щоденно вводився індометацин 3 місяці (АТ «Софарма», Болгарія) у дозі 0,6 мг/кг.
- Третя група - це лабораторні щури, котрим щоденно вводили ацетилсаліцилову кислоту 3 місяці (ПрАТ «Дарниця», Україна) у дозі 0,6 мг/кг.

- Четверта група - це лабораторні щури, котрим щоденно вводили мелоксикам 3 місяці («Фармекс Груп», Україна) у дозі 0,1 мг/кг.

- П'ята група - це лабораторні щури, котрим щоденно вводився диклофенак 3 місяці (ПрАТ «Дарниця», Україна) у дозі 0,6 мг/кг.

2.2 Методи дослідження

2.2.1. Підготовка біологічних зразків для досліджень

Для досліджень були використані наступний біологічний матеріал: гомогенат тканин кишківника, плазма крові, кал.

Гомогенат тканин кишківника

Тканини кишківника гомогенізувалися на холоді, в сольовому ізотонічному середовищі (0,15 М KCl) при температурі +4°C, у співвідношенні тканина-сольовий розчин 1:40 та гомогенізували за допомогою гомогенізатора SilentCrusher S (Heidolph, Німеччина). Безбілковий екстракт одержували шляхом додавання хлорної кислоти (0,6М) в гомогенат тканини кишківника з подальшою нейтралізацією 5,0 М калію карбонатом та центрифугуванням при 3000 об/хв [115, 116, 117].

Плазма крові

Цільну кров збирали у вакуумну пробірку з ЕДТА, ретельно та обережно перемішували, перевертаючи 6-8 разів та центрифугували при 3000 об/хв [115, 116, 117].

Кал

Достатню кількість калу (1-2 мл або 1-2 г) збирали в чистий, сухий контейнер для збору зразків. В пробірку з екстракційним буфером додавали попередньо відібрані з трьох довільних місць зразку калу за допомогою піпетки з дозатором близько 50 мг калу (що еквівалентно ¼ горошини) [115, 116, 117].

Всі біологічні зразки до проведення відповідних досліджень зберігались у морозильній камері при температурі -86°C.

2.2.2 Дослідження антиоксидантної та тіол-дисульфідної системи, обміну пуринів та сечової кислоти

З метою встановлення окремих молекулярних механізмів розвитку епігенетичного впливу НПЛЗ була проведена оцінка тяжкості пошкодження тканин ШКТ, при тривалому введенні НПЛЗ, проведено дослідження стан тіол-дисульфідної та антиоксидантної систем, обміну пуринів та сечової кислоти.

Стан антиоксидантної системи, співвідношення основних інтермедіатів тіол-дисульфідної системи мають суттєвий вплив на ступінь та вираженість пошкоджень ШКТ, а також згідно низки літературних джерел є основними чинниками розвитку та реалізації епігенетичних змін генів. Дизрегуляція вищезазначених систем відіграє важливу роль у розвитку каскаду патобіохімічних реакцій, направлених на порушення функціональної активності макромолекул, експресивної активності генів клітинного циклу та апоптозу. Стан тіол-дисульфідної системи був оцінений через вимір рівня активності ключових ферментів ТДС, таких як глутатіонредуктаза (ГР), глутатіонпероксидаза (ГПР). Додатково, оцінювалась концентрація окисленого та відновленого глутатіону [117].

Дослідження інтермедіатів ТДС проводили імуноферментним методом. Цей метод базується на використанні «сендвіч»-варіанту твердофазного аналізу із застосуванням імуноферментного комплексу ImmunoChem-2100 (США). Аналіз проводили в 96-лункових мікропланшетах, дно яких було вкрите моноклональними антитілами до відповідного молекулярного маркера. Зразки біоматеріалу вносили до відповідних лунок мікропланшетів та інкубували протягом необхідного часу. Після етапів промивання, реагенти видаляли з лунок мікропланшетів, а також вносили додаткові реагенти, які згодом вимивалися. Аналіз проводили з додаванням колориметричного реагенту, результуючий сигнал вимірювали за 450 нм. Всі імуноферментні дослідження проводили відповідно протоколів дослідження, розробленими виробниками відповідних тест-систем.

Досліджувались наступні маркери:

Визначення активності глутатіонредуктази здійснено імуноферментним методом, допомогою Rat ELISA Kit for Glutathione Reductase (GR) (Elabscience, USA), Cat. № SEB314Ra, концентрацію виражали в ум.од./мг/білку/хв у гомогенаті тканин кишківнику щурів [117, 118, 119].

Активність ферменту глутатіонпероксидази вимірювали за допомогою імуноферментного набору Glutathione Peroxidase (GSH-Px) Activity Assay Kit, Cat. № E-BC-K096-M і виражали в ум.од./мг/білку/хв у гомогенаті тканин кишківнику щурів.

Окислену та відновлену форми глутатіону виражали у мікромольх на грам тканини. Дослідження відновленої форми глутатіону проводили за допомогою імуноферментного методу Reduced Glutathione (GSH) Colorimetric Assay Kit (Elabscience, USA) Cat. № E-EL-0026 у гомогенаті тканин кишківнику щурів. Результат виражали у мкмоль/гр/тканини.

Окислений глутатіон становить один відсоток загальної концентрації клітинного глутатіону (GSH). Дослідження окисленої форми глутатіону проводили за допомогою імуноферментного методу Oxidized Glutathione (GSSG) Colorimetric Assay Kit (Elabscience, USA) Cat. № E-BC-K097-M. Результат виражали у мкмоль/гр/тканини.

Також, для оцінки важкості ушкодження шлунково-кишкового тракту та вивчення механізмів небажаних побічних реакцій НПЛЗ, досліджували маркери оксидантного та нітрозуючого стресу. Стан системи антиоксидантів оцінювався за концентрацією маркерних продуктів окисного пошкодження білків у гомогенаті кишківника, нітротирозину, окисної модифікації нуклеїнових кислот - 8-гідрокси-2-дезоксигуанозину (8-OHdG) та рівнем активності індукцибельної NO синтази (iNOS) [117, 118, 119]. Дослідження були проведені у гомогенаті тканин кишківника щурів відповідних експериментальних груп.

Вищезазначені показники були визначені із допомогою імуноферментного методу.

Концентрацію нітротирозину у гомогенаті кишківника визначали за допомогою імуноферментного методу, із використанням набору, ELISA Kit (Cat.

№ НК 501-02) фірми Hycult Biotech і виражали в nmol/l в плазмі [118].

iNOS визначали із використанням тест системи для детекції Nitric Oxide Synthase 2, Inducible Catalogue No.: E-EL-H0753, згідно з доданою до набору інструкцією і виражали в нг/мл. ELISA - метод для визначення iNOS є інформативним та високочутливим інструментом для кількісної оцінки рівня цього ферменту, що може бути корисним для розуміння його ролі в різних патологічних станах та дослідження його функціональних аспектів.

Дослідження 8-гідрокси-2-дезоксигуанозин проводили із використанням набору: Rat 8-OHdG (8-Hydroxydeoxyguanosine, ELISA Kit) Catalogue No.: ER1487-HS. Результати виражали в пг/мл.

Також нами були проведені біохімічні дослідження основних показників обміну пуринів. Дослідження обміну пуринів може відбуватися за допомогою різних методів та аналітичних підходів.

В нашому дослідженні ми вимірювали рівень сечової кислоти, за допомогою автоматичного біохімічного аналізатору Accent 200 із застосуванням відповідного набору визначення сечової кислоти Accent і виражали в умоль/л в гомогенаті кишківника дослідних тварин.

У контексті обміну пуринів у тканинах кишківника, також було необхідно визначити активності ключових ферментів, які відповідають за розкладання пуринових нуклеотидів. Нами було визначено аденозиндезаміназа (АДА) та ксантиноксидаза (КО) [121].

Визначення ферментативної активності аденозиндезамінази проводили на спектрофотометром Libra S32PC (Biochrom ltd., Англія) 3-01, при довжині хвилі 265 нм. Різниця у поглинанні світла між початковим та кінцевим значеннями дозволяє визначити конверсію субстрату та, відповідно, активність АДА в зразку [121].

Ксантиноксидаза - це фермент, який бере участь у метаболізмі пуринів та каталізує конвертацію гіпоксантину в ксантин, а потім в кислоту уринову. Також вона може перетворювати ксантин у сечовину. Вимірювання ферменту проводилось за допомогою спектрофотометра Libra S32PC (Biochrom ltd., Англія)

3-01, при поглинанні світла відповідної довжини хвилі (зазвичай приблизно 290-295 нм) до початку реакції та після визначеного часу. Цей метод вимірювання активності ксантиноксидази може бути використаний для оцінки функції цього ферменту в біологічних зразках і вивчення різних аспектів метаболізму пуринів в організмі [122].

2.2.3 Дослідження факторів ендогенної цитопротекції (HSP70), маркерів пошкодження тканини (MMP8), маркерів APUD системи (грелін) та фекального кальпротектину

Розвиток оксидативного стресу спричиняє активацію системи молекулярних шаперонів, у тому числі, білків теплового шоку, які відіграють важливу роль у пристосуванні клітин до пошкодження та збереженні функціональної активності ферментативних систем, а також регуляції клітинного циклу. Проте різні дослідження показують, що експресія та активність білків HSP70 можуть виявляти нерівномірну динаміку в різних структурних одиницях, що є об'єктом особливого інтересу [122].

Також необхідним у комплексному дослідженні молекулярно-генетичних механізмів розвитку побічних ефектів НПЛЗ є визначення маркерів пошкодження тканин, зокрема, кишківника (MMP8, фекальний кальпротектин) [81], а також з огляду на наявність ульцерогенної дії НПЛЗ - маркеру APUD-системи (грелін) [117, 118].

У нашому дослідженні, для отримання плазми, цільну кров центрифугували та зберігали за температури -86 °С. У дослідних зразках визначали кількість HSP70 rats (Biomedica) – (Nucult Biotech, Нідерланди). Досліджування проводилось імуноферментним методом, із використанням тест-системи: Rat Heat Shock Protein 70, HSP70 ELISA Kit, Catalogue No.: E0522Ra і виражали в ng/ml в плазмі крові дослідних тварин.

За вище описаною методикою визначали концентрацію MMP8, яку досліджували за допомогою набору ELISA Kit for Matrix Metalloproteinase 8 (MMP8), ELISA Kit Catalogue No.: SEA103Mu. Результат виражали в ng/ml в плазмі крові дослідних тварин.

APUD система клітин грає важливу роль у функціонуванні шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Деякі хвороби ШКТ пов'язані з різними аспектами цієї системи. Щодо маркерів APUD системи, які відіграють важливу роль у патогенезі та діагностиці захворювань ШКТ запального генезу, нині основними маркерами пошкодження кишківника є фекальний кальпротектин, який за даними низки літературних джерел доцільно вивчати з греліном, який відображає дизрегуляцію метаболічних шляхів тканин ШКТ та може бути використаний як один з маркерів оцінки ульцерогенної дії НПЛЗ.

Грелін відіграє важливу роль у регуляції біохімічних процесів, пов'язаних із травленням, в основному шляхом впливу на синтез різних ферментів. Грелін регулює рівень адреналіну (гормон стресу) у крові. Коли людина голодує, рівень греліну підвищується, і він, імовірно, відіграє роль антидепресанту [124]. Вміст греліну визначали імуноферментним методом із застосуванням набору Rat/Mouse Ghrelin (active) ELISA, Merck, EZRGRA-90K і виражали в pg/ml в плазмі крові дослідних тварин. Цей метод полягає в застосуванні антитіл, які специфічно взаємодіють з греліном.

Вміст фекального кальпротектину в калі визначали за допомогою набору BÜHLMANN fCAL ELISA, Calprotectin. Концентрацію виражали у $\mu\text{g/g}$. Дослідження були проведені у калі (ФК) щурів відповідних експериментальних груп. На сьогодні фекальний кальпротектин (Faecal Calprotectin) є високоспецифічним та інформативним біомаркером для оцінки ступеня запалення кишківника [125].

Оцінку ступеня пошкодження кишківника проводили за інтегральною шкалою меж концентрацій фекального кальпротектину у калі згідно рекомендаціям National Institutes of Health:

- $\geq 160 \mu\text{g/g}$ - значне, виражене запалення кишківника;

- 80-160 $\mu\text{g/g}$ - легке запалення кишківника;
- До 79 $\mu\text{g/g}$ - діапазон нормальних значень.

2.2.4 Дослідження впливу НПЛЗ на метилювання ДНК та Toll-like рецептори, концентрацію молекулярних регуляторів WNT, hedgehog сигналінги, білку гену c-kit

Рівень фрагментації та метилювання ДНК встановлювали із використанням молекулярно-генетичних методів. Ступінь фрагментації ДНК виражали у відсотках. Рівень метилювання ДНК виражали у відсотках MspI та HpaII у ядрах клітин крові [126].

Лімфоцити з периферичної крові отримували за стандартною методикою із використання градієнтів щільності та послідовного центрифугування.

ELISA -методом досліджували у плазмі крові експресію TLR4 рецепторів (Rat Toll-like Receptor 4, TLR4 ELISA Kit, Cat.No E0080Ra). Результати виражали у ng/ml.

WNT сигналінг (Wnt сигнальний шлях) - це важливий біологічний шлях, який відіграє ключову роль в розвитку органів, регенерації тканин, регуляції клітинного росту та інших фізіологічних процесах в організмі. Цей сигнальний шлях отримав свою назву від глікопротеїну Wnt (у людини і мишей) та позначає сімейство лігандів, які активують його. WNT сигналінг є одним із ключових механізмів в регуляції клітинного розвитку і диференціації. WNT сигналінг може бути активований або реагувати на різні зовнішні та внутрішні сигнали і він важливий для багатьох аспектів розвитку та функціонування організму. Порушення експресивної активності молекулярних регуляторів цього сигнального шляху можуть призвести до різних патологічних станів, включаючи онкогенез [127].

Для дослідження цього сигнального шляху нами було використано імуноферментний метод визначення основного білку та молекулярного

регулятору WNT-сигналіngu SMO -білок із використанням набору Smoothened, ELISA SEC891Ra. Результати виражали в pg/ml в плазмі крові дослідних щурів.

Сигнальний шлях Hedgehog - це інший важливий біологічний шлях, який визначає різноманітні клітинні процеси та розвиток в організмі. Цей шлях отримав свою назву від ліганду Hedgehog, який активує його. Сигнальний шлях Hedgehog грає важливу роль у регуляції процесів росту, розвитку та регенерації тканин [128].

Для дослідження цього сигнального шляху нами було використано визначення основного білку та молекулярного регулятора Hedgehog - сигналіngu - Shh-білок. Визначення цього білку проводили методом імуноферментного аналізу із використанням набору Sonic hedgehog protein, ELISA, RTEB1226. Отримані результати виражали в pg/ml в плазмі крові дослідних щурів.

Відповідний білок гену c-kit - Rat c-Kit, також досліджувався імуноферментним методом у плазмі крові щурів відповідних експериментальних груп із використанням набору ELISA Kit - LS-F49274. Результати виражали в pg/ml.

2.2.5 Дослідження токсичної та ульцерогенної дії НПЛЗ

Для встановлення ульцерогенної дії НПЛЗ макроскопічно оцінювали ступінь пошкодження шлунку та кишківника.

Всі досліджувані НПЛЗ вводили внутрішньочеревинно. Об'єм введення препаратів для щурів не перевищував 2 мл. Тварини контрольних груп одержували розчинник (NaCl 0,9%) в еквівалентному обсязі. Враховуючи низьку розчинність ацетилсаліцилової кислоти у фізіологічному розчині, ми диспергували таблетку до отримання суспензії і відразу вводили отриманий розчин щурам внутрішньочеревинно, до попередження седиментації. Інші препарати були у вигляді готових ін'єкційних розчинів.

Виявлення смертності, тяжкого стану, загального стану здоров'я та ознак токсичності проводилося один раз на день, у всіх групах протягом усього періоду

спостереження. Клінічний огляд проводився щотижня, візуально, в усіх групах протягом періоду спостереження. Масу тіла реєстрували у всіх групах перед першим введенням, щотижня протягом усього періоду спостереження. Масу тіла виражали в г.

Досліджувався можливий токсичний вплив НПЛЗ за їх впливом на клітинний склад периферичної крові, а також загальнобіохімічні показники.

Для визначення гематологічних показників, використовували цільну кров в загальному обсязі 1.0 мл. Аналіз проводили на гематологічному автоматичному аналізаторі Abacus 5 (Diatron MI Zrt, Угорщина). Визначали наступні показники: кількість лейкоцитів, $\cdot 10^9/\text{л}$, кількість еритроцитів, $\cdot 10^{12}/\text{л}$, кількість тромбоцитів $\cdot 10^9/\text{л}$, еозинофіли (%).

Також були визначені загально-біохімічні показники: загальний білок, г/л; глюкоза Ммоль/л; АлАт, Од/л; АсАт, Од/л - за допомогою біохімічного автоматичного аналізатора Accent 200 (Cormay, Польща) із використанням тест систем цього виробника для визначення відповідних показників.

Ульцерогенну дію НПЛЗ оцінювали в балах: 0 балів – відсутність пошкодження; 1 бал – від 1 до 3 невеликих виразок; 2 бали – більше 3 невеликих виразок; 3 бали – виразка значних розмірів і декілька невеликих виразок; 4 бали – декілька великих виразок; 5 балів – перфоративна виразка. Крім того, симптоми, які передують виникненню деструкцій у ШКТ та свідчать про певні трофічні порушення в його слизовій оболонці (набряк, гіперемія, крововилив), які оцінювали в 0,5 балів.

2.2.6 Методи статистичного аналізу

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програми «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5) та «EXCEL-7,0» (Microsoft Corp., США). Для кожної досліджуваної величини визначали показники середнього арифметичного (M) і стандартної помилки репрезентативності середнього арифметичного (m). Нормальність розподілу

оцінювали за критеріями Kolmogorov-Smirnov (D) і Lilliefors, Shapiro-Wilk (W). Результати досліджень аналізували методом параметричної кореляції з визначенням лінійного коефіцієнта кореляції Пірсона (r). При значенні $r \leq 0,25$ кореляційний зв'язок вважали слабким, якщо ж $0,25 < r < 0,75$ – помірним. При значенні $r \geq 0,75$ такий взаємозв'язок розцінювали як сильний. Додатне значення коефіцієнта свідчить про пряму залежність між величинами (прямий, позитивний зв'язок), коли збільшення значення однієї ознаки збільшує значення іншої. Від'ємне значення коефіцієнта вказує на обернений (зворотний, негативний) зв'язок між досліджуваними показниками, коли зростання однієї ознаки призводить до зменшення іншої. Значимість коефіцієнта кореляції оцінювали за допомогою t-критерію Стюдента при вірогідності похибки $p < 0,05$. При проведенні кореляційного аналізу використовували критерій Spearman. Достовірними розбіжності та наявності кореляційного зв'язку вважали при рівні значущості $p < 0,05$. Відмінності між дослідними групами також оцінювалися із застосуванням непараметричних методів із використанням критерію Манна-Уїтні. Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

ВПЛИВ ТРИВАЛОГО ВВЕДЕННЯ НПЛЗ НА ТОКСИЧНІСТЬ, СТАН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ КИШКІВНИКА, ПОКАЗНИКИ ОКСИДАТИВНОГО ТА НІТРОЗУЮЧОГО СТРЕСІВ, МЕТАБОЛІЗМ ПУРИНІВ ТА СЕЧОВОЇ КИСЛОТИ

У представленому розділі наведені результати дослідження впливу тривалого введення НПЛЗ на вміст маркерів оксидативного, нітрозуючого стресів, інтермедіаторів тіол-дисульфідної системи та метаболізм пуринів, сечової кислоти у тканинах кишківника, а також були наведені дані щодо їх профілю токсичності.

Задля розуміння напряму та ступеню вираженості небажаних побічних ефектів, було проведено макроскопічне вивчення стану слизової оболонки кишківника. Враховуючи ті обставини, що наявність/відсутність токсичних та небажаних побічних ефектів ксенобіотиків в більшості випадків залежить від ефективності функціонування антиоксидантно - прооксидантної системи, а також тіол-дисульфідної системи, співвідношення глутатіону та концентрації встановлених та окиснених тіолів, нами було проведено комплексне дослідження маркерів оксидативного, нітрозуючого стресів (нітротирозин, iNOS, 8-OHdG) та тіол-дисульфідної системи (глутатіон відновлений, окиснений, глутатіонредуктазу, глутатіонпероксидазу). Крім того, подібний спектр досліджень саме важливий з точки зору вивчення НПЛЗ, оскільки, показано, що інгібування ферментів ЦОГ1 та ЦОГ2 (особливо неселективне) здатне викликати оксидативний стрес [129]. Саме ступінь диференційного інгібування ЦОГ1 та ЦОГ2 може викликати різну токсичність. Дослідженнями *in vitro*, було показано, що внесення в інкубаційне середовище суспензії клітин диклофенаку, призводило до суттєвої генерації АФК та зниження потенціалу мітохондріальної мембрани, що в свою чергу, призводило до вторинної генерації супероксидрадикалу [130].

Накопичення цито- та геномотоксичних сполук оксидативного та нітрозуючого стресів, а також зміщення тіол-дисульфідної системи у бік окиснених тіолів, обумовлює конформаційні зміни у макромолекулах тканин, та

може виступати у ролі тригерних епігенетичних факторів, а також порушувати сигнальні шляхи та експресійну активність генів.

Паралельно з цим, враховуючи оксидативний стрес у тканих кишківника, відбувається зміна стану ключових ферментів катаболізму пуринових нуклеотидів – аденозиндезамінази (АДА) та ксантинооксидази (КО), що є характерною ознакою проліферуючих клітин. При цьому, у ході КО реакції, відбувається вторинна генерація АФК, у той час, як сечова кислота - продукт цієї реакції є потужним антиоксидантом. Цей подвійний ефект може відігравати ключову роль у реалізації небажаних побічних ефектів НПЛЗ – АФК та аденозин – залежна фрагментація хроматину, пригнічення функціональної активності білків апоптозу [131, 132, 133]. Відповідно до цього, порушення метаболізму пуринів, можуть бути обумовленими з однієї сторони, ульцерегенною дією НПЛЗ, а з іншої, бути наслідком АФК-залежних механізмів пошкодження макромолекул, у тому числі, ферментних систем.

Вищевикладене, обумовлює важливість вивчення молекулярних механізмів побічної дії НПЛЗ саме у комплексі оксидативний стрес – тіол-дисульфідна система – обмін пуринів.

Проведення представленого комплексного дослідження патобіохімічних процесів в тканинах кишківника, під дією НПЛЗ, надає можливість встановити тонкі молекулярні механізми порушення метаболізму та сигнальних шляхів, а також зрозуміти їх внесок у розвиток небажаних побічних ефектів НПЛЗ на шлунково-кишковий тракт.

3.1 Макроскопічне дослідження ульцерегенної дії НПЛЗ при їх тривалому введенні. Вивчення токсичності НПЛЗ

Макроскопічне дослідження слизових оболонок кишково-шлункового тракту показало наявність ульцерегенної дії досліджуваних лікарських засобів, особливо індометацину та диклофенаку при їх тривалому введенні, при цьому, застосування мелоксикаму у дозі 0,1 мг/кг, як видно з табл. 3.1, практично не викликало

уражень слизових оболонок, були зафіксовані лише поодинокі ураження та низька ступінь пошкоджень у 40% тварин, значення яких наведено в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 – Ульцерогенна дія індометацину, ацетилсаліцилової кислоти та мелоксикаму на тлі їх тривалого введення ($M \pm m$)

НПЛЗ	% тварин з пошкодженнями ШКТ	Ступінь пошкодження
Контрольна група тварин (0,9% NaCl), (n=15)	0	-
Диклофенак (0,6 мг/кг), (n=15)	100	17,3±1,5*
Індометацин (0,6 мг/кг), (n=15)	100	14,7±0,05*
Ацетилсаліцилова кислота (0,6 мг/кг), (n=15)	85	7,1±1**
Мелоксикам (0,1 мг/кг), (n=15)	40	0,6±0,01**

Примітка. * – $p < 0,05$ по відношенню до контрольної групи тварин, ** – $p < 0,05$ по відношенню до тварин з введенням диклофенаку та індометацину, n – кількість тварин.

В цілому, отримані дані щодо стану слизових оболонок кишково-шлункового тракту, цілком збігаються з літературними даними, щодо вираженості побічної дії НПЛЗ, максимум прояву яких був у індометацину та диклофенаку, а також з мінімальними проявами у мелоксикаму, що корелює з їх селективністю по відношенню до ЦОГ2.

Окрім ульцерогенної дії НПЛЗ, нами був встановлений вплив тривалого введення НПЛЗ на показники токсичності. Так, аналіз даних щодо динаміки маси тіла у щурів, які отримували терапевтичні дози НПЛЗ протягом 3 місяців показав різноспрямований характер їх впливу. Призначення мелоксикаму не чинило статистично вірогідного впливу на масу тіла щурів: щури цієї експериментальної групи мали достовірне збільшення маси тіла на третьому місяці експерименту у порівнянні з вихідними даними (табл. 3.2) та склало +9,2% по відношенню до 1 місяця спостережень. Разом з цим, введення диклофенаку, індометацину та, у

меншому відсотку, ацетилсаліцилової кислоти, чинило деякий токсичний вплив на динаміку маси тіла, знижуючи її відповідно на 13%, 12% та 5,6% по відношенню до значень 1го місяця.

Таблиця 3.2 – Динаміка маси тіла щурів на тлі 3-місячного введення НПЛЗ (M±m)

НПЛЗ	1 місяць спостережень	2 місяць спостережень	3 місяць спостережень
Контрольна група тварин (0,9% NaCl), (n=15)	254,8±7,8	268,2±5,2	290,8±6,7 (+12,4%)
Диклофенак (0,6 мг/кг), (n=15)	277,8±8,4	274,7±5,4	245,4±6,1 (-13%)*
Індометацин (0,6 мг/кг), (n=15)	298,1±7,2	288,4±7,5	262,1±3,8* (-14%)
Ацетилсаліцилова кислота (0,6 мг/кг), (n=15)	288,4±6,7	285,4±3,5	273,1±5,2* (-5,6%)
Мелоксикам (0,1 мг/кг), (n=15)	296,2±4,9	307,8±6,8	322,1±5,8 (+9,2%)

Примітка. * – p<0,05 по відношенню до контрольної групи тварин, n – кількість тварин.

Крім того, токсичні ефекти диклофенаку, індометацину, проявлялись також їх негативним впливом на деякі показники периферичної крові (кількість лейкоцитів, тромбоцитів, еозинофілів) та біохімічні показники (концентрація білку, АлАт), значення яких наведено в таблиці 3.3. В свою чергу, в групі експериментальних тварин, яким вводили мелоксикам, особливих відхилень не було зареєстровано. Виходячи з даних цих досліджень, ацетилсаліцилова кислота впливала лише на кількість тромбоцитів, а на інші досліджувані показники впливу не мала. Було зареєстровано зниження рівня тромбоцитів у групі тварин, які отримували протягом 3 місяців ацетилсаліцилову кислоту.

Таблиця 3.3 – Вплив 3-місячного введення НПЛЗ на деякі біохімічні показники та клітини периферичної крові ($M \pm m$)

НПЛЗ	Кількість лейкоцитів, * 10^9 /л	Кількість еритроцитів, * 10^{12} /л	Кількість тромбоцитів * 10^9 /л	Еозинофіли (%)	Загальний білок, г/л	Глюкоза ммоль/л	АлАт, од/л	АсАт, од/л
Контрольна група тварин (0,9% NaCl), (n=15)	8,7± 0,4	7,2± 0,8	815± 21,4	0,8± 0,01	100± 5,4	8,2± 0,5	115,2± 7,2	85± 6,7
Диклофенак (0,6 мг/кг), (n=15)	18,2± 0,7*	6,9±0,2	671,8± 9,3*	6,7± 0,5*	72,1± 5*,4	7,9± 0,3	172,1± 12,4*	90,8± 5,3
Індометацин (0,6 мг/кг), (n=15)	15,8± 0,8*	8,4± 1,0	664,8± 11,5*	5,8± 0,8*	81,4± 4,2*	8,9± 0,6	166,8± 13,1*	88,3± 4,2
Ацетилсаліцилова кислота (0,6 мг/кг), (n=15)	9,4± 0,6	9,2± 0,8	511,2± 10,3*	1,1± 0,03	96,2± 4,2	9,1± 0,4	100,8± 8,4	91,4± 6,7
Мелоксикам (0,1 мг/кг), (n=15)	7,3± 0,2	8,8± 0,7	800± 8,4	0,7± 0,01	105,2± 4,9	7,7± 0,2	105,6± 2,4	90,1± 7,5

Примітка. * – $p < 0,05$ по відношенню до контрольної групи тварин, n – кількість тварин.

З урахуванням наявності ulcerогенної дії та токсичного впливу НПЛЗ на динаміку маси тіла (окрім групи щурів яким тривало вводили мелоксикам), окремі біохімічні показники (концентрація білку, АлАт) та клітини периферичної крові, нами були досліджені патобіохімічні зміни у тканинах кишківника, а саме: стан антиоксидантно-прооксидантної та тіол-дисульфідної систем, обмін пуринів в тканинах кишківника на тлі довготривалого введення НПЛЗ.

3.2 Вплив тривалого введення НПЛЗ на розвиток оксидативного та нітрозуючого стресів, стан тіол-дисульфідної системи та метаболізм пуринів, сечової кислоти

Як було зазначено вище, НПЛЗ, здатні викликати окисний стрес, що реалізується, за рахунок інгібування ЦОГ. Низкою досліджень показана інтенсифікація АФК у суспензії клітин при введенні НПЛЗ, зокрема, диклофенаку та пов'язана генерацією АФК гіперекспресія ERK1/2, активація, в свою чергу, ERK - трансдукторного шляху, призводить до гіперметилування ДНК та відповідним епігенетичним перебудовам та порушенням експресійної активності геному клітин ШКТ [134].

Таким чином, можна припустити, у цьому аспекті, два шляхи оксидантно-прооксидантно опосередкованого механізму побічної дії НПЛЗ.

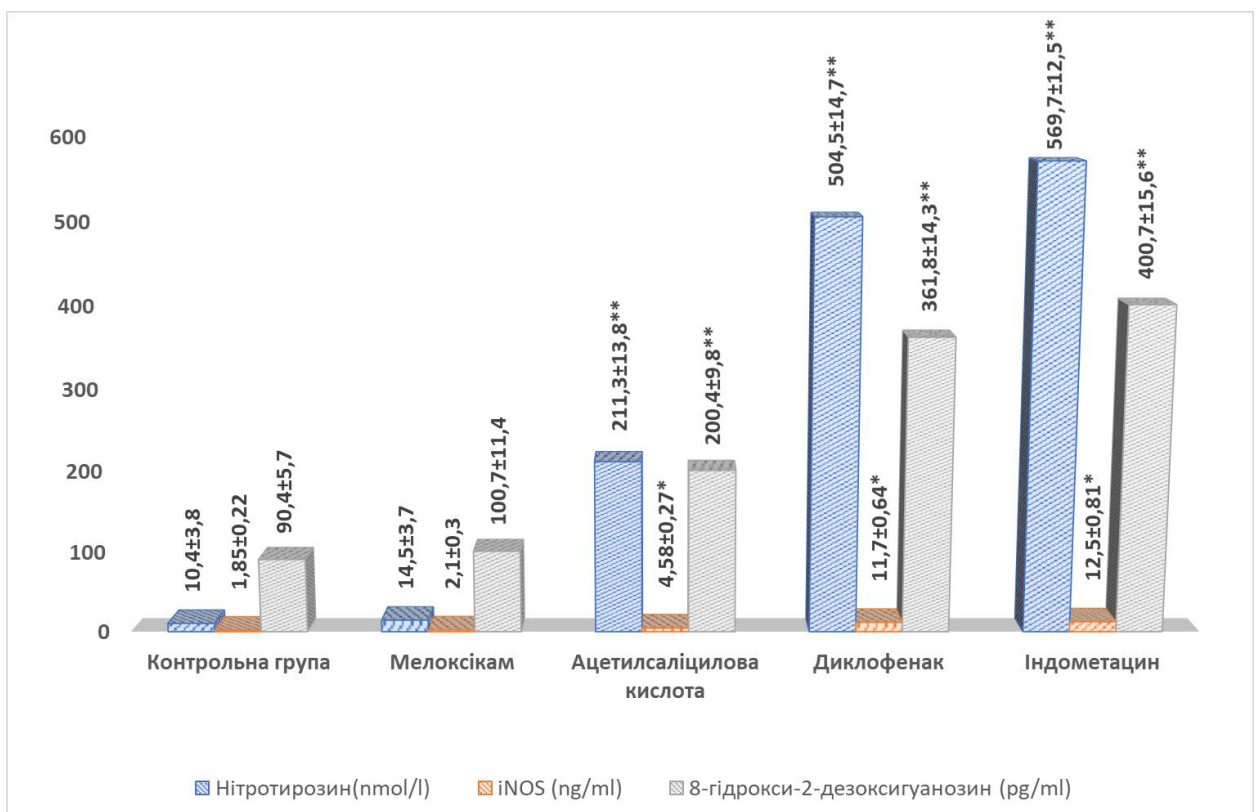
З однієї сторони, зниження рівня простаноїдів, зокрема PGE2 на тлі інгібування ЦОГ призводить до прямої ульцерогенної дії, накопиченню прозапальних цитокінів, ініціації оксидативного, нітрозуючого стресів, зсув тіол-дисульфідної рівноваги, як наслідок, накопиченню цито- та геномотоксичних сполук у тканинах ШКТ. Тобто, у цьому розрізі, оксидативний, нітрозуючий стрес може розглядатися, як неспецифічний фактор патогенезу органних пошкоджень та як компонент молекулярного механізму ЦОГ опосередкованої ульцерогенної дії НПЛЗ.

З іншої сторони, на сьогодні, оксидативний, нітрозуючий стреси, та особливо, накопичення окиснених тіолів, розглядаються, як одні з головних чинників епігенетичних змін геному. Фундаментом цього, є опосередкована АФК та оксидативним стресом зміна експресійної активності глобальних факторів транскрипції (NFkB, MAPK, JAC/STAT), з подальшою зміною регуляції генів за рахунок модифікації безпосередньо ДНК – метилування/деметилування/гідроксиметилування, ковалентних модифікацій гістонів, що в свою чергу, призводить до порушення експресійної активності різноманітних генів клітин, у тому числі, що кодують апоптотичні/антиапоптотичні білки, дизрегуляції експресії

генів та відповідних білків Wnt, Hedgehog сигналіngu та подальшим, можливим, ініціюванням онкогенезу [135, 136].

Вищевикладене, обумовлює необхідність вивчення можливих молекулярних механізмів побічної дії НПЛЗ саме у розрізі впливу їх на антиоксидантно-прооксидантний баланс клітин.

Так, при довготривалому введенні НПЛЗ лабораторним щурам, нами був зафіксований виражений вплив окремих НПЛЗ на розвиток оксидативного та нітрозуючого стресів (рис. 3.1). При цьому відбувається блокада всіх ізоформ циклооксигенази – 1 та 2. Блокада ЦОГ-1 призводить відповідно до пригнічення синтезу так званого гастропротективного простагландину E2, в наслідок чого, відбувається гальмування ангіогенезу, порушення репарації епітелію та індукція синтезу прозапальних медіаторів у тканинах кишківника.



Примітка. * – $p \leq 0,05$ по відношенню до контрольної групи тварин; ** – $p \leq 0,05$ по відношенню до групи тварин з тривалим призначенням мелоксікаму.

Рисунок 3.1 – Вплив тривалого введення НПЛЗ на маркери оксидативного та нітрозуючого стресів у тканинах кишківника експериментальних груп щурів.

Згідно низки літературних джерел, подібні ефекти можуть розвиватись як при блокаді обох ізоформ ЦОГ так і при селективному інгібуванні ЦОГ2, що пов'язано з перемиканням метаболізму арахідонової кислоти з циклооксигеназного на 5-ліпооксигеназний з послідуочим накопиченням лейкотриєнів та ініціації вільнорадикального окиснення [137]. Лейкотриєни та продукти пероксидації, в свою чергу, активують TLR4, які ініціюють систему запальної реакції та активацію нейтрофілів та подальше пошкодження стінки кишківника. Поряд з цими патобіохімічними процесами, відбувається гіперекспресія індукцйбельної ізоформи синтази оксиду азоту, яка вже сприяє запуску нітрузуючого стресу з відповідним накопиченням цито- та геномотоксичних сполук, зокрема ніротирозину, пероксинітриту, цитотоксичної NO-групи та накопичення вільних радикалів.

Дійсно, нами був зафіксований значний приріст маркеру окисного пошкодження білків – ніротирозину, особливо при введенні лабораторним щурам диклофенаку та індометацину (в середньому, в 51 разів по відношенню до контрольної групи тварин). Разом з цим, при застосуванні мелоксикаму, нами не було зафіксовано статистично достовірних змін стосовно ніротирозину. Подібне значне збільшення, у тканинах кишківника, ніротирозину на тлі суттєвого, під дією диклофенаку та індометацину, приросту iNOS (у середньому в 6,2 рази по відношенню до контролю) та ацетилсаліцилової кислоти (в 2,4 рази по відношенню до контролю) свідчить, на нашу думку, про розвиток нітрузуючого стресу, накопиченню токсичних дериватів оксиду азоту та зниженню його біодоступності.

Схожа динаміка нами була зафіксована стосовно приросту у тканині кишківника 8-гідрокси-2-дезоксигуанозину. Так, 3-місячне введення диклофенаку та індометацину викликало відповідно в 3,6 та 4 разів, по відношенню до контрольної групи тварин, приріст 8-гідрокси-2-дезоксигуанозину.

На нашу думку, НПЛЗ – опосередкована індукція оксидативного стресу, зі значним приростом окисно-пошкоджених макромолекул, особливо 8-гідрокси-2-дезоксигуанозин, може розглядатись як один з можливих молекулярних

механізмів епігенетичного пошкодження ДНК при тривалому введенні НПЛЗ. Деякими дослідженнями показано, що надлишок 8-гідрокси-2-дезоксигуанозину, здатен збільшувати частоту мутацій та сприяти гіперметилуванню цитозину. Подібний патобіохімічний каскад, по перше, призводить до прямої цитотоксичної дії у тканинах кишківника, а також, за думкою, деяких дослідників, може опосередковано ініціювати онкогенез. Крім того, нещодавніми дослідженнями, було показано ключову роль оксидативного стресу та АФК у модуляції Hedgehog, та Wnt – сигналіngu та ініціювання онкогенезу [138, 139, 140].

Із розвитком оксидативного стресу невід’ємно пов’язаний зсув тіол-дисульфідної рівноваги у бік окиснених тіолів та виснаження пулу глутатіону. Останніми дослідженнями було продемонстровано вплив співвідношення GSH/GSSG із глобальним гіперметилуванням ДНК, що пов’язано з розвитком оксидативного стресу, виснаженням пулу GSH та S-аденозилметіоніну. Крім того, встановлено, що дефіцит GSH сприяє порушенню упаковки хроматину. За рахунок дефіциту ядерного GSH, зменшується окисно-встановлений потенціал, що стимулює епігенетичний процес та гіперметилування ДНК протягом клітинного циклу.

Нашими дослідженнями встановлено, що паралельно, із розвитком оксидативного/нітрозуючого стресу, відбувається зсув тіол-дисульфідної рівноваги у бік окиснених тіолів, значення яких наведено в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4 – Вплив тривалого введення НПЛЗ на маркери тіол-дисульфідної системи у тканинах кишківника експериментальних груп щурів ($M \pm m$)

Групи тварин, (N=15)	GSH, мкмоль /гр/тканини	GSS, мкмоль /гр/тканини	ГР, ум.од. /мг/білку/хв	ГПР, ум.од. /мг/білку/хв
1	2	3	4	5
Контрольна група	12,7±1,8	0,28±0,02	28,4±1,45	73,5±3,62

Продовження таблиці 3.4

1	2	3	4	5
Мелоксикам (0,1 мг/кг)	11,6±1,1	0,33±0,04	21,7±2,51	68,4±2,81
Ацетилсаліцилова кислота (0,6 мг/кг)	8,5±0,62*	0,52±0,07*	18,2±0,64*	61,7±0,77*
Диклофенак (0,6 мг/кг)	4,5±0,28**	4,21±0,36**	11,5±0,47**	32,5±1,2**
Індометацин (0,6 мг/кг)	3,8±0,36**	4,9±0,48**	10,8±0,5**	30,6±0,85**

Примітка. * – $p \leq 0,05$ по відношенню до контрольної групи тварин; ** – $p \leq 0,05$ по відношенню до групи тварин з тривалим призначенням мелоксикаму, N – кількість тварин.

Вплив НПЛЗ на показники тіол-дисульфідної системи був односпрямованим з їх ульцерогенною дією та впливом на маркери оксидативного/нітрозуючого стресів. Звертає на себе увагу, виражена дія індометацину, диклофенаку, а також ацетилсаліцилової кислоти на приріст окисненої форми глутатіону на тлі виснаження її відновленої форми та зниження активності ключових ферментів тіол-дисульфідної системи – ГР та ГПР. З літературних джерел відомо, що тіол-дисульфідна система відіграє ключову роль у редокс-регуляції генів. Порушення синтезу відновлених її інтермедіаторів є провідним компонентом у порушенні експресивної активності генів, можливих їх епігенетичних змін [141, 142].

Важливо зазначити, що нами було встановлено позитивну кореляцію концентрації GSS з нітротирозином та 8-гідрокси-2-дезоксигуанозиним при призначенні диклофенаку та індометацину (відповідно $r = 0,85$, $p < 0,0001$; $r = 0,91$, $p < 0,0001$; та $r = 0,88$, $p < 0,0001$; $r = 0,94$, $p < 0,0001$).

Оксидативний стрес пробігає при патобіохімічному порушенні обміну пуринів, які є по перше, причиною гіпергенерації АФК, зокрема, супероксид-аніон-радикалу, а також, по-друге, субстратами ферменту АДА, зокрема, аденозину та здатні викликати фрагментацію ядра, конденсацію хроматину, що порушує баланс між експресією та синтезом білків апоптозу/антиапоптозу.

Дійсно, як видно з таблиці 3.5, небажані побічні ефекти НПЛЗ, особливо індометацину та диклофенаку, проявлялись також в їх негативному впливові на обмін пуринів та сечової кислоти.

Таблиця 3.5 – Вплив тривалого введення НПЛЗ на маркери тіол-дисульфідної системи у тканинах кишківника експериментальних груп щурів ($M \pm m$)

Групи тварин, (N=15)	АДА, нмоль/хв/мг	КО, мкмоль/хв/мг	Сечова кислота, умоль/л
Контрольна група	12,5±0,28	0,75±0,14	450,2±25,62
Мелоксикам (0,1 /кг)	14,4±0,75*	1,0±0,29	400,3±18,4
Ацетилсаліцилова кислота (0,6 мг/кг)	15,7±1,4*	1,7±0,84*	651,2±31,2*
Диклофенак (0,6 мг/кг)	37,8±2,7*	5,4±0,7*	780,2±38,7*
Індометацин (0,6 мг/кг)	44,2±2,9*	6,0±0,67*	800,5±59,7*

Примітка. * – $p \leq 0,05$ по відношенню до контрольної групи тварин, N – кількість тварин.

Так, призначення ацетилсаліцилової кислоти, диклофенаку та індометацину, статистично достовірно впливало на підвищення активності АДА (1,3, 3 та 3,5 рази відповідно контрольної групи тварин), КО (2,2, 7,2 та 8 разів), а також сечової кислоти (1,4, 1,7 та 1,8 разів). Крім того, статистичний аналіз на виявлення зв'язку між АДА, КО, сечової кислоти та показників оксидативного/нітрозуючого стресів, показав їх взаємозв'язок з високим коефіцієнтом кореляції.

Так, зв'язок між АДА та нітротирозином, при застосуванні індометацину та диклофенаку, складав $r = 0,81$, $p < 0,0001$; $r = 0,8$, $p < 0,0001$; АДА та 8-гідрокси-2-дезоксигуанозин відповідно $r = 0,78$, $p < 0,0001$; $r = 0,84$, $p < 0,0001$; КО та нітротирозин - $r = 0,86$, $p < 0,0001$; $r = 0,82$, $p < 0,0001$; КО та 8-гідрокси-2-дезоксигуанозин $r = 0,8$, $p < 0,0001$; $r = 0,93$, $p < 0,0001$. Подібний взаємозв'язок свідчить про інтенсифікацію оксидативного стресу, у тому числі, за рахунок порушення метаболізму пуринів. Сечова кислота, на нашу думку, не заважаючи на

її виражену антиоксидантну дію, в умовах оксидативного стресу, може відігравати певну роль у патобіохімічних змінах тканин кишківника, що пов'язані із її здатністю порушувати редокс регуляцію клітин та індукувати вторинну генерацію АФК.

Таким чином, проведеними комплексними дослідженнями щодо ульцерогенної, токсичної дії НПЛЗ, а також їх впливу на патобіохімічні зміни у тканинах кишківника, показано їх односпрямовану токсичну дію на маркери оксидативного/нітрозуючого стресу, обмін пуринів, а також інтермедіатори тіол-дисульфідної системи. Крім того, був встановлений високий кореляційний зв'язок між цими показниками. Найбільш вираженими токсичними ефектами володіли диклофенак та індометацин, ацетилсаліцилова кислота проявляла менш значущі ефекти, а мелоксикам статистично вірогідно не впливав на досліджувані показники.

Отримані експериментальні дані показали значущий вплив НПЛЗ на метаболічні шляхи у тканинах кишківника, що може бути підґрунтям їх впливу на тонкі молекулярно-біохімічні ланки порушень метаболізму тканин кишківника. Розвиток оксидативного /нітрозуючого стресу, тіол-дисульфідної системи (провідних ланок гіперметилування ДНК та епігенетичних змін геному) ставить питання щодо доцільності більш їх глибокого вивчення безпосередньо на епігенетичні процеси, а також на систему молекулярних регуляторів клітинного циклу та маркерні продукти пошкодження тканин ШКТ.

Резюме

Проведений аналіз результатів дослідження впливу тривалого введення НПЛЗ на вміст маркерів оксидативного, нітрозуючого стресів, інтермедіаторів тіол-дисульфідної системи та метаболізм пуринів, сечової кислоти у тканинах кишківника, які були отримані за допомогою комплексу досліджень, дозволив дійти деяких проміжних висновків.

За допомогою проведеного макроскопічного дослідження стану слизової оболонки кишківника, виявлено, що досліджувані лікарські препарати, зокрема

індометацин та диклофенак, сприяють виникненню ульцерогенного ефекту при тривалому застосуванні. Проте, використання мелоксикаму у дозі 0,1 мг/кг майже не спричиняло пошкоджень слизових оболонок. Відмічено лише випадкові ураження та низький рівень пошкоджень, які були виявлені у 40% випробуваних тварин.

Враховуючи вищезазначене, можна стверджувати, що зміни показників маси тіла у щурів, які отримували терапевтичні дози НПЛЗ протягом 3 місяців, показали різноспрямований вплив. Так, довготривале призначення мелоксикаму, маса тіла щурів практично не змінювалася статистично значущим чином протягом експерименту. У цієї групи щурів спостерігалось достовірне зростання маси тіла на третьому місяці дослідження, збільшившись на +9,2% порівняно з початковими показниками в перший місяць спостережень. У той же час призначення диклофенаку, індометацину та, у меншій мірі, ацетилсаліцилової кислоти призвело до певного токсичного впливу на динаміку маси тіла. Маса тіла цих груп щурів зменшилася відповідно на 13%, 12% та 5,6% в порівнянні зі значеннями першого місяця спостережень.

Крім того, при визначенні загально токсичних параметрів (вплив на концентрацію загального білку, АлАТ, АсАт у плазмі крові та деяких показників периферичної крові), було виявлено негативний вплив при введенні диклофенаку, індометацину – на всі показники. В свою чергу, ацетилсаліцилова кислота впливала лише на кількість тромбоцитів, а на інші досліджувані показники статистично значущого впливу не мала.

Імуноферментне дослідження концентрації нітротирозину, в групах щурів яким вводили диклофенак та індометацин, показало значний приріст в середньому, в 51 разів по відношенню до контрольної групи тварин. У наших спостереженнях, при застосуванні мелоксикаму, не виявлено статистично значущих змін щодо обраного показника. Значне збільшення рівня нітротирозину у тканинах кишківника, викликане дією диклофенаку та індометацину, спричиняє приріст iNOS у середньому в 6,2 рази більше в порівнянні з контрольною групою, а також ацетилсаліцилової кислоти у 2,4 рази відносно контролю. Ці показники,

на нашу думку, свідчать про розвиток нітрозуючого стресу, накопичення токсичних похідних оксиду азоту та зменшення його доступності. Аналогічна динаміка була виявлена щодо приросту рівня 8-гідрокси-2-дезоксигуанозину у тканинах кишківника. Так, тримісячне вживання диклофенаку та індометацину викликало відповідно 3,6 та 4-кратний зріст рівня 8-гідрокси-2-дезоксигуанозину у порівнянні з контрольною групою тварин.

При дослідженні глутатіонредуктази, глутатіон пероксидази, окисленої та відновленої форми глутатіону, за допомогою імуноферментного методу, був досліджений вплив НПЛЗ на показники тіол-дисульфідної системи. Відмічено виражений вплив індометацину, диклофенаку та ацетилсаліцилової кислоти на зростання окисленої форми глутатіону на тлі виснаження її стабільної форми та зменшення активності важливих ферментів тіол-дисульфідної системи, таких як глутатіон редуктаза та глутатіон пероксидаза. Було досліджено рівень сечової кислоти, який підвищувався при введенні ацетилсаліцилової кислоти в 1,4, диклофенаку в 1,7 та індометацину в 1,8 разів. Що свідчить, про її внесок у патобіохімічні зміни, у тканинах кишківника, пов'язані із її здатністю порушувати редокс регуляцію клітин та вторинної генерації АФК.

Вимірювання аденозіндезамінази та ксантиноксидази проводилось спектрофотометричним методом. Після довготривалого введення ацетилсаліцилової кислоти, диклофенаку та індометацину, в значній мірі, призводило до збільшення активності АДА (відповідно на 1,3, 3 та 3,5 рази в порівнянні з контрольною групою тварин), КО (2,2, 7,2 та 8 разів). Це підтверджує негативний вплив цих препаратів на обмін пуринів.

Враховуючи вищенаведене, можна констатувати, що проведеними комплексними токсикологічними та біохімічними методами досліджень встановлено виражену токсичну дію окремих НПЛЗ (диклофенаку та індометацину), окремий незначний вплив ацетилсаліцилової кислоти та мелоксикаму. Крім того, встановлено їх вплив на патобіохімічні зміни в тканинах кишківника, які вказують на розвиток оксидативного стресу та дисбаланс пуринового обміну, а також зміни в системі тіолових сполук. Дослідження

показало високу взаємо зв'язаність між цими факторами. Серед досліджуваних НПЛЗ, диклофенак та індометацин проявляли найбільш виражені токсичні ефекти на зазначені показники. Ацетилсаліцилова кислота виявила менш значущий вплив, а мелоксикам статистично достовірно не впливав на досліджувані показники.

Матеріали розділу відображені в 2 статтях та 1 тезах [143, 144, 145].

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ НЕСТЕРОЇДНИХ ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ НА ДОСЛІДЖЕННЯ ФАКТОРІВ ЕНДОГЕННОЇ ЦИТОПРОТЕКЦІЇ (HSP70), МАРКЕРІВ ПОШКОДЖЕННЯ ТКАНИНИ (MMP8), МАРКЕРІВ ARUD СИСТЕМИ (ГРЕЛІН) ТА ФЕКАЛЬНОГО КАЛЬПРОТЕКТИНУ

У розділі наведено результати проведених досліджень щодо визначення вмісту MMP8, HSP70, греліну у плазмі крові та фекального кальпротектину у калі щурів впродовж тривалого введення НПЛЗ та можливої кореляції з ульцерогенною дією зазначених лікарських засобів. Був визначений кореляційний зв'язок між вмістом MMP8 і HSP70 зі ступенем пошкодження шлунково-кишкового тракту у щурів. Оцінку показників MMP8, HSP70, греліну та фекального кальпротектину було здійснено із використанням імуноферментного методу, кількісними параметрами було визначено вміст цих маркерів та ступінь пошкодження ШКТ у щурів.

Актуальність виконаного дослідження полягає в тому, що на тлі тривалого застосування НПЛЗ, при розвитку небажаних побічних ефектів, насамперед ульцерогенної дії, відбувається інтенсифікація в уражених тканинах процесів вільнорадикального окиснення та активація матриксних металопротеїнів, та HSP70, які здатні впливати на розвиток побічних ефектів, у тому числі непластичних ефектів [146].

Слід зазначити, що для ефективного діагностування та якісного прогнозу перебігу захворювань шлунково-кишкового тракту необхідно не тільки виявляти маркери ушкодження, але й встановити їх концентрації, які будуть співставлені з ульцерогенною дією. Перевагами експериментального дослідження є можливість використання інформативних біохімічних маркерів в різних біологічних рідинах та тканинах.

4.1 Вплив нестероїдних протизапальних лікарських засобів на синтез білків теплового шоку

У всіх організмів, реакція на тепловий шок, викликана широким спектром стимулів, збільшує експресію сімейства білків, яких називають білками теплового шоку (HSP), які діють як молекулярні шаперони, а для клітин, що перебувають у стані стресу, виявляють цитопротекторні властивості. Стрес, що перевищує певний поріг, викликає неправильне згортання та агрегацію білків, руйнування регуляторних комплексів [147]. У клітинах ссавців, шаперонні функції HSP підтримують та відновлюють клітинний гомеостаз. Основні білки теплового шоку, що мають шаперонну активність, відносяться до п'яти консервативних класів: HSP33, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100 і класу малих білків теплового шоку (sHSP). HSP із великою молекулярною масою є АТФ-залежними молекулярними шаперонами, а з малою молекулярною масою діють АТФ незалежно. У фізіологічних умовах шаперони також беруть участь у передачі сигналів та транспортуванні білків. Однак шкідливий вплив на клітини агресивних факторів навколишнього та внутрішнього середовища, збільшує потребу в HSP (зокрема, HSP70). Серед HSP, HSP70 має сильні цитопротекторні властивості. Викликана стресом гіперекспресія HSP70 захищає клітини від окисного пошкодження макромолекул, забезпечує їх фолдинг та протидіє запуску синтезу проапоптотичних білків, обмежуючи тим самим, процеси клітинної загибелі. Разом з цим, гіперекспресія та гіперконцентрація HSP70 білків в онкозмінених клітинах може мати певний вплив на неопластичні процеси в цих клітинах та тканинах [148].

Злоякісні новоутворення ШКТ складають найбільшу частку в структурі онкологічної захворюваності населення. Не зважаючи на успіхи у вивченні причин та особливостей онкологічних хвороб, частота захворюваності та смертності від них продовжує зростати. Проблема злоякісного росту є однією з самих актуальних проблем у медицині та біології. На сьогодні є багато експериментальних та клінічних досліджень щодо ролі HSP-білків в онкогенезі

[149, 150, 151].

Проведеними нами дослідженнями було встановлено, що довготривале введення дослідних НПЛЗ лабораторним тваринам, призводило до збільшення в плазмі крові концентрації HSP70 білків (табл. 4.1).

Таблиця 4.1 – Вміст HSP70 у плазмі крові щурів при тривалому введенні нестероїдних протизапальних засобів ($M \pm m$)

Експериментальна група	HSP70, ng/ml
Контрольна група тварин (0,9% NaCl, n = 15)	3,80 ± 0,42
Індометацин (0,6 мг/кг, n = 15)	14,90 ± 0,62*
Ацетилсаліцилова кислота (0,6 мг/кг, n = 15)	10,50 ± 0,8*
Мелоксикам (0,1 мг/кг, n = 15)	7,30 ± 0,27*
Диклофенак (0,6 мг/кг, n = 15)	12,20 ± 0,82*

Примітка. * – $p < 0,05$ відносно контрольної групи тварин, n – кількість тварин у групі.

Отримані данні у плазмі крові щурів, при тривалому введенні нестероїдних протизапальних лікарських засобів, показали, що індометацин (0,6 мг/кг), ацетилсаліцилова кислота (0,6 мг/кг), мелоксикам (0,1 мг/кг), диклофенак (0,6 мг/кг) достовірно впливають на підвищення HSP70, в порівнянні з контрольною групою, причому найбільший вплив мав індометацин, який збільшував концентрацію HSP70 в 3,9 рази, а найменший мелоксикам - збільшення в 1,9 рази.

Важливо зазначити, що математичний аналіз даних вмісту HSP70 показав позитивний кореляційний зв'язок середньої сили (індометацин $r = 0,49$; ацетилсаліцилова кислота $r = 0,57$; мелоксикам $r = 0,50$; диклофенак $r = 0,50$) вмісту цього маркера та ступенем пошкодження ШКТ у щурів.

На нашу думку, подібне підвищення вмісту HSP70 обумовлено двома протилежними процесами, що узгоджується з іншими дослідженнями. На тлі

ультрогенної дії НПЛЗ активується система клітинних шаперонів, які здатні забезпечити фолдинг білків і запобігати процесам їхньої денатурації. HSP70 збільшують виживання клітин під час дії різних видів стресу, включаючи: підвищену температуру, гіпоксію, окиснювальний стрес, зміну рН, вплив важких металів та ін. Подібний вплив HSP70 обумовлений їх здатністю нейтралізувати токсичність денатурованих і неправильно згорнутих білків, які накопичуються під час цитодеструкції, підвищуючи тим самим, виживаність клітин. Крім того, HSP70 за рахунок антиоксидантної дії, а також завдяки спроможності інгібувати активацію стресових кіназ сімейства SAPK/JNK, як одного з основних ранніх тригерів апоптозу, можуть чинити проонкогенну дію та підсилювати ефекти матриксних металопротеїназ [146, 152].

З іншої сторони, HSP70 також бере участь у рості, проліферації та диференціюванні клітин. Накопичення цього білка в ядрах клітин захищає GATA-1 - транскрипційний фактор, необхідний еритропоезу. Злоякісні клітини експресують вищі рівні HSP70, ніж нормальні клітини, а висока експресія HSP70 вказує на онкогенний фенотип, який зазвичай стійкий до хіміотерапії та запрограмованої загибелі клітин [153]. Більш того, HSP70 втручається в різні молекулярні шляхи апоптозу, запобігаючи реалізації програм клітинної смерті. Крім антиапоптотичної функції, HSP70 має імуномодулюючу дію і перехресно презентується з молекулою МНС-I. HSP70 активує обидва плеча імуноної системи (вроджену та адаптивну) і діє як потужний імуномодулятор [154].

У нестресових умовах, клітини експресують HSP70 на базальному рівні. Підвищена експресія, характерна для ракових або стресових клітин, збільшує виживання цих клітин. Крім того, протиракова терапія викликає експресію HSP70, яка має цитопротекторний ефект. Клінічні дослідження показують, що гіперконцентрація HSP70 у хворих на рак, передбачає поганий прогноз, оскільки злоякісні клітини експресують більше HSP70 під час прогресування пухлини (рак ендометрію, остеосаркоми та нирково-клітинні пухлини) порівняно з нормальними клітинами [155]. HSP70 та простатспецифічний антиген є маркерами, які використовуються для виявлення пацієнтів на ранніх стадіях раку

простати [156]. Крім того, спостерігається гіперекспресія HSP70 при прогресуванні хронічного мієлолейкозу [157]. У клітинах HL-60/BCR-ABL і K562 підвищена експресія HSP70 допомагає клітинам протистояти загибелі клітин, опосередкованої іматинібом (імаїніб, хіміотерапевтичний агент, що використовується для блокування активності тирозинкінази Bcr-Abl). В епітеліальних клітинах шлунка експресія HSP70 підвищується після зараження *Helicobacter pylori* [156]. Крім того, HSP70.2, член сімейства HSP70, високо експресується під час сперматогенезу та прогресування раку молочної залози, тим самим затримуючи старіння [156]. Підвищена експресія HSP70, пов'язана з онкогенезом раку молочної залози, раком ендометрію, раком шлунка і гострого лейкозу з поганими прогнозами та зі стійкістю до хіміо- та променевої терапії. Накопичення HSP70 у ядрі є діагностичним маркером епітеліальної дисплазії, а антитіла проти HSP70 присутні у сироватці пацієнтів із гепатоцелюлярною карциномою [157].

Підсумовуючи вищевикладене, можна зробити висновок, що HSP70, на сьогодні, розглядається з однієї сторони, як перспективна терапевтична мішень для зниження лікарської стійкості ракових клітин; з другої – як фактор неопластичних процесів в тканинах; а з третьої - як шаперон при стресорному пошкодженні клітин та як один з можливих компенсаторно-адаптаційних молекулярних факторів [158].

Враховуючи отримані нами результати, стосовно здатності дослідних НПЛЗ підвищувати концентрацію у плазмі крові HSP70-білків та аналізуючи дані у літературних джерелах, можна зробити висновок, щодо доцільності вивчення функції цих білків у комплексі з іншими молекулярними факторами, білками-регуляторами клітинного циклу, проонкогенами, Крім того, необхідно проаналізувати кореляційні зв'язки HSP70 як із епігенетичними змінами ДНК, так й з ульцерогенною дією НПЛЗ та маркерами пошкодження ШКТ. Подібне комплексне дослідження ролі цих білків, дозволить оцінити їх можливий вплив на тканини ШКТ як зі сторони механізмів терапевтичної дії НПЛЗ, так й у площині механізмів реалізації побічних ефектів НПЛЗ.

4.2 Вплив нестероїдних протизапальних лікарських засобів на вміст маркерів пошкодження тканин при їх тривалому застосуванні

Матриксні металопротеїнази (ММП) є сімейством структурно споріднених цинк-залежних ендопептидаз, здатних руйнувати майже всі компоненти позаклітинного матриксу (ЕСМ). Підвищена активність ММП є результатом специфічних для пухлинних клітин механізмів, таких як ангиогенез та епітеліально-мезенхімальний перехід (ЕМТ) [159]. Підвищені рівні сироваткових ММР-8, ММР-9 та ТІМР-1 спостерігаються при кількох видах раку: легнях, шлунка, гепатоцелюлярному та колоректальному раку [160, 161].

На думку багатьох авторів, члени сімейства цинк-залежних протеїназ матриксних металопротеїназ були запропоновані як біомаркери та терапевтичні мішені для різних видів раку. Ці протеїнази в основному вважалися сприятливими для розвитку пухлин через їх незаперечну роль в одній з ознак прогресування раку — деградації позаклітинного матриксу (ЕСМ), яка корелює з інвазією та метастазуванням ракових клітин [79, 162].

Нами було досліджено вміст ММР8 у плазмі крові в усіх експериментальних групах тварин. Було встановлено, значне підвищення вмісту ММР8 у плазмі крові тварин. У щурів, які отримували індометацин відмічалось підвищення вмісту ММР8 у середньому – на 86%, ацетилсаліцилову кислоту – на 79%, мелоксикам – на 66% та диклофенак – на 85% (табл. 4.2).

Таблиця 4.2 – Вміст ММР8 у плазмі крові щурів при тривалому введенні нестероїдних протизапальних лікарських засобів ($M \pm m$)

Експериментальна група	ММР8, ng/ml
1	2
Контрольна група тварин (0,9% NaCl, n = 15)	0,11 ± 0,03
Індометацин (0,6 мг/кг, n = 15)	0,82 ± 0,10*

Продовження таблиці 4.2

1	2
Ацетилсаліцилова кислота (0,6 мг/кг, n = 15)	0,52 ± 0,14*
Мелоксикам (0,1 мг/кг, n = 15)	0,32 ± 0,08*
Диклофенак (0,6 мг/кг, n = 15)	0,94 ± 0,18*

Примітка. * – $p < 0,05$ відносно контрольної групи тварин, n – кількість тварин у групі.

Важливо зазначити, що математичний аналіз даних вмісту MMP8 показав позитивний кореляційний зв'язок середньої сили (індометацин, $r = 0,62$; ацетилсаліцилова кислота, $r = 0,57$; мелоксикам, $r = 0,50$; диклофенак, $r = 0,61$) вмістом цього маркеру та ступенем пошкодження ШКТ у щурів.

Відомо, що ефекти НПЛЗ безпосередньо пов'язані з їхньою здатністю зменшувати гіперпродукцію інтерлейкінів, фактора некрозу пухлин, активність матриксних металопротеїназ, продуктів пероксидації. Однак впродовж тривалого застосування, при розвитку небажаних побічних ефектів, насамперед ульцерогенної дії, відбувається інтенсифікація в уражених тканинах процесів вільнорадикального окиснення та активація матриксних металопротеїназ, насамперед MMP8 і MMP9. Це цілком збігається з нашими експериментальними дослідженнями [143].

Враховуючи низку досліджень, в яких показано здатність НПЛЗ викликати онкологічні захворювання кишківника при тривалому застосуванні, отримані нами дані, стосовно MMP8, можуть деякою мірою пояснити вищезазначений побічний ефект. Так, матриксні металопротеїнази відіграють важливу роль у прогресуванні колоректального раку, беручи участь у руйнуванні екстрацелюлярного матриксу, ангіогенезі пухлини; крім того, вони взаємодіють з факторами росту та їхніми рецепторами, медіаторами апоптозу та молекулами клітинної адгезії [146, 163, 165]. Саме деградація базальної мембрани та строми – це необхідний механізм до запуску процесів онкогенезу та метастазування. Багато пухлин характеризуються локально та системно збільшеним рівнем матриксних металопротеїназ, здатних руйнувати білкові молекули матриксу. Крім того, більшість матриксних металопротеїназ секретується не онкозміненими клітинами,

а оточенням навколо пухлини. Оскільки у формуванні пухлин важливу роль відіграє стромальне оточуюче середовище, то саме MMP9, MMP4 та особливо MMP8, здатні змінювати та ініціювати онкогенез на початкових стадіях [143, 166, 167].

4.3 Вплив нестероїдних протизапальних лікарських засобів на вміст греліну при їх тривалому застосуванні

У попередній главі нами було показано, що довготривале призначення окремих НПЛЗ призводить до розвитку оксидативного та нітрозуючого стресів у тканинах кишківника. На думку низки дослідників, оксидативний стрес є основною причиною пошкодження клітин та тканин ШКТ. Показано, що в умовах інтенсифікації процесів вільнорадикального окиснення у тканинах ШКТ, провідну роль у захисті клітин відіграє грелін [168, 169].

Грелін — це ендогенний пептидний гормон із 28 амінокислот, який в основному виробляється та секретується шлунком. Його зазвичай називають гормоном голоду через його орексигенний ефект. На додаток до його ролі у сприйнятті поживних речовин, апетиті та початку прийому їжі, грелін став ключовим метаболічним регулятором у багатьох органах і тканинах [170].

Інші вчені, раніше підсумовували вплив греліну на глюкозний та енергетичний гомеостаз, ожиріння, кардіозахист, атрофію м'язів, метаболізм кісток, запалення, старіння та окислювальний стрес [171, 172].

Разом з цим, показана захисна дія греліну в умовах оксидативного стресу, а також запальних процесів у шлунку та кишківнику. Так, було показано здатність греліну, в умовах запальних процесів у кишківнику, знижувати вивільнення запальних цитокінів та нейтрофільного інфільтрату за рахунок зниження активності мієлопероксидази. Також було продемонстровано здатність греліну модулювати активність глутатіоноксидази у сегментах клубової кишки після ішемічного/реперфузійного пошкодження, що вказувало на виражений антиоксидантний ефект. Крім того, було продемонстровано властивість греліну

щодо цитопротекції відносно кишківника у щурів, які перенесли коліт, що базувалось на його здатності підвищувати локальний синтез ДНК та знижувати рівні TNF та IL-6 [169, 173, 174].

Представлені дані свідчать, що грелін впливає та покращує загоєння тканин кишківника, механізм дії якого базується на його антиоксидантних та протизапальних ефектах.

Таким чином, враховуючи отримані дані, щодо здатності НПЛЗ викликати у тканинах кишківника оксидативний стрес та ульцерогенний ефект, на нашу думку, доцільно вивчати механізми побічної дії, з урахуванням можливої негативної дії НПЛЗ на метаболізм греліну.

Як видно з табл. 4.3, довготривале призначення НПЛЗ призводило до різноспрямованої динаміки греліну.

Таблиця 4.3 – Вміст греліну у плазмі крові щурів при тривалому введенні нестероїдних протизапальних засобів ($M \pm m$)

Експериментальні групи	Грелін, pg/ml
Контрольна група тварин (0,9% NaCl, n = 15)	481,2±11,7
Індометацин (0,6 мг/кг, n = 15)	121,4±5,6
Ацетилсаліцилова кислота (0,6 мг/кг, n = 15)	1584,68±21,7*
Мелоксикам (0,1 мг/кг, n = 15)	684,36±15,7*
Диклофенак (0,6 мг/кг, n = 15)	185,7±7,24

Примітка. * – $p < 0,05$ відносно контрольної групи тварин, n – кількість тварин у групі.

Так, при застосуванні диклофенаку та індометацину відбувалось зниження концентрації греліну у плазмі крові (відповідно в 2,6 та 3,9 рази по відношенню до контрольної групи тварин. Разом з цим, у тварин з призначенням ацетилсаліцилової кислоти спостерігалось підвищення греліну у порівнянні з

контрольною групою тварин (в 3,2 рази), мелоксикам сприяв менш вираженим ефектам (підвищення в 1,4 рази), по відношенню до ацетилсаліцилової кислоти.

На нашу думку, встановлені ефекти ацетилсаліцилової кислоти та мелоксикаму не пов'язані з їх прямою стимулюючою дією відносно греліну. Дослідження щодо впливу цих препаратів на показники оксидативного та нітрозуючого стресів, вміст гомоцистеїну та обмін пуринів, показали незначний вплив цих препаратів. Можна зробити висновок, що їх мінімальні токсичні ефекти призводять до стимуляції сигнальних шляхів, направлених на стимуляцію ключових ферментів антиоксидантної та тіол-дисульфідної систем, а також інтермедіаторів APUD системи, у тому числі греліну, що забезпечує захист клітин та активізацію процесів репарації тканин кишківника.

Водночас, тривале введення індометацину та диклофенаку негативно впливало на антиоксидантну та тіол-дисульфідну системи, впродовж їх введення було зареєстровано значний приріст цито- та геномотоксичних сполук, що, у свою чергу, призводило до зриву клітинних адаптаційних механізмів та відповідне пригнічення систем ендогенної цитопротекції.

Таким чином, отриманні нами данні продемонстрували здатність НПЛЗ впливати на динаміку вмісту греліну, що корелювало з їх напрямком та вираженістю токсичних ефектів, пов'язаних з антиоксидантно-оксидантними процесами в тканинах кишківника.

4.4 Вплив нестероїдних протизапальних лікарських засобів на вміст фекального кальпротектину при їх тривалому застосуванні

Відомо, що фекальний кальпротектин (fCAL), який виділяється нейтрофілами та макрофагами під час їх активації або загибелі, служить індикатором активності запального процесу у кишківнику і розповсюдженні ураження в ньому [175].

Кальпротектин представляє собою Ca^{2+} -залежних гомо - або гетерокомплекс двох білків. Окрім антимікробної активності та транспорту жирних кислот

MRP8/14, він є потужним хемоатрактантом для нейтрофілів та моноцитів. Ріст рівня MRP8/14 гетеродимера та MRP14 гомодимера, пов'язаний з активним запаленням [176, 177].

Запалення тканини кишківника може стимулювати канцерогенез, а наявність запального мікрооточення є ключовою ознакою раку. Крім того, роль запальних реакцій на місцевому та системному рівні відіграє важливу роль у прогресуванні захворювання та виживання при КРР [178].

На сьогодні, фекальний кальпротектин - є маркером активності лейкоцитів і маркером запалення в шлунково-кишковому тракті. Кальпротектин виділяється у великих кількостях з калом при пошкодженні слизової оболонки кишківника. Встановлено, що рівень фекального кальпротектину корелює безпосередньо з числом нейтрофілів в просвіті кишківника. Запальні захворювання кишківника характеризуються підвищенням даного показника. Кальпротектин, виявлений у фекаліях, є одним із чутливих показників запалення товстого кишківника, який використовується головним чином при клінічній оцінці запальних захворювань кишківника (ЗЗК). Кальпротектин потрапляє у просвіт кишківника шляхом міграції та стійкий до ферментативного розщеплення і, тому, може бути легко виявлений у рідинах організму, таких як фекалії [179]. Підвищення рівня фекального кальпротектину (ФК) відбувається при різних захворюваннях шлунково-кишкового тракту, включаючи коліт і злоякісні новоутворення, і, хоча це чутливий показник запалення, він не специфічний для будь-якого окремого стану. Проте, враховуючи важливість запалення у розвитку та прогресуванні раку, наявність підвищеного ФК може забезпечити додаткову діагностику ризику колоректальної неоплазії [180].

Враховуючи вищевикладене, цілком зрозумілим є оцінка токсичних ефектів НПЛЗ на тканини кишківника за допомогою цього маркеру.

Так, при тривалому застосуванні НПЛЗ було виявлено статистично достовірне підвищення рівня фекального кальпротектину на тлі застосуванні всіх досліджуваних препаратів, що відображено в табл. 4.4.

Таблиця 4.4 – Вміст рівня фекального кальпротектину у плазмі крові щурів при тривалому введенні нестероїдних протизапальних засобів ($M \pm m$)

Експериментальна група, (n=15)	fCAL, $\mu\text{g/g}$
Контрольна група тварин (0,9% NaCl, n = 15)	67,7 \pm 5,7
Індометацин (0,6 мг/кг, n = 15)	473,9 \pm 9,1**
Ацетилсаліцилова кислота (0,6 мг/кг, n = 15)	125,8 \pm 6,2*
Мелоксикам (0,1 мг/кг, n = 15)	85 \pm 5,8*
Диклофенак (0,6 мг/кг, n = 15)	521,3 \pm 31,3**

Примітка. * – $p \leq 0,05$ по відношенню до контрольної групи тварин, ** – $p \leq 0,05$ по відношенню до групи тварин з тривалим призначенням мелоксикаму, n – кількість тварин.

Разом з цим, при застосуванні диклофенаку та індометацину, рівні fCAL відповідали вираженому запаленню тканин кишківника ($\geq 160 \mu\text{g/g}$, згідно рекомендаціям National Institutes of Health); ацетилсаліцилова кислота та мелоксикам сприяли менш вираженому ефекту, підвищуючи концентрацію fCAL до рівнів легкого запалення (80-160 $\mu\text{g/g}$, згідно рекомендаціям National Institutes of Health).

На нашу думку, концентрація фекального кальпротектину відображає направленість та вираженість патологічного процесу у тканині кишківника, яка викликана токсичною дією НПЛЗ, оскільки підвищений його рівень корелює зі значним дефектом слизової оболонки та схильності тканини кишківника до неоплазії та цілком збігається із силою токсичного впливу досліджуваних НПЛЗ відносно інших показників.

Резюме

Загальний результат проведеного комплексного дослідження, а саме аналіз вмісту HSP70, MMP8, греліну та фекального кальпротектину, дозволив зробити декілька проміжних висновків. Так, ацетилсаліцилова кислота, мелоксикам, та

особливо індометацин і диклофенак впливали на вміст HSP70, MMP8, підвищуючи їх концентрацію, що може розглядатися як HSP70/MMP8-опосередкована побічна дія НПЛЗ, пов'язана з можливою неоплазією тканин кишківника, а також дизрегуляцією клітинного циклу, оскільки відома роль як HSP70 так й MMP8 у руйнуванні екстрацелюлярного матриксу, ангиогенезі пухлини та інгібуванні апоптозу.

Крім того, встановлена здатність НПЛЗ впливати на рівень інтермедіатора APUD системи – греліну, як основного регулятора метаболічних шляхів ШКТ, у тому числі антиоксидантних ефектів. Ефекти НПЛЗ були різноспрямованими та залежали від встановлених токсичних ефектів НПЛЗ відносно антиоксидантної, тіол-дисульфідної систем та метаболізму пуринів.

Встановлено спектр динаміки концентрацій досліджуваних маркерів під дією НПЛЗ, що проявлялось їх впливом на рівень фекального кальпротектину, який водночас, може бути застосований як інтегральний показник пошкодження тканин кишківника. В залежності від сили побічної та токсичної дії НПЛЗ, рівень фекального кальпротектину був у межах легкого або вираженого запалення. Найбільш вираженими ефектами володіли індометацин та диклофенак, які проявляли також значні ефекти щодо маркерних продуктів оксидативного/нітрозуючого стресів, тіол-дисульфідної системи, а також HSP70 та MMP8.

Крім того, не зважаючи на відсутність значного впливу ацетилсаліцилової кислоти та мелоксикаму на показники загальної токсичності, стан антиоксидантно-прооксидантної системи та інших, нами було зафіксовано їх статистичний вплив на концентрацію фекального кальпротектину (хоча й у межах легкого запалення), що, на нашу думку, свідчить про наявність додаткових молекулярно/генетичних механізмів побічної та токсичної дії НПЛЗ.

Матеріали розділу відображені у 2 статтях та 2х тезах [143, 144, 145, 181].

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ НЕСТЕРОЇДНИХ ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ НА МЕТИЛЮВАННЯ ДНК, TL-4-РЕЦЕПТОР, КОНЦЕНТРАЦІЮ МОЛЕКУЛЯРНИХ РЕГУЛЯТОРІВ WNT ТА HEDGEHOG СИГНАЛІНГУ, ГЕНУ C-KIT ПРИ ЇХ ТРИВАЛОМУ ЗАСТОСУВАННІ

В розділі наведено результати проведених досліджень впливу тривалого введення нестероїдних протизапальних лікарських засобів на рівень повногеномного метилювання ДНК, інтенсифікації процесів її фрагментації, вплив на TL-4-рецептори, концентрацію молекулярних регуляторів Wnt, Hedgehog - сигналіngu та гену c-kit.

Для визначення можливого епігенетичного впливу, проведено кількісне визначення рівня фрагментації та метилювання ДНК із використанням рестриктази MspI та HpaII. Ступінь фрагментації ДНК виражали у відсотках, рівень метилювання ДНК у ядрах клітин крові виражено у відсотках. ELISA - методом досліджено наступні маркери: TLR4 рецептори, білок Wnt – сигналіngu – SMO (Smoothened, ELISA SEC891Ra); білок Hedgehog - сигналіngu – Shh (Sonic hedgehog protein, ELISA, RTEB1226; відповідний білок гену c-kit - Rat c-Kit (ELISA Kit - LS-F49274). ELISA дослідження проведено у плазмі крові щурів відповідних експериментальних груп.

Актуальність проведеного дослідження полягає в тому, що останнім часом спостерігається зростання напрямку наукових досліджень, спрямованих на вивчення молекулярних механізмів небажаних побічних ефектів у площині епігенетичних взаємодій.

Встановлено, що ксенобіотики, зокрема, лікарські засоби, можуть мати епігенетичний вплив на організм, тобто впливати на активність експресії певних генів. Особливо це актуально у людей з хронічними захворюваннями, які тривало приймають різноманітні лікарські засоби, що призводить, в свою чергу, до виникнення небажаних побічних ефектів від фармакотерапевтичних засобів. Наприклад, тривалий прийом нестероїдних протизапальних лікарських засобів

сприяє утворенню ерозій, виразок і онкологічних захворювань шлунка та кишківника.

З однієї сторони НПЛЗ, зокрема диклофенак, аспірин, індометацин, здатні обмежувати процеси неоплазії у ШКТ, однак, слід зазначити, що ці ефекти були зареєстровані переважно, дослідями *in vitro*, крім того, подібні ефекти були зареєстровані на тлі короткочасного впливу НПЛЗ та пов'язані з їх протизапальними властивостями [182, 183, 184].

Разом з цим, низкою досліджень був показаний можливий епігенетичний вплив окремих нестероїдних лікарських засобів та їх можливість виступати у ролі факторів-ризиків неопластичних процесів шлунку та кишківника [185].

Висловлюється припущення, що такі побічні ефекти це не тільки результат пошкодження слизової оболонки під впливом НПЛЗ, але і можливий вплив НПЛЗ на гени, які регулюють клітинний цикл, особливо при їх тривалому застосуванні [186, 187, 188].

5.1 Експериментальне дослідження тривалого впливу НПЛЗ на рівень метилювання ДНК та її фрагментації у щурів

Геномна інформація еукаріотів модулюється безліччю епігенетичних модифікацій, які відіграють, як пряму роль у встановленні профілів транскрипції, модуляції процесів реплікації та репарації ДНК, так і непрямий вплив на вищезгадані процеси через організацію архітектури ДНК усередині ядра клітини. В даний час, широко визнана роль епігенетичних модифікацій у регуляції тканинспецифічної експресії генів, геномного імпринтингу або інактивації Х-хромосоми. Крім того, ключова роль епігенетичних модифікацій, під час диференціювання та розвитку клітин, була підкреслена виявленням множини епігенетичних змін при низки патологічних станах. Особлива увага була зосереджена на вивченні епігенетичних змін при раку, що є предметом інтенсивних міждисциплінарних зусиль і впливає не лише на розуміння механізмів епігенетичного регулювання, але й на розробку нових методів

лікування раку [189].

Епігенетичні зміни можуть бути рушійною силою прогресування раку, на додаток до генних мутацій, разом з цим епігенетичні зміни більш динамічні та варіабельні. Крім того, відомо, що у злоякісних новоутвореннях відбуваються зміни у метилюванні ДНК, модифікації гістонів та глобальному перепрограмуванню епігенетичних міток [190].

Метилювання ДНК каталізується сімейством ДНК-метилтрансфераз (Dnmts), які переносять метильну групу від S-аденілметіоніну (SAM) до п'ятого вуглецю залишку цитозину з утворенням 5mC [191].

Останніми дослідженнями було встановлено, що хімічні сполуки, у т.ч. лікарські засоби, можуть мати епігенетичний вплив, тобто впливати на активність експресії певних генів. Особливу загрозу це представляю для осіб із хронічними захворюваннями, тому що вони вимушені застосовувати лікарські засоби тривало. Відомо, що тривалий прийом нестероїдних протизапальних лікарських засобів приводить до утворення ерозій, виразок і онкологічних захворювань шлунка та кишківника. Висловлюється припущення, що побічні ефекти є не тільки результатом пошкодження слизової оболонки під впливом НПЛЗ, але і можливим впливом НПЛЗ на гени, які регулюють клітинний цикл, особливо при їх тривалому застосуванні [186, 192, 193].

Проведеними нами молекулярними дослідженнями, було встановлено, що тривале введення індометацину, диклофенаку, ацетилсаліцилової кислоти та мелоксикаму призводило до статистично вірогідного збільшення повногеномного метилювання ДНК та до інтенсифікації процесів її фрагментації (табл. 5.1).

Важливо зазначити, що за ступенем епігенетичного впливу, дія досліджуваних НПЛЗ була різного ступеня вираженості. Так, найбільший вплив на кількість MspI/HpaII чинило тривале призначення індометацину (збільшення на 99 % по відношенню до інтактної групи тварин), далі – ацетилсаліцилова кислота та мелоксикам (відповідно на 56% та 41%). Аналогічна динаміка НПЛЗ була встановлена також при дослідженні ступеню загальної фрагментації ДНК.

Таблиця 5.1 – Повногеномне метилювання ДНК (MspI/HpaII) та її фрагментація у лімфоцитах крові щурів на тлі тривалого введення НПЛЗ ($M \pm m$)

Група тварин	MspI/HpaII	Фрагментація ДНК
Контрольна група	5,1 \pm 0,61	0,2 \pm 0,05
Індометацин (0,6 мг/кг)	15,7 \pm 1,24*	1,1 \pm 0,06*
Ацетилсаліцилова кислота (0,6 мг/кг)	11,4 \pm 0,87*	0,8 \pm 0,02*
Мелоксикам (0,1 мг /кг)	8,6 \pm 0,72*	0,5 \pm 0,03*
Диклофенак (0,6 мг/кг)	16,2 \pm 1,14*	1,2 \pm 0,07*

Примітка. * – $p < 0,05$ по відношенню до контрольної групи тварин.

Встановлена нами здатність НПЛЗ впливати на процеси метилювання ДНК, деякою мірою підтверджує припущення низки дослідників, щодо наявності у НПЛЗ епігенетичного механізму їх небажаних побічних ефектів.

Метилювання ДНК регулюється сімейством ферментів ДНК-метилтрансфераз (DNMTs), з яких DNMT1 метилює ДНК під час реплікації, DNMT3A і DNMT3B виконують метилювання *de novo*, а DNMT3L, у свою чергу, відповідає за зв'язування перерахованих метилтрансфераз з донором метильної групи- S-аденозил-L-метіоніном. Існує 2 основні механізми епігенетичної регуляції транскрипції за допомогою метилювання ДНК: прямий та опосередкований. Прямий механізм дії ґрунтується на стеричній перешкоді метильних груп взаємодії ДНК з транскрипційними факторами. У разі опосередкованого механізму метильовані області взаємодіють з метилзв'язуючими білками (methylbinding proteins, MBPs) MeCP-1 та MeCP-2, які приєднуються до ДНК. MeCP-1 стерично блокує зв'язування ДНК із транскрипційним апаратом, що веде до репресії транскрипції. MeCP-2, у свою чергу, рекрутує гістонові деацетилази (histone deacetylases, HDACs) спільно з транскрипційними корепресорами, що призводить до ущільнення структури

хроматину та репресії транскрипції, що призводить до фрагментації ДНК [194, 195, 196].

Вищеописані молекулярні процеси призводять до порушення експресійної/білоксинтетичної функції генів, що може призвести до геномної нестабільності, а також порушення процесів проліферації та диференціювання клітин.

Низкою досліджень показано, що НПЛЗ здатні викликати онкологічні захворювання шлунково-кишкового тракту при їх тривалому застосуванні. Був встановлений епігенетичний вплив НПЛЗ на гени, що регулюють клітинний цикл шлунка (CDH1, MHL1), а також кишківника (SEPT9, APC). Відомо що, ген SEPT9 кодує синтез білка septin-9. Метилювання ДНК цього гена припиняє його активну роботу і «вимикає» синтез білка-супресора ракового зростання. Пошкодження експресії гена SEPT9 асоційоване з розвитком колоректального раку (КРР) [197, 198, 199]. Наявність в крові неактивного гена-супресора ракової пухлини свідчить про процеси розвитку пухлини в кишківнику, відображає такі події як проліферація клітин і ангиогенезу в пухлині [200]. Крім того, встановлена роль метильованої ДНК у запуску експресії та синтезу каскаду білків Wnt – Hedgehog – сигналіngu.

Таким чином, проведеними нами експериментальними дослідженнями була встановлена здатність НПЛЗ при їх тривалому введенні збільшувати повногеномне метилювання ДНК та інтенсифікувати процеси їх фрагментації. Найбільш вираженими ефектами володів індометацин (збільшення MspI/HpaII на 99 %; фрагментації ДНК – на 90% по відношенню до інтакту).

5.2 Експериментальне дослідження при тривалому введенні НПЛЗ на експресію TL-4-рецепторів

На тлі довготривалого введення НПЛЗ експериментальним групам щурів змінювалась експресія TL4 – рецепторів у тканинах кишківника. Значення всіх НПЛЗ достовірно перевищували показники контрольної групи тварин, а

ацетилсаліцилова кислота, диклофенак та індометацин – відповідні показники мелоксикаму (табл. 5.2).

Таблиця 5.2 – Вплив тривалого введення НПЛЗ на експресію TLR4 рецепторів, в кишківнику експериментальних щурів ($M \pm m$)

Групи тварин, (n=15)	TLR4 рецептори, ng/ml
Контрольна група	0,45±0,12
Мелоксикам (0,1 мг /кг)	0,69±0,2*
Ацетилсаліцилова кислота (0,6 мг/кг)	1,3±0,4**
Диклофенак (0,6 мг/кг)	2,3±0,5**
Індометацин (0,6 мг/кг)	1,9±0,3**

Примітка. * – $p \leq 0,05$ по відношенню до контрольної групи тварин, ** – $p \leq 0,05$ по відношенню до групи тварин з тривалим призначенням мелоксикаму, n – кількість тварин.

Відомо, що при застосування НПЛЗ, відбувається блокада всіх ізоформ циклооксигенази – 1 та 2. Блокада ЦОГ-1 призводить відповідно до пригнічення синтезу так званого гастропротективного простагландину E2, в наслідок чого, відбувається гальмування ангіогенезу, порушення репарації епітелію та індукція синтезу прозапальних медіаторів у тканинах кишківника. Згідно низки літературних джерел, подібні ефекти можуть розвиватись, як при блокаді обох ізоформ ЦОГ, так і при селективному інгібуванні ЦОГ 2, що пов'язано з перемиканням метаболізму арахідонової кислоти з циклооксигеназного на 5-ліпооксигеназний з послідуочим накопиченням лейкотрієнів та ініціації вільнорадикального окиснення [137, 201, 202, 203]. Лейкотрієни та продукти пероксидації, в свою чергу, активують TLR4, які ініціюють систему запальної реакції та активацію нейтрофілів та подальше пошкодження стінки кишківника. За рахунок цих патобіохімічних процесів, відбувається гіперекспресія індукцибельної ізоформи синтази оксиду азоту, яка вже сприяє запуску нітрозуючого стресу з відповідним накопиченням цито- та геномотоксичних сполук, зокрема нітротирозину, пероксинітриту, цитотоксичної NO-групи та

накопичення вільних радикалів. Дослідженнями *in vitro* показано, що активація TLR4 рецепторів, призводить до активації рецептор-опосередкованої стимуляції NADPH-оксидази 2 (Nox2), значної гіперпродукції супероксидрадикалу, та до ще більшої активації вільнорадикального окислення [204, 205, 206].

Також показано, що неопластичні процеси у ШКТ тісно пов'язані з хронічним запаленням, під час якого відбуваються різні зміни в осередках запалення, такі як інфільтрація імунних клітин, продукція прозапальних цитокінів і взаємодія між імунними клітинами та клітинами тканин. Ці зміни викликають динамічне та складне мікросередовище, сприятливе для росту пухлини, інвазії та метастазування. Toll-подібний рецептор 4 є першим ідентифікованим членом сімейства Toll-подібних рецепторів, який може розпізнавати молекулярні патерни, пов'язані з пошкодженням. TLR4 здатен експресуватись не тільки на імунних клітинах, а й на пухлинних клітинах. Накопичення доказів показало, що активація TLR4 в мікрооточенні пухлини може не тільки підвищити протипухлинний імунітет, але також призвести до імунного нагляду та прогресування пухлини [207].

Подібний спектр ефектів TLR4 забезпечує їх участь як у активації оксидативного/нітрозуючого стресів так й у процесах неоплазії. Здатність НПЛЗ впливати на TLR4 може розглядатися як один з можливих механізмів реалізації їх побічних ефектів.

Наші дослідження також деякою мірою підтверджують вищевикладене. Так, як видно з табл. 5.2, НПЛЗ, при їх тривалому введенні експериментальним групам щурів здатні впливати на експресію TLR4 – рецепторів у тканинах кишківника. Значення всіх НПЛЗ достовірно перевищували показники контрольної групи тварин, а ацетилсаліцилова кислота (збільшення в 1,8 рази по відношенню до контролю), диклофенак (збільшення в 3,3 разів) та індометацин (збільшення в 2,7 рази) – відповідні показники мелоксикаму.

Варто зазначити, що експресія TLR4 мала тісний кореляційний зразок із маркерами оксидативного стресу, а також маркером пошкодження слизової оболонки кишківника. Так, нами була встановлена висока позитивна кореляція

концентрації фекального кальпротектину у тварин на тлі призначення ацетилсаліцилової кислоти, індометацину, та диклофенаку з експресією TLR4 (відповідно $r = 0,7$, $p < 0,0001$; $r = 0,91$, $p < 0,0001$; $r = 0,9$, $p < 0,0001$), з концентрацією 8-OHdG (відповідно $r = 0,8$, $p < 0,0001$; $r = 0,85$, $p < 0,0001$; $r = 0,84$, $p < 0,0001$) та нітротирозином (відповідно $r = 0,88$, $p < 0,0001$; $r = 0,75$, $p < 0,0001$; $r = 0,89$, $p < 0,0001$). Разом з цим, мелоксикам не сприяв розвитку значного ефекту на досліджувані показники, що деякою мірою, може бути пов'язано з його селективністю по відношенню до ЦОГ2 ізоформи. Слід зауважити, що довготривале введення мелоксикаму мало мінімальний вплив на рівень повногеномного метилювання ДНК та її фрагментації у кишківнику.

Таким чином, нашими дослідженнями була показана здатність НПЛЗ, особливо індометацину та диклофенаку ініціювати у тканинах кишківника оксидативний стрес та гіперекспресію TLR4, що у подальшому може привести до серйозних небажаних побічних ефектів, зокрема, до пошкодження слизової оболонки кишківника, а також, в окремих випадках, до запуску онкогенезу.

5.3 Вплив НПЛЗ на Hedgehog та Wnt сигналінги, білку гена c-kit при їх тривалому застосуванні

Відомо, що сигнальні шляхи Wnt і Hedgehog (Hh) керують ростом і формуванням патернів під час ембріонального розвитку. Останні дані також вказують на те, що ці шляхи, в постембріональному регулюванні кількості стовбурових клітин в епітелії, таких тканин, як шкіра та кишківник, які постійно оновлюються. Патологічну роль шляхів Wnt і Hh виявили дослідження, які показали високу частоту специфічних ракових захворювань людини, пов'язаних з мутаціями, які конститутивно активують транскрипційну відповідь цих шляхів.

Роль передачі сигналів Wnt, в канцерогенезі, найбільш докладно описана для колоректального раку, але аберантна передача сигналів Wnt спостерігається при багатьох інших онкологічних захворюваннях [208]. Також, багатьма дослідниками доведено, що передача сигналів Hh може брати участь на різних стадіях

канцерогенезу у різних пухлинах. Наприклад, при раку підшлункової залози та стравоходу, активація цього сигнального шляху виявляється на ранніх стадіях пухлини, а також у метастатичних пухлинах [209]. В інших пухлинах, таких як рак шлунка та рак простати, активація сигнального шляху Hh пов'язана з інвазією в тканини та підвищеним метастатичним потенціалом. Відповідно до цих даних, інгібування сигнального шляху Hh знижує проліферацію пухлинних клітин при раку шлунка [210].

Відомо, що епігенетична модифікація ДНК впливає на активність експресії певних генів на кількох рівнях, що призводить до зміни фенотипу клітини. В організмі, існують молекулярно-біохімічні системи, спрямовані на інактивацію ксенобіотиків, у тому числі й лікарських засобів, проте відомо, що лікарські препарати змінюють не лише молекулярні реакції, фізіологічні функції, а й здатні моделювати генну експресію. Давно відомо, що генні мутації відіграють важливу роль у формуванні онкогенезу. Однак лише недавно було визнано, що епігенетичні зміни роблять значний внесок у розвиток онкологічних захворювань. За останні роки спостерігається бурхливе зростання епігенетичних досліджень, пов'язаних з розвитком нових молекулярних і цитологічних підходів. Встановлено, що існують основні епігенетичні механізми, або, як часто кажуть епігенетичні маркери. В даний час найбільш вивчено ДНК-метилування. Метилування ДНК каталізується сімейством ДНК-метилтрансфераз (Dnmts), які переносять метильну групу з S-аденілметіоніну (SAM) на п'ятий вуглець залишку цитозину з утворенням 5mC. Dnmt3a та Dnmt3b можуть встановлювати новий патерн метилування немодифікованої ДНК і тому відомі як Dnmt de novo. З іншого боку, Dnmt1 функціонує під час реплікації ДНК, копіюючи патерн метилування ДНК з батьківського ланцюга ДНК на знову синтезований дочірній ланцюг. Процеси гіперметилування ДНК, розглядаються як провідний фактор ініціювання онкогенезу. Встановлений вплив оксидативного стресу, гіперметилування ДНК на експресію та синтез білків Wnt, Hedgehog - сигналіngu та гену c-kit [207, 208, 209, 210].

На сьогодні, здатність лікарських засобів епігенетично впливати на

експресію генів, вважають, як один з вірогідних механізмів небажаних побічних реакцій.

Є дані, що тривалий прийом нестероїдних протизапальних лікарських засобів приводить до утворення ерозій, виразок і онкологічних захворювань шлунку та кишківника. 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, особливо при їх тривалому застосуванні.

З метою вивчення впливу дослідних НПЛЗ на Wnt, Hedgehog - сигналінги нами досліджувались відповідний білок Wnt – сигналінгу – SMO (Smoothed, ELISA SEC891Ra); білок Hedgehog - сигналінгу – Shh (Sonic hedgehog protein, ELISA, RTEB1226). Крім того, був досліджений білок протоонкогену c-kit, який володіє сигнальними функціями та приймає участь у клітинних процесах – ріст, поділ, міграція, та вживаність.

Встановлена нами здатність НПЛЗ впливати на процеси метилювання ДНК, деякою мірою підтверджує припущення низки дослідників, щодо наявності у НПЛЗ епігенетичного механізму їх небажаних побічних ефектів та можливості ініціювати онкогенез. Дійсно, процеси гіперметилювання ДНК та її фрагментації, відбувались на тлі приросту у тканинах кишківника білків Wnt та Hedgehog - сигналінгу – відповідно SMO та Shh (табл. 5.3).

Таблиця 5.3 – Концентрація білків SMO, Shh, c-kit у плазмі крові щурів на тлі тривалого введення НПЛЗ

Групи тварин	SMO, pg/ml	Shh, pg/ml	c-kit, pg/ml
1	2	3	4
Контрольна група	166,5±14,2	68,86±10,1	4,75±1,1
Індометацин (0,6 мг/кг)	306,04±15,7**	191,21±17,9**	10,74±2,8**

Продовження таблиці 5.3

1	2	3	4
Ацетилсаліцилова кислота (0,6 мг/кг)	212,56±10,4*	112,51±10,7*	7,65±1,9*
Мелоксикам (0,1 мг/кг)	192,36±15,6*	91,9±7,3*	5,17±1,8
Диклофенак (0,6 мг/кг)	349,59±20,2**	205,85±11,6**	13,8±2,7**

Примітка. * – $p < 0,05$ по відношенню до контрольної групи тварин, ** – $p \leq 0,05$ по відношенню до групи тварин з тривалим призначенням мелоксикаму.

Як видно з табл. 5.3, найбільш вираженим ефектом володіли індометацин та диклофенак, збільшуючи вміст SMO та Shh-білки відповідно в 1,8; 2,77 рази та в 2; 2,9 рази. Подібна динаміка нами була встановлена при вивченні концентрації білку-проонкогену - c-kit. Ацетилсаліцилова кислота та мелоксикам менш виражено впливали на білки Wnt та Hedgehog сигналіngu (збільшення відповідно в 1,3; 1,6 рази та в 1,2; 1,3 рази). Разом з цим, мелоксикам, не мав статистично достовірного впливу на білок гену c-kit.

Вищеописані молекулярні процеси призводять до порушення експресійної/білоксинтетичної функції генів, що може призвести до геномної нестабільності, а також порушення процесів проліферації та диференціювання клітин. Низкою досліджень показано, що НПЛЗ здатні викликати онкологічні захворювання шлунково-кишкового тракту при їх тривалому застосуванні [15, 76, 211].

На нашу думку, отримані нами данні досить цікаві з огляду на можливі проонкогенні ефекти НПЛЗ. На сьогодні, проведено багато експериментальних досліджень, котрими показані протиракові ефекти НПЛЗ, разом з цим існують багаточисельні рандомізовані епідеміологічні дослідження, котрими встановлена здатність НПЛЗ, навпаки збільшувати ризик виникнення раку (меланоми, раку простати, окремих видів раку шлунка та кишківника).

Таким чином, проведеними нами експериментальними дослідженнями була встановлена здатність НПЛЗ, при їх тривалому введенні, збільшувати

повногеномне метилювання ДНК та інтенсифікувати процеси їх фрагментації, а також підвищувати концентрацію у тканинах кишківника білків Wnt та Hedgehog - сигналінгу – відповідно SMO та Shh, а також білку-проонкогену - c-kit. Найбільш вираженими ефектами володіли неселективні інгібітори ЦОГ1, 2 - індометацин та диклофенак.

Враховуючи отримані нами результати, цікавим є встановлення математичних моделей, зв'язків та кореляційної матриці між досліджуваними показниками, такими як метилювання ДНК, TL4-рецептором, білком SMO (ключовим у Wnt-сигналінгу), білку Hedgehog-сигналінгу SHH та білку c-kit.

У нашому дослідженні ми провели аналіз взаємозв'язку між TL4-рецептором та рівнем метилювання ДНК (MeDNA) за допомогою регресійної моделі. Результати моделі вказують на вагомий вплив TL4-рецептора на рівень метилювання ДНК (рис. 5.1).

Коефіцієнт нахилу (бета) рівний 0,581, що вказує на напрямок та силу залежності між TL4-рецептором та MeDNA. Це означає, що з кожним збільшенням рівня TL4-рецептора на одиницю, рівень метилювання ДНК у середньому збільшується на 0,581 одиниць. Значення F-статистики дорівнює 52,697, що вказує на статистичну значущість моделі в цілому. Високий F-критерій свідчить про те, що регресійна модель є ефективною та адекватною для пояснення взаємозв'язку між змінними.

Математичний аналіз даних показав, що збільшення рівня TL4-рецептора має статистично значущий вплив, призводячи до збільшення рівня метилювання ДНК в середньому на 2,226 одиниць. Це висуває гіпотезу про те, що TL4-рецептор може певну роль у регулюванні процесів метилювання ДНК.

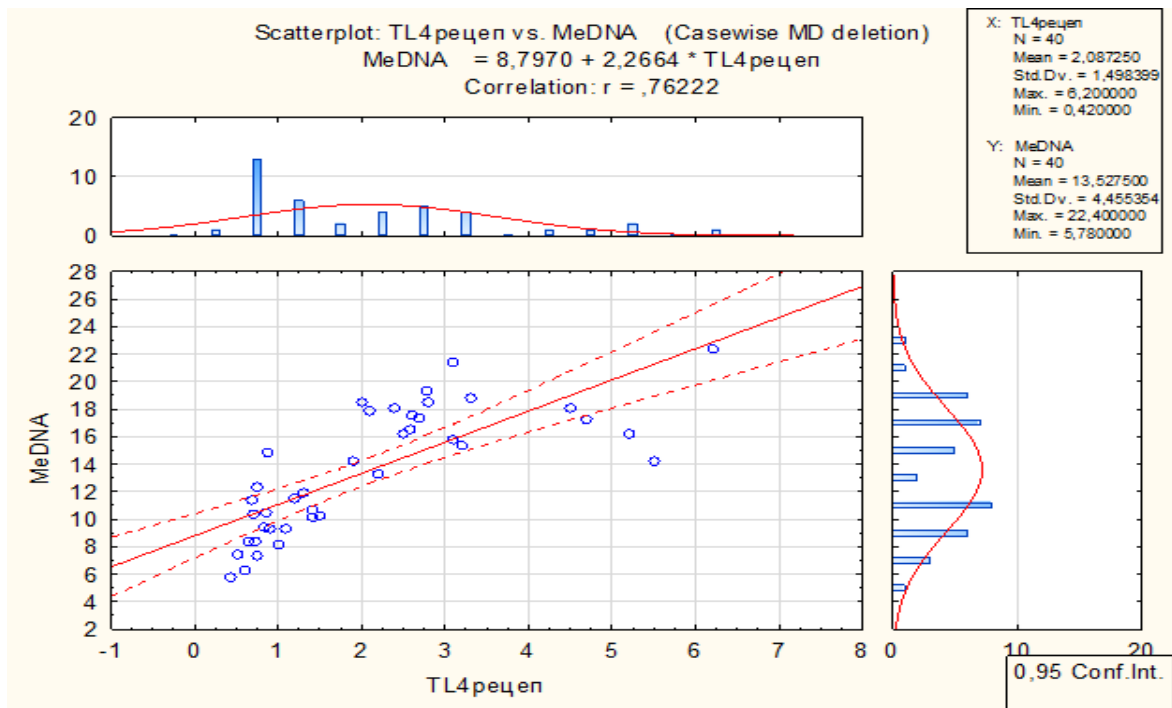


Рисунок 5.1 – Точкова діаграма взаємозв'язку двох змінних –MeDNA та TL4 рецептора.

Також нами був проведений аналіз взаємозв'язку між білком SMO, ключовим у Wnt-сигналінгу та рівнем метилювання ДНК (MeDNA) за допомогою регресійної моделі. Результати вказують на суттєвий позитивний вплив SMO на рівень метилювання ДНК (рис. 5.2).

Згідно з отриманими результатами, коефіцієнт нахилу (бета) становить 0,685, вказуючи на наявність позитивного зв'язку між SMO та MeDNA. Значення F-статистики, яке складає 82,809, підтверджує високу статистичну значущість моделі, що свідчить про її ефективність у поясненні взаємозв'язку між досліджуваними змінними.

З іншого боку, в контексті наших досліджень, слід зауважити, що існує негативний вплив НПЛЗ, який супроводжується підвищенням як MeDNA, так і рівня SMO. Це може свідчити про потенційні негативні наслідки впливу НПЛЗ на регуляцію Wnt-сигналінгу та метилювання ДНК, що призводить до дисбалансу в цих важливих клітинних процесах.

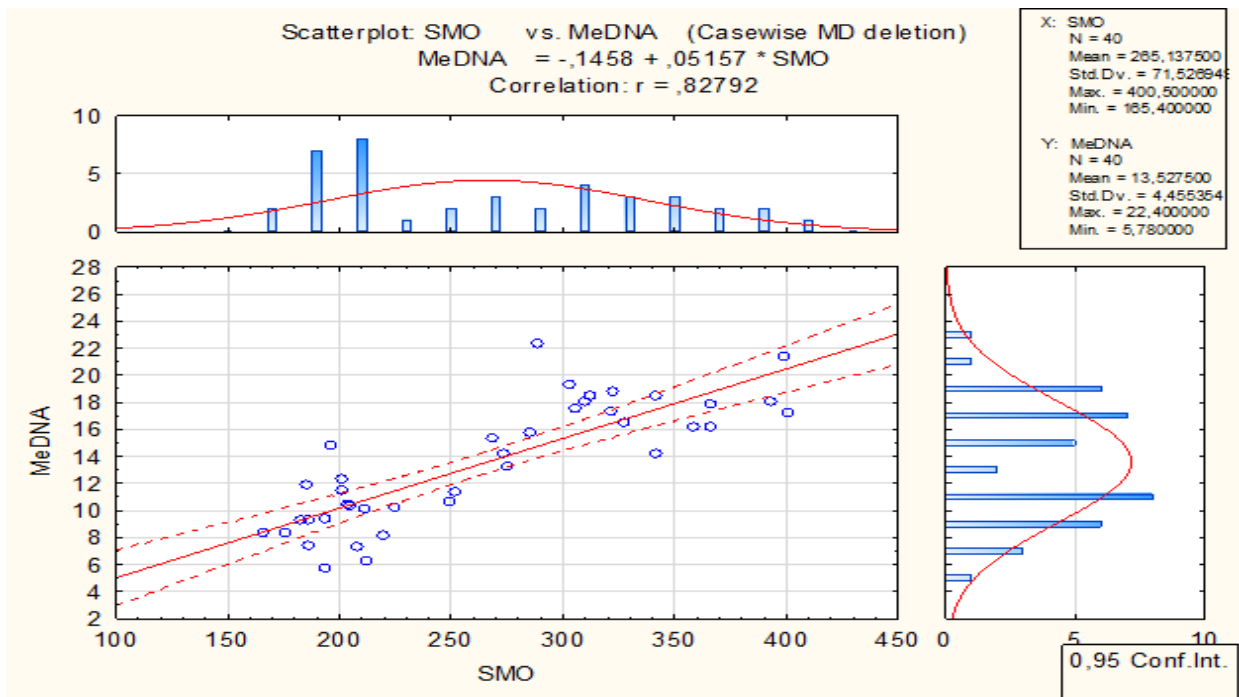


Рисунок 5.2 – Точкова діаграма взаємозв'язку двох змінних – білку SMO та MeDNA.

Аналіз взаємозв'язку білку Hedgehog-сигналіngu Shh та рівня метильованої ДНК (MeDNA) за допомогою регресійної моделі, показав переконливий позитивний вплив Shh на метилювання ДНК (рис. 5.3).

Так, коефіцієнт нахилу (бета) моделі дорівнює 0,964, що свідчить про наявність позитивного зв'язку між Shh та MeDNA. Значення F-статистики високе — 1049,86, що підтверджує статистичну значущість моделі та її ефективність у поясненні відносин між досліджуваними факторами.

Отримані дані підтверджують негативний ефект НПЛЗ, виявлений у підвищенні рівнів як MeDNA так і білку Shh. Це може вказувати на потенційні негативні наслідки використання НПЛЗ у регулюванні Hedgehog-сигналіngu та метилювання ДНК, створюючи можливий дисбаланс у регуляцію клітинного сигналіngu.

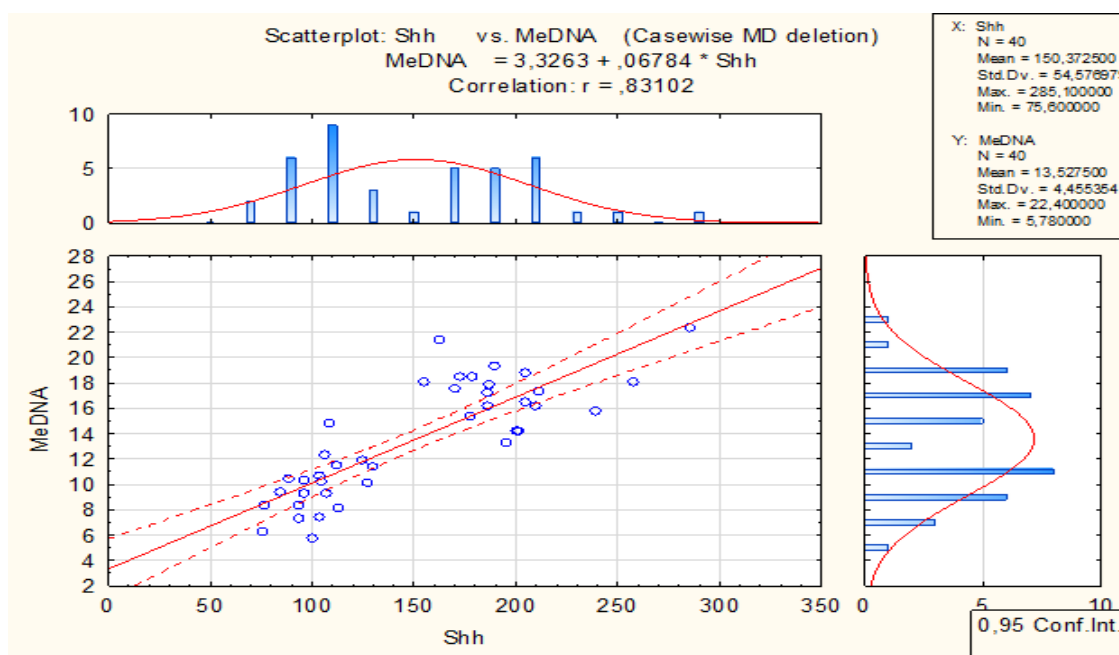


Рисунок 5.3 – Точкова діаграма взаємозв'язку двох змінних –білку Shh та MeDNA.

Аналіз впливу білка c-kit гену на рівень метилювання ДНК (MeDNA) за допомогою регресійної моделі також показав значущий позитивний вплив c-kit на ці процеси (рис. 5.4).

Коефіцієнт нахилу (бета) в моделі становить 0,945, що свідчить про наявність суттєвого позитивного кореляційного зв'язку між c-kit та MeDNA. Значення F-статистики дорівнює 669,363, вказуючи на високу статистичну значущість моделі та її ефективність у поясненні взаємозв'язку між досліджуваними змінними.

Як показали наші дослідження, використання всіх досліджуваних НПЛЗ призводило до негативного впливу, виявленого у збільшенні як MeDNA, так і рівня білка c-kit. Це може сигналізувати про потенційні негативні наслідки використання НПЛЗ у регулюванні взаємодії між c-kit геном та метилюванням ДНК. Враховуючи роль білку c-kit, а саме його провідну роль у регуляції різноманітних клітинних процесів, включаючи ріст та диференціацію, і виявлення його взаємодії з метилюванням ДНК, можна зробити висновок про можливу його ключову роль у регуляції генетичної експресії.

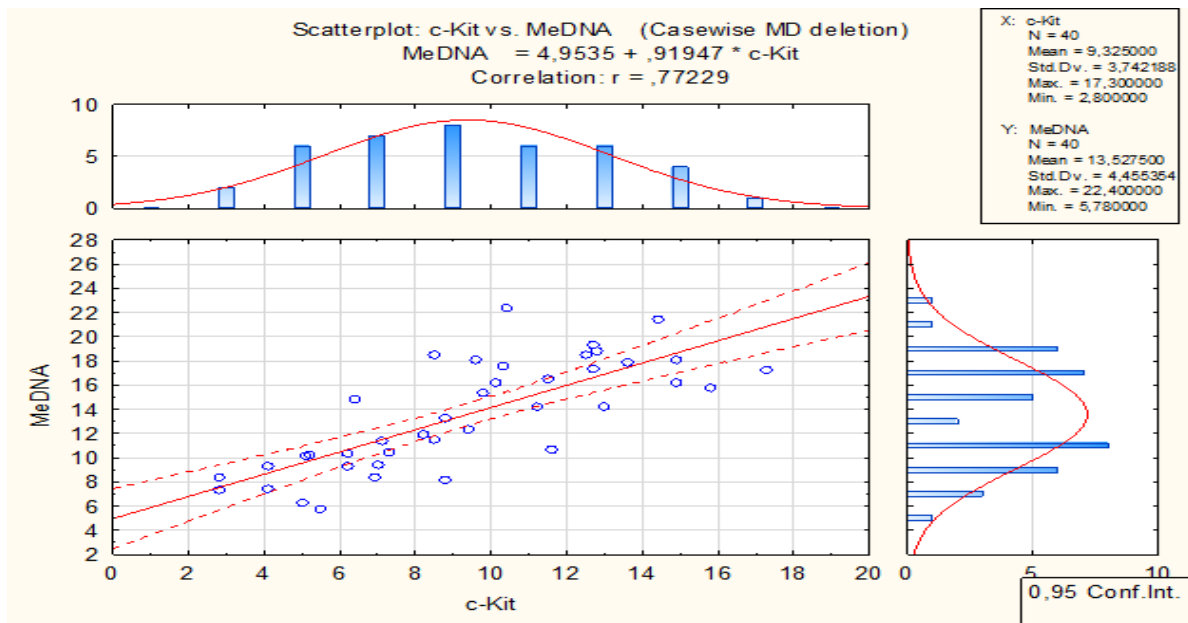


Рисунок 5.4 – Точкова діаграма взаємозв'язку двох змінних –білку гену c-kit та MeDNA.

Також важливо зазначити, що нами був отриманий високий кореляційний зв'язок між ступенем метилювання ДНК та її фрагментації. Рівень кореляції Спірмена склав 0,610. На нашу думку, обидва ці процеси, доцільно розглядати як взаємопов'язані, та які є послідовними компонентами епігенетичного впливу дослідних НПЛЗ (рис. 5.5).

Таким чином, математичний аналіз даних щодо рівня метилювання ДНК, її фрагментації, експресії TL4-рецепторів та концентрації білків Wnt- та Hedgehog-сигналінгів продемонстрував їх сильний кореляційний зв'язок між собою.

Отримані результати дозволяють зробити висновок про тісний взаємозв'язок між процесами метилювання ДНК, фрагментації ДНК та активацією TL4-рецепторів. Також виявлено значущий кореляційний зв'язок між експресією білків Wnt- та Hedgehog-сигналінгів, що вказує на можливий взаємний вплив цих сигнальних шляхів в клітинних процесах.

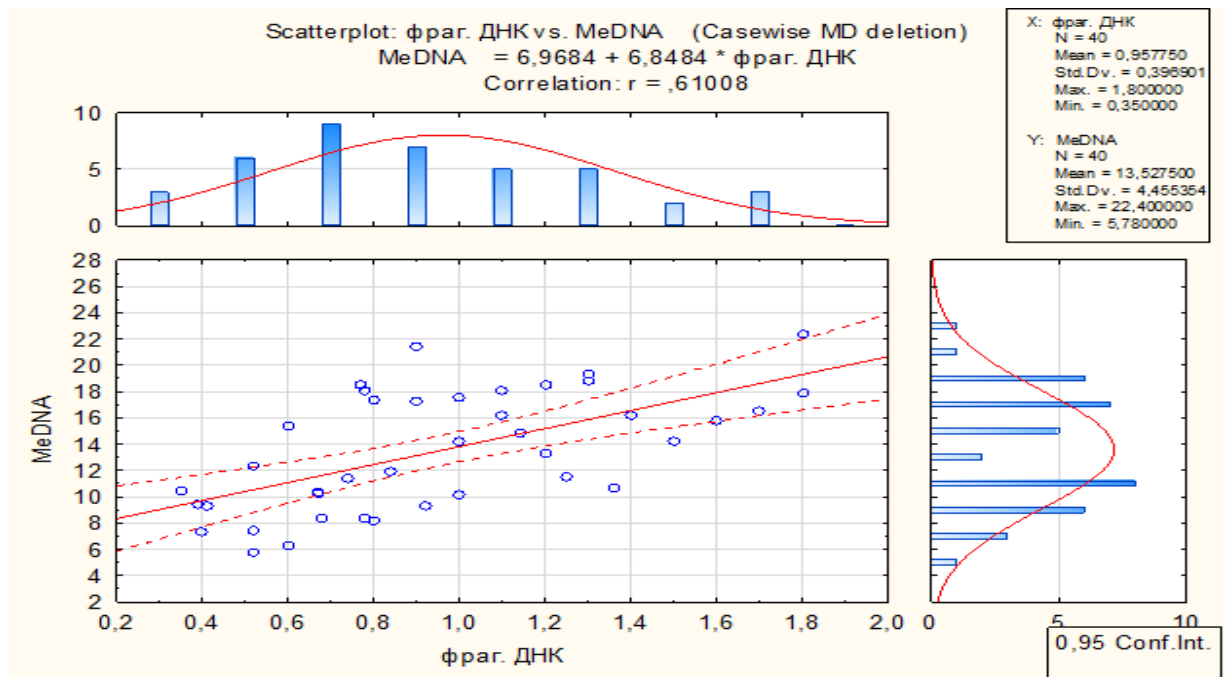


Рисунок 5.5 – Точкова діаграма взаємозв'язку двох змінних – рівня метилювання ДНК та її фрагментації.

Отримані результати не лише розкривають важливі взаємозв'язки між різними молекулярно-генетичними показниками, але й надають базу для подальших досліджень щодо можливих механізмів впливу нестероїдних протизапальних лікарських засобів на регуляцію клітинних процесів та сигнальних шляхів в клітинах.

Резюме

Проведений аналіз результатів дослідження впливу тривалого введення НПЛЗ на рівень повногеномного метилювання ДНК, інтенсифікації процесів її фрагментації, вплив на TL-4-рецептори, синтез білків Wnt, Hedgehog - сигналіngu та гену c-kit, які були отримані за допомогою комплексу досліджень, дозволив дійти деяких проміжних висновків.

Тривале введення індометацину, диклофенаку, ацетилсаліцилової кислоти та мелоксикаму призводило до статистично вірогідного збільшення повногеномного метилювання ДНК та підвищення активності процесів її фрагментації. Важливо підкреслити, що подібний епігенетичний вплив дослідних НПЛЗ був різного

ступеню вираженості. Найсильніший ефект, на кількість MspI/HpaII, був зареєстрований при тривалому застосуванні індометацину (збільшення на 99% у порівнянні з інтактною групою тварин), за ним слідували ацетилсаліцилова кислота та мелоксикам (відповідно на 56% та 41%). Аналогічні тенденції виявлені щодо впливу НПЛЗ на фрагментацію ДНК.

Також було виявлено, що НПЛЗ, особливо індометацин і диклофенак, можуть на тлі розвитку оксидативного стресу, збільшувати експресію TLR4 в тканинах кишківника. Це може спричинити серйозні небажані ефекти, включаючи ушкодження слизової оболонки кишківника, а також, у окремих випадках, ініціювати процеси онкогенезу.

Наше дослідження здатності НПЛЗ впливати на процеси метилювання ДНК підтверджує наявність у них епігенетичного механізму, який може викликати небажані побічні ефекти та можливо, сприяти розвитку онкогенезу. Саме процеси гіперметилювання ДНК та фрагментації відбувалися на тлі зростання рівня білків Wnt та Hedgehog - сигнальних шляхів, відповідно SMO та Shh, у тканинах кишківника. Індометацин та диклофенак проявили найвиразніший ефект, збільшуючи вміст SMO та Shh-білків відповідно в 1,8; 2,77 рази та в 2; 2,9 рази. Аналогічні тенденції були виявлені під час аналізу концентрації білка-проонкогену - c-kit. Ацетилсаліцилова кислота та мелоксикам менш впливали на білки Wnt та Hedgehog сигнальних шляхів (збільшення в 1,3; 1,6 рази та в 1,2; 1,3 рази відповідно). Також важливо відзначити, що мелоксикам не мав статистично значущого впливу на білок гену c-kit.

Вищезгадані молекулярні процеси можуть спричинити порушення експресії та синтезу білків генів, що може призвести до нестабільності геному та вплинути на нормальний хід процесів проліферації та диференціації клітин.

Ураховуючи отримані результати, цікавим є встановлення математичних моделей, які описують рівень метилювання ДНК, її фрагментацію, експресію TLR4-рецепторів та концентрацію білків Wnt- та Hedgehog-сигналінгів, оскільки було продемонстровано їх міцний взаємозв'язок між собою.

За отриманими даними можна зробити висновок про тісний зв'язок між

процесами метилювання ДНК, фрагментації ДНК та активацією TL4-рецепторів. Також було виявлено значущий кореляційний зв'язок між експресією білків Wnt- та Hedgehog-сигналінгів, що вказує на можливу взаємодію цих сигнальних шляхів у клітинних процесах.

Матеріали розділу відображені в 2 статтях та 2 тезах [143, 212, 213, 214].

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Застосування нестероїдних протизапальних лікарських засобів, в лікуванні патологічних станів пацієнтів, відоме з позаминого століття. НПЛЗ – це досить велика група хімічних речовин, які використовують, в якості протизапальних, жарознижуючих, анальгізуючих, антиагрегатних препаратів при різних патологічних станах організму людини. НПЛЗ на сьогодні - це лікарські засоби різної хімічної будови з плейотропною дією, що обумовлює також, великий перелік їх небажаних побічних ефектів, різних за своїм механізмом дії [215, 216, 217].

НПЛЗ є одними з найбільш популярних безрецептурних препаратів у всьому світі. Фармацевтична промисловість виробляє значний асортимент лікарських форм з нестероїдними протизапальними активними фармацевтичними інгредієнтами у вигляді пероральних, парентеральних, ректальних, місцевих м'яких лікарських засобів, для забезпечення особливих потреб пацієнтів. Різноманіття лікарських форм дозволяє транспортувати активні діючі сполуки до різних органів та систем організму, а також ефективно впливати на швидкість терапевтичного ефекту. Проте, необхідно зазначити, що у багатьох країнах наявна велика кількість НПЛЗ (диклофенак натрію, ібупрофен, парацетамол, ацетилсаліцилова кислота та інші), які пацієнти можуть безконтрольно придбати в аптечній мережі або в звичайному магазині. Це, в свою чергу, збільшує нераціональний та неконтрольований прийом препаратів, та призводить до виникнення широкого спектру побічних реакцій [218].

Незважаючи на позитивні терапевтичні ефекти від застосування НПЛЗ, на сьогодні, встановлені непоодинокі прояви побічних ефектів на різні системи та органи (рис. 6.1).

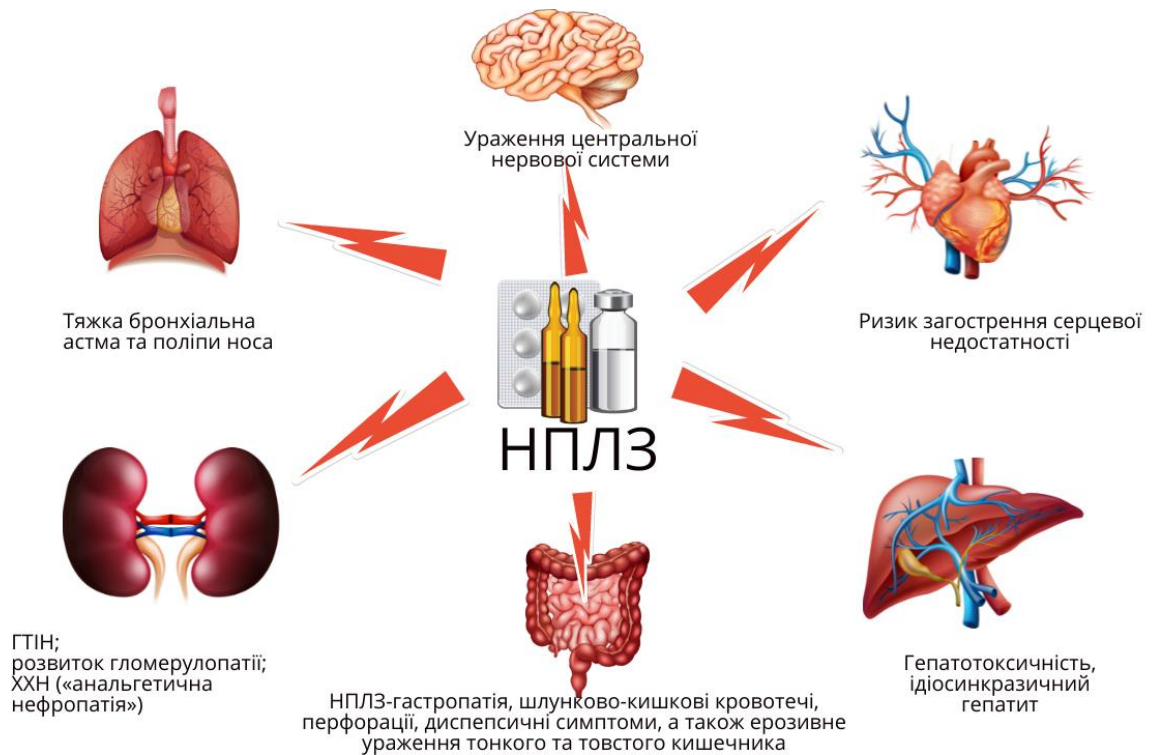


Рисунок 6.1 – Напрямки побічних ефектів НПЛЗ.

Крім того, в окремих випадках, НПЛЗ можуть виступати у якості цитотоксичних сполук, викликаючи активацію мітохондріального окислювального стресу, який характеризується прискоренням окислювально-відновних реакцій, порушенням клітинного окислювально-відновного гомеостазу, що внаслідок, призводить до виникнення енергетичного стресу, тяжкого пошкодження мітохондрій, зупинку клітинної проліферації та можливої загибелі клітин [219, 220, 221].

На першому етапі нашого експерименту були проведені токсикологічні та біохімічні дослідження. Представлені результати профілю токсичності НПЛЗ та впливу їх тривалого введення на рівень показників оксидативного та нітрозуючого стресу, інтермедіаторів системи тіол-дисульфідів та процесів обміну пуринів, а також концентрацію сечової кислоти у тканинах кишківника.

Проведення комплексного дослідження біохімічних процесів у тканинах кишківника, які виникають при застосуванні дослідних НПЛЗ, надає можливість

дослідити складні молекулярні механізми порушень обміну речовин та сигнальних шляхів. Також це допомагає зрозуміти, як ці процеси можуть сприяти розвитку небажаних побічних реакцій НПЛЗ у шлунково-кишковому тракті.

Був встановлений вплив НПЛЗ, при їх тривалому введенні, на показники токсичності. Аналіз отриманих даних про зміну маси тіла у щурів, які отримували терапевтичні дози досліджуваних препаратів протягом 3 місяців, показав різноманітний характер їх впливу. Так, мелоксикам не здійснював суттєвого впливу на масу тіла щурів. Вага щурів, у цій експериментальній групі, достовірно збільшилась на третьому місяці експерименту у порівнянні з початковими показниками, складаючи +9,2% відносно ваги щурів до початку експерименту. У той же час, введення диклофенаку, індометацину та, у меншій мірі, ацетилсаліцилової кислоти, призвело до певного токсичного впливу на динаміку маси тіла (її зниження). Зниження ваги, при цьому, склало: диклофенак 13%, індометацин - 12% та ацетилсаліцилова кислота - 5,6% у порівнянні з початковими значеннями.

Також була підтверджена наявність ульцерогенної дії у досліджуваних НПЛЗ на тлі їх довготривалого введення лабораторним щурам. При застосуванні мелоксикаму, уражень слизових оболонок практично не виникало в порівнянні з індометацином та диклофенаком. Отримані дані, щодо стану слизових оболонок шлунково-кишкового тракту, повністю відповідають інформації у літературних джерелах, щодо проявів побічних ефектів НПЛЗ [220, 221]. Найбільш вираженими були побічні реакції при застосуванні індометацину та диклофенаку, в той час, як у мелоксикаму спостерігалась мінімальна їх кількість, що узгоджується з їх селективним впливом відносно ЦОГ2.

Проведено порівняльний аналіз між масометричними змінами щурів та ульцерогенним впливом на кишківник, при тривалому введенні НПЛЗ. Так, при тривалому введенні диклофенаку та індометацину, спостерігалось зниження ваги щурів водночас з вираженим ульцерогенним впливом на їх слизову кишківника, що, проявлялось у збільшенні кількості виразок на 1 см². Щодо тривалого введення ацетилсаліцилової кислоти, відмічені незначні зміни маси щурів та менш

виражені зміни слизової кишківника, по відношенню до диклофенаку та індометацину. При дослідженні мелоксикаму, зафіксовано, що щури цієї експериментальної групи, мали достовірне збільшення маси тіла на третьому місяці експерименту у порівнянні з початковими даними, при цьому майже не спостерігалось уражень слизових оболонок.

Також, нами було досліджено загально-клінічні показники периферичної крові такі як, кількість лейкоцитів, еритроцитів, тромбоцитів, еозинофілів на тлі довготривалого введення НПЛЗ. Призначення диклофенаку, індометацину та ацетилсаліцилової кислоти не призводило до статистично вірогідних патологічних змін з боку кількості еритроцитів, разом з тим, спостерігалось підвищення кількості лейкоцитів відповідно в 18,2 та 15,8 та $9,4 \cdot 10^9/\text{л}$. У групи щурів, яка отримувала мелоксикам, рівень лейкоцитів залишався в нормі та складав $7,3 \cdot 10^9/\text{л}$.

При введенні диклофенаку, індометацину та ацетилсаліцилової кислоти спостерігалось підвищення еозинофілів в 6,7% та 5,8% та 1,1%, водночас, застосування мелоксикаму не призводило до змін еозинофілів.

Також нами не було зареєстровано, при введення диклофенаку, індометацину та мелоксикаму, патологічних змін зі сторони кількості тромбоцитів, на цей показник статистично вірогідний вплив мала ацетилсаліцилова кислота, на тлі призначення котрої, відбувалось зменшення тромбоцитів до $511,2 \cdot 10^9/\text{л}$ по відношенню до контрольної групи тварин.

Дослідження токсикологічного профілю НПЛЗ включало дослідження основних клініко-біохімічних показників. Був зареєстрований негативний вплив окремих НПЛЗ на загальний білок та АлАт, особливо при призначенні диклофенаку (відповідно 72,1г/л та 172,1Од/л) та індометацину (відповідно 81,4г/л та 166,8Од/л). В свою чергу, глюкоза крові та АсАт не зазнали особливих змін.

Підсумовуючи вищевикладене, можна зробити висновок, що профіль токсичності НПЛЗ та наявність ульцерогенної дії, при їх тривалому введенні, цілком збігається з відповідними результатами у літературних джерелах. Разом з

цим, на сьогодні існує багато суперечливих даних, щодо механізмів подібних впливів НПЛЗ, а також існує багато інформації щодо епігенетичного впливу НПЛЗ, що обумовлює необхідність розкриття молекулярних механізмів цих ефектів НПЛЗ.

Однією можливою ланкою епігенетичної дії, на думку низки дослідників, є оксидативний/нітрозуючий стреси, накопичення цитотоксичних дериватів оксиду азоту, а також окисних форм глутатіону. Більш того, є дані щодо здатності НПЛЗ індукувати подібні патобіохімічні зміни у тканинах.

При дослідженні впливу НПЛЗ, на маркери оксидативного та нітрозуючого стресів при їх тривалому введенні, особливу увагу звертають на себе нітротирозин, 8-гідрокси-2-дезоксигуанозин та iNOS. Зменшення рівня простаноїдів, через блокування циклооксигенази, спричиняє утворенню виразок, накопиченню запальних цитокінів та провокує окислювальний і нітрузувальний стреси. Це призводить до порушення балансу тіол-дисульфідів, що в свою чергу сприяє накопиченню шкідливих сполук у тканинах шлунково-кишкового тракту. Оксидативний та нітрозуючий стреси можуть розглядатися, як важливі фактори у виникненні пошкоджень тканин ШКТ та складові у молекулярному механізмі утворення виразок через блокування циклооксигенази.

На сьогодні, оксидативний та нітрозуючий стрес, зокрема нагромадження окислених тіолових сполук, вважають одними з ключових елементів, які впливають на епігенетичні зміни в геномі. Це стосується зміни активності глобальних факторів транскрипції через вплив на ці фактори стану антиоксидантно-прооксидантного балансу в клітинах, що у кінцевому рахунку, призводить до хімічної та конформаційної модифікації ДНК. Крім того, 8-оНГ розглядається як потужний фактор епігенетичної та епітранскрипційної модифікації, що обумовлено здатністю 8-оксогуаніну утворювати пару з аденіном та порушувати процеси репарації ДНК. Незважаючи на те, що хромосоми постійно моніторяться та відновлюються ферментами - метилювання ДНК, 8-оНГ може легко накопичуватися внаслідок перевантаження вільними радикалами та викликати шкідливі мутації, які часто спостерігаються в ракових клітинах з

дефіцитом конкретного механізму знешкодження 8-оксо-dG [135, 223, 224].

Наші дослідження деякою мірою підтверджують вищевикладене. Так, нами був зафіксований значний приріст маркеру окисного пошкодження білків – нітротирозину, особливо при введенні лабораторним щурам диклофенаку та індометацину (в середньому, в 51 раз по відношенню до контрольної групи тварин). Разом з цим, на тлі призначення мелоксикаму, нами не було зафіксовано статистично значущих змін стосовно дослідного показника. При дослідженні ацетилсаліцилової кислоти, було зареєстроване підвищення нітротирозину в 20 разів по відношенню до контрольної групи. Виявлено значне зростання рівня нітротирозину у тканинах кишківника, особливо під дією диклофенаку та індометацину, призвело до значного підвищення активності iNOS (в середньому в 6,2 рази в порівнянні з контролем). Це, на наш погляд, свідчить про розвиток нітрозуючого стресу, накопичення токсичних похідних оксиду азоту та зменшення його біодоступності в організмі.

Зафіксовано зміни, в тканинах кишківника, щодо зростання рівня 8-гідрокси-2-дезоксигуанозину. Тривале введення диклофенаку та індометацину на протязі 3 місяців призвело до збільшення рівня 8-гідрокси-2-дезоксигуанозину відповідно на 3,6 та 4 рази в порівнянні з контрольною групою тварин. В свою чергу ацетилсаліцилова кислота та мелоксикам мали незначний приріст по відношенню до контрольної групи.

Тривале застосування НПЛЗ може призводити до опосередкованої стимуляції оксидативного стресу, що супроводжується значним збільшенням окислених макромолекул, зокрема 8-гідрокси-2-дезоксигуанозину. Цей процес може бути розглянутий, як один з потенційних молекулярних механізмів пошкодження ДНК на фоні довготривалого прийому НПЛЗ. Деякі дослідження вказують на те, що підвищений рівень 8-гідрокси-2-дезоксигуанозину може сприяти збільшенню частоти мутацій та гіперметилуванню цитозину. Цей патобіохімічний ланцюг подій, насамперед, призводить до прямої цитотоксичної дії в тканинах кишківника і, на думку деяких вчених, може потенційно ініціювати процес онкогенезу [137, 225].

У результаті наших досліджень було виявлено, що разом із розвитком оксидативного/нітрозуючого стресу відбувається зсув балансу тіол-дисульфідної системи в напрямку окислених тіолових сполук. Останні наукові дослідження показали, що співвідношення між глутатіоном (GSH) та окисленою формою глутатіону (GSSG) має вплив на глобальний рівень гіперметилування ДНК, який пов'язаний з розвитком оксидативного стресу та вичерпанням запасів GSH та S-аденозилметіоніну. Крім цього, виявлено, що недостатній рівень GSH сприяє порушенню структури хроматину через глутатіоніювання гістонів. Також, за рахунок недостатнього ядерного GSH, спостерігається зменшення окисно-відновного потенціалу, що активує епігенетичні процеси та гіперметилування ДНК протягом клітинного циклу [226].

На основі отриманих наших експериментальних даних можна зробити наступні висновки. Вплив тривалого введення НПЛЗ, зокрема, ацетилсаліцилової кислоти, диклофенаку та індометацину спричиняли статистично значуще зниження рівня GSH у порівнянні з контрольною групою. Мелоксикам також впливав на зниження рівня GSH, але цей ефект був менш вираженим, ніж у групах з ацетилсаліциловою кислотою, диклофенаком та індометацином.

При впливі ацетилсаліцилової кислоти, диклофенаку та індометацину на рівень окисленої форми глутатіону відмічається підвищення рівня GSSG у порівнянні з контрольною групою. Мелоксикам також спричинив збільшення рівня GSSG, але цей ефект був менш вираженим, ніж у групах з ацетилсаліциловою кислотою, диклофенаком та індометацином.

В цьому порівняльному аналізі можемо зробити висновок, що ацетилсаліцилова кислота, диклофенак та індометацин впливають на зниження рівня GSH та збільшення рівня його окисненої форми, що може вказувати на порушення балансу антиоксидантів та окислювачів у тканинах відповідних груп тварин. Мелоксикам також впливає на рівень GSH та GSSG, але його вплив менш виражений порівняно з іншими досліджуваними препаратами. Ці дані вказують на виснаження антиоксидантного захисту та дисбаланс окислювачів у тканинах тварин після тривалого введення препаратів.

Із літературних джерел відомо, що система тіолових дисульфідів відіграє важливу роль у регулюванні окисно-відновних процесів генів. Порушення синтезу ключових проміжних сполук цієї системи призводить до порушень активності генів та може спричиняти можливі епігенетичні зміни [140, 227]. Виявлено, що індометацин, диклофенак і ацетилсаліцилова кислота суттєво впливають на збільшення окисленої форми глутатіону при виснаженні його встановленої форми. Це призводить до зниження активності важливих ферментів тіол-дисульфідної системи, таких як ГР та ГПР.

Також нами були виявлені небажані побічні ефекти НПЛЗ, особливо індометацину та диклофенаку, які проявлялись також в негативному впливові на обмін пуринів. Так, призначення ацетилсаліцилової кислоти, диклофенаку та індометацину, ймовірно, значно підвищило активність ферменту АДА (відповідно на 1,3, 3 та 3,5 рази в порівнянні з контрольною групою тварин) та КО (на 2,2, 7,2 та 8 разів). В свою чергу, у групі піддослідних щурів яким вводили мелоксикам, нами не було зафіксовано зміни активності АДА та КО.

В даному контексті виникає питання щодо можливого впливу НПЛЗ на епігенетичні зміни, особливо в зв'язку з розвитком окисдативного/нітрозуючого стресів, зсувом тіол-дисульфідної рівноваги та їх негативному впливу на обмін пуринів.

Окисдативний стрес, що виникає при тривалому прийомі НПЛЗ, обумовлений надмірним утворенням АФК в клітинах. Цей феномен може викликати епігенетичні зміни через активацію сигнальних шляхів, які впливають на метилювання ДНК та модифікацію гістонів, впливаючи на експресію генів. Надлишок АФК можуть активувати ферменти, такі як ДНК-метилтрансферази та гістонові деацетилази, сприяючи метилюванню ДНК та ацетилюванню гістонів. Зсув тіол-дисульфідної рівноваги, що виникає під впливом НПЛЗ, впливає на функцію генів через зміни в реакціях окиснення-відновлення в клітинах. Цей процес може викликати зміни в активності ферментів (ДНК-метилтрансферази, гістон-метилтрансферази, гістон-деацетилази, гістон-ацетилтрансферази), відповідальних за епігенетичні модифікації.

На *другому етапі* експерименту були проведені дослідження *in vivo* та представлені результати дослідження впливу НПЛЗ на рівень показників факторів ендогенної цитопротекції/молекулярні фактори клітинного циклу (HSP70), маркерів пошкодження тканини (ММР8, фекальний кальпротектин) та маркерів APUD системи (грелін) у тканинах кишківника.

Виконане дослідження є важливим у контексті дослідження тривалого використання НПЛЗ, яке спричиняє виникненню небажаних побічних ефектів, особливо утворення виразок, шляхом активізації, в уражених тканинах, процесів вільнорадикального окиснення. Це призводить до активації матриксних металопротеїназ та HSP70, які можуть впливати на появу побічних ефектів, включаючи неопластичні реакції [143, 228].

В плазмі крові експериментальних тварин було зафіксоване статистично значуще зростання рівня ММР8 у всіх експериментальних групах. Відомо, що дія НПЛЗ напряду пов'язана з їх здатністю зменшувати надмірний синтез інтерлейкінів, фактору некрозу пухлин, активність матриксних металопротеїназ та продуктів пероксидації. Проте, при тривалому застосуванні та виникненні небажаних побічних ефектів, особливо при утворенні виразок, спостерігається інтенсифікація процесів вільнорадикального окиснення та активація матриксних металопротеїназ, зокрема ММР8, в уражених тканинах. Крім того, показано, що певна активність ММР8 здатна модулювати функціональність білків позаклітинного матриксу, цитокінів, факторів росту та рецепторів сигналізації та адгезії клітин. Аномально підвищений протеоліз ММР впливає на багато клітинних функцій, зокрема проліферацію, міграцію та інвазію. Також показано редокс-контроль епігенетичних механізмів, які регулюють активність ММР та їх інгібіторів. Зокрема, збільшення активності ММР8 може індукувати інвазію клітин пухлини, їх метастазування.

Вищенаведені дані, відповідають результатам наших власних досліджень, в котрих було зафіксовано значне збільшення вмісту ММР8 у плазмі тварин, які отримували індометацин (в середньому на 86%), диклофенак (в середньому на 83%), ацетилсаліцилову кислоту (на 79%) і мелоксикам (на 66%) [143].

Також, було зареєстровано підвищення вмісту HSP70 у плазмі крові. Ці зміни відбувались одночасно зі змінами вмісту MMP8 та розвитком НПЛЗ-індукованим ульцерогенезом. На нашу думку, подібне підвищення вмісту HSP70 обумовлено двома протилежними причинами, що узгоджується з іншими дослідженнями. На тлі ульцерогенної дії НПЛЗ активується система клітинних шаперонів, які здатні забезпечити фолдінг білків і запобігати процесам їхньої денатурації. Разом з цим, відомо, що клітини з ознаками неоплазії можуть експресувати вищі рівні HSP70, ніж нормальні клітини, а висока експресія HSP70 вказує на онкогенний фенотип, який зазвичай стійкий до хіміотерапії та запрограмованої загибелі клітин [153].

НПЛЗ характеризуються своєю здатністю зменшувати синтез інтерлейкінів, фактору некрозу пухлин, активності матриксних металопротеїназ та продуктів пероксидації в уражених тканинах. Однак при тривалому застосуванні цих препаратів спостерігається інтенсифікація процесів вільнорадикального окиснення та активація матриксних металопротеїназ, зокрема MMP8. Це може вказувати на те, що довготривале введення НПЛЗ сприяє змінам у біохімічних механізмах регуляції запального відгуку.

Важливо зазначити, що математичний аналіз даних вмісту MMP8 і HSP70 показав позитивний кореляційний зв'язок середньої сили (індометацин, $r = 0,62$ та $r = 0,49$ відповідно; ацетилсаліцилова кислота, $r = 0,57$ та $r = 0,60$ відповідно; мелоксикам, $r = 0,50$ та $r = 0,56$ відповідно) між вмістом цих маркерів та ступенем пошкодження ШКТ у щурів.

Таким чином, нами було зафіксовано значне збільшення рівня MMP8, у плазмі крові експериментальних тварин, які отримували індометацин, диклофенак, ацетилсаліцилову кислоту та мелоксикам. Це зростання пов'язане з тривалим застосуванням цих препаратів та виникненням небажаних побічних ефектів, зокрема утворення виразок.

Також відмічено, що підвищення вмісту HSP70 у плазмі крові, що корелює з вмістом MMP8 та ульцерогенною дією НПЛЗ. Підвищення HSP70 може бути результатом активації системи клітинних шаперонів, спрямованих на захист білків при ініціації каскаду патобіохімічних змін у клітинах. Це може вказувати

на спробу клітин захистити себе від негативних наслідків запального процесу та деградації білків. Зазначені ефекти можуть впливати на епігенетичні зміни в клітинах. Зміни у рівнях MMP8 та HSP70 можуть викликати каскадні реакції. MMP8 може впливати на модифікації хроматину та метилювання ДНК, взаємодіючи з факторами транскрипції, що регулюють геном. Також, існують редокс-залежні механізми епігенетичного контролю активності MMP8. З іншого боку, підвищений рівень HSP70 може активувати клітинні механізми, спрямовані на збереження структури білків, що може впливати на експресію генів та модифікації хроматину. Такі взаємодії можуть сприяти хіміко-фізичним змінам у нуклеотидах, що в свою чергу може викликати епігенетичні зміни в клітинах.

Нами було встановлено здатність НПЛЗ впливати на концентрацію греліну, а також на підвищення рівня фекального кальпротектину, як чутливого маркера при запальних процесах у шлунка та кишківника. Грелін має вплив на поліпшення процесу загоєння тканин кишківника, через власні антиоксидантні та протизапальні властивості. Отже, враховуючи отримані данні про здатність НПЛЗ викликати оксидативний стрес, у тканинах кишківника, та їх класичну ульцерогенну дію, ми вважаємо за необхідне досліджувати механізми побічних ефектів з урахуванням можливого впливу НПЛЗ на метаболізм греліну.

НПЛЗ, спричиняючи зміни в концентрації греліну, можуть впливати на його взаємодію з рецепторами та сигнальними механізмами. Це, в свою чергу, може викликати каскадні реакції у клітинах, включаючи зміни в модифікаціях хроматину та метилюванні ДНК. Важливо врахувати, що епігенетичні зміни можуть відбуватися через активацію конкретних сигнальних шляхів або впливати на експресію генів, що регулюють запальні процеси та імунітет.

При довготривалому використанні НПЛЗ спостерігалось статистично достовірне збільшення рівня фекального кальпротектину при введенні всіх досліджуваних препаратів. Концентрація фекального кальпротектину відображає міру та характер патологічного процесу в тканині кишківника, викликаного токсичною дією НПЛЗ. Підвищений рівень кальпротектину корелював зі значними пошкодженнями слизової оболонки та розвитком неоплазій у тканинах

кишківника, при застосуванні вивчених НПЛЗ. Ці дані повністю збігаються з силою токсичного впливу досліджуваних НПЛЗ порівняно з іншими показниками.

На *третьому етапі* нашого дослідження, ми досліджували епігенетичний вплив НПЛЗ за їх вірогідним впливом на процеси метилювання, фрагментації ДНК, а також на фенотипічні ознаки експресії певних генів клітинного циклу та сигналіngu.

При порівнянні наших даних з іншими результатами різних дослідників, були встановлені їх епігенетичні ефекти, які можуть відігравати певну роль у розвитку їх небажаних побічних ефектів. За даними низки літературних джерел, НПЛЗ здатні модулювати епігенетичний профіль нормального колоніального епітелію та ініціювати неопластичні процеси, підвищуючи ризик колоректального раку. За допомогою Illumina Infinium HumanMethylation27 Beadchip, а також в неперекривальній реплікаційній вибірці з 187 жінок на 485,512 CpG-сайтах за допомогою Infinium HumanMethylation450 Beadchip було встановлено різноспрямований характер метилювання ДНК певних генів, в залежності від певного поліморфізму [102].

Проведеними нашими молекулярно-генетичними дослідженнями доведено епігенетичний вплив НПЛЗ на процеси метилювання ДНК. Найсильніший вплив на кількість метилювання ДНК здійснив тривалий прийом індометацину (збільшення на 99% порівняно з контрольною групою тварин). Ацетилсаліцилова кислота та мелоксикам сприяли розвитку менш вираженого ефекту, збільшуючи кількість метильованого ДНК на 56% та 41% відповідно.

При дослідженні ступеню загальної фрагментації ДНК, відмічалось найбільше підвищення її рівня у груп з призначенням диклофенаку та індометацину. По відношенню до контрольної групи, ацетилсаліцилова кислота та мелоксикам, також мали статистично вірогідний вплив, проте меншого ступеню вираженості.

Описані вище молекулярні процеси спричиняють порушення функціонування певних генів клітинного сигналіngu та циклів. Це може призвести до нестабільності геному та вплинути на нормальний хід процесів проліферації та

диференціації клітин.

Відомо, що лейкотрієни та продукти окислення активують TLR4-рецептори, що може індукувати активацію запального процесу та стимулювати активацію нейтрофілів, індукуючи подальше ушкодження стінки кишківника. Вроджена імунна відповідь має безліч молекулярних взаємодій для захисту організму від патогенних агентів. Ці взаємодії передбачають зміни у експресії генів. Важливими у цих реакціях є епігенетичні механізми. Розуміння цих механізмів має велике значення для розробки відповідних терапій, що модулюють імунну відповідь. Однією з цікавих сімей рецепторів, відповідальних за активність вродженої імунної системи, є сім'я рецепторів Тол-подібних (TLR). Ці рецептори важливі для вродженої імунної відповіді на інфекції та вказується їх роль у прогресуванні раку.

Дослідження рівня експресії TLR4-рецепторів продемонстрували здатність всіх НПЛЗ впливати на їх збільшення, зокрема, ацетилсаліцилова кислота - збільшення в 1,8 рази, диклофенак- в 3,3 рази та індометацин - в 2,7 рази, перевищуючи при цьому показники мелоксикаму. Важливо відзначити, що експресія TLR4 мала високий взаємозв'язок з маркерами оксидативного стресу та маркером пошкодження слизової оболонки кишківника. Було встановлено сильний позитивний взаємозв'язок між концентрацією фекального кальпротектину та застосуванням ацетилсаліцилової кислоти, індометацину та диклофенаку, з експресією TLR4.

Отже, на основі наших досліджень було доведено, що НПЛЗ, зокрема індометацин та диклофенак, можуть спричиняти оксидативний стрес та викликати високу експресію TLR4 в тканинах кишківника. Це, в подальшому, може призвести до серйозних небажаних побічних ефектів, зокрема, до ушкодження слизової оболонки кишківника та індукції неопластичних процесів.

Наше дослідження, щодо впливу НПЛЗ на процеси метилювання ДНК в певній мірі підтверджує припущення деяких вчених про наявність у НПЛЗ епігенетичних механізмів, які можуть викликати небажані побічні ефекти та сприяти онкогенезу, що знайшло деякі підтвердження при дослідженні спектру

відповідних білків клітинного циклу та сигналіngu. Так, процеси гіперметилування ДНК та її фрагментації спостерігалися на тлі зростання рівнів SMO та Shh білків Wnt та Hedgehog сигнальних шляхів.

Найсильніший вплив, серед усіх досліджуваних НПЛЗ, спостерігався при введенні індометацину та диклофенаку, які збільшувались, більш ніж в 3 рази, концентрацію SMO та Shh-білків. Схожі тенденції були зафіксовані і при оцінці концентрації білка-проонкогену c-kit. Ацетилсаліцилова кислота та мелоксикам менше впливали на рівні досліджуваних білків Wnt та Hedgehog сигнальних шляхів, збільшивши їх відповідно в 1,3 та 1,6 рази, або в 1,2 та 1,3 рази.

Отже, на основі наших експериментальних досліджень було встановлено, що тривалий прийом НПЛЗ призводить до збільшення повногеномного метилування ДНК та збільшує інтенсивність процесів її фрагментації. Також спостерігалось підвищення рівня білків Wnt та Hedgehog - сигнальних шляхів, відповідно SMO та Shh, а також білка-проонкогену c-kit у тканинах кишківника. Найвиразніші ефекти спостерігалися у неселективних інгібіторів ЦОГ1, 2 - індометацину та диклофенаку.

Задля встановлення кореляційних зав'язків параметрів, що вивчаються та їх можливого впливу на реалізацію побічної дії (ульцерогенна дія) нами була побудована кореляційна матриця Спірмена між показниками (див. Додаток Г).

Встановлений взаємозв'язок між кількістю виразок слизової оболонки кишківника та рівнем MeDNA, нітротирозину, фрагментації ДНК, а також їх взаємозв'язок з GSS та MMP8. Отримані результати розкривають важливі закономірності, які можуть мати значущий внесок у розуміння тонких молекулярних ланок розвитку побічної дії НПЛЗ.

Математичним аналізом показано, що кількість виразок слизової найбільше пов'язано з MeDNA та нітротирозином ($R=0,704$, $p<0,05$). Регресійна модель для MeDNA дозволяє прогнозувати кількість утворених виразок, а її високий коефіцієнт детермінації та значення F-критерію свідчать про надійність цієї моделі (див. Додаток Д, рис. Д.1).

На основі аналізу даних з математико-статистичного поля виявлено, що

регресійні моделі підтверджують вплив MeDNA та нітротирозину на утворення виразок. Високі значення коефіцієнтів детермінації та великі значення F-критеріїв підтверджують значущість цих молекулярних маркерів у механізмах, що породжують побічні ефекти НПЛЗ.

З погляду можливих небажаних наслідків, це дослідження висвітлює можливу роль MeDNA, нітротирозину та фрагментації ДНК у виникненні виразок на слизовій оболонці кишківника. Також зазначається потенційний вплив GSS та MMP8 на ці процеси, які можуть визначати ступінь тяжкості ушкоджень і виступати як маркери для них.

Далі, було вивчено вплив фрагментації ДНК на кількість утворених виразок. Регресійна модель показала, що збільшення рівня фрагментації ДНК на одиницю призведе до майже шестикратного збільшення кількості виразок (інтерпретація: $\beta=0,73$, $F=103,39$) (див. Додаток Д, рис. Д.3).

Це відкриває нові можливості у розумінні молекулярно-генетичних процесів, що лежать в основі можливих небажаних наслідків при застосуванні НПЛЗ.

Значущий вплив GSS та MMP8 на фрагментацію ДНК було також виявлено і це свідчить про комплексний характер цього процесу (див. Додаток Д, рис. Д.4).

Разом з цим, згідно з результатами, підвищення рівня GSS на одиницю при незмінному рівні MMP8 призводитиме до збільшення фрагментації ДНК на 0,09. З іншого боку, підвищення рівня MMP8 на одиницю при незмінному рівні GSS призводитиме до зменшення фрагментації ДНК на 0,05. Ці данні, відкривають нові можливості у розумінні молекулярно-генетичних процесів, що лежать в основі можливих побічних ефектів при застосуванні НПЛЗ.

Також це свідчить про важливий регуляторний вплив цих факторів на процес фрагментації ДНК, який, в свою чергу, може визначати рівень виникнення виразок слизової (див. Додаток Д, рис. Д.5).

Отже, загальні висновки дослідження показують наявність складного молекулярного механізму, де MeDNA, нітротирозин і GSS відіграють важливу роль у процесі формування виразок на слизовій оболонці, а вплив GSS на цей процес, підкреслює складний характер регуляції.

У ході даного дослідження проводилось аналіз молекулярних механізмів, які утворюють основу для розвитку токсичного впливу та небажаних наслідків при використанні НПЛЗ. Основними об'єктами дослідження є MeDNA, нітротирозин, розрив ДНК та GSS. Також, був виявлений сильний взаємозв'язок двох змінних, а саме фрагментації ДНК та матриксної металопротеїнази 8.

Об'єднані результати дослідження вказують на складний молекулярний механізм, в якому MeDNA, нітротирозин, GSS, та MMP8 відіграють ключову роль у формуванні виразок слизової. Це відкриває нові перспективи для розуміння молекулярно-генетичних механізмів розвитку можливих побічних ефектів НПЛЗ.

У цьому дослідженні, було проведено вивчення молекулярних механізмів, що лежать в основі розвитку токсичної та побічної дії НПЛЗ. Основними фокусами були MeDNA, нітротирозин, фрагментація ДНК, GSS та MMP8.

На підставі математико-статистичного аналізу, можна стверджувати, що за допомогою регресійних моделей встановлено, що MeDNA та нітротирозин мають значущий вплив на розвиток ульцерогенної дії. Високі коефіцієнти детермінації та значення F-критеріїв підтверджують важливість цих молекулярних маркерів у механізмах реалізації побічних ефектів НПЛЗ.

Аналіз кореляційних взаємодій фрагментації ДНК з GSS та MMP8, показав, що фрагментація ДНК відіграє ключову роль у виникненні виразок слизової оболонки кишківника, а вплив GSS 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 виразок слизової. Також вказується на потенційний вплив GSS та MMP8 на ці процеси, що може визначати ступінь тяжкості ушкоджень, маркерами яких вони можуть слугувати.

З точки зору молекулярних та епігенетичних механізмів реалізації можливих побічних ефектів НПЛЗ, важливо розглядати взаємодію молекулярних факторів у контексті їхнього впливу на генетичну експресію. Потенційні зміни у метилюванні ДНК або інші епігенетичні маркери можуть відігравати регуляторну роль у виникненні виразок, сприяючи або стримуючи виявлення певних

молекулярних подій.

Усе це свідчить про потребу подальших досліджень спрямованих на розуміння більш глибоких молекулярних механізмів розвитку пошкоджень слизової та розробку ефективних шляхів раціонального використання та призначення НПЛЗ, що враховують не тільки традиційні механізми розвитку, зокрема, ульцерогенної дії, але й молекулярно-епігенетичні аспекти цього патологічного впливу.

ВИСНОВКИ

Вивчення молекулярних та епігенетичних механізмів розвитку побічних ефектів нестероїдних протизапальних лікарських засобів є актуальною задачею сучасної медичної та фармакологічної науки. НПЛЗ є одними з найбільш широко застосовуваних лікарських засобів у всьому світі. Незважаючи на позитивні терапевтичні ефекти від застосування НПЛЗ, на сьогодні, зареєстровані різноманітні прояви притаманних цим препаратам побічних ефектів. Також паралельними епідеміологічними дослідженнями встановлено здатність НПЛЗ, як обмежувати прогресування онкологічних захворювань, так й ініціювати неопластичні процеси, зокрема, у шлунково-кишковому тракті. Подібні суперечливі факти, обумовлюють необхідність встановлення тонких молекулярно-генетичних ланок механізмів побічних ефектів окремих НПЛЗ.

У дисертаційній роботі представлені комплексні дослідження щодо впливу довготривалого призначення НПЛЗ на показники оксидативного/нітрозуючого стресів, тіол-дисульфідної системи, обміну пуринів, концентрації HSP70-білків, грелін, маркери пошкодження кишківника, на процеси метилювання, фрагментації ДНК, експресію TL4-рецепторів та синтезу молекулярних регуляторів Wnt- Hedgehog сигналіngu та c-kit-гену.

1. Призначення диклофенаку, індометацину, ацетилсаліцилової кислоти, сприяло зменшенню маси тіла, знижуючи її відповідно на 13%, 12% та 5,6% по відношенню до значень маси тіла до початку експерименту. Разом з цим, призначення мелоксикаму призводило до збільшення маси тіла на 3 місяць експерименту у порівнянні з вихідними даними, та склало +9,2% по відношенню до значень маси тіла до початку експерименту. Подібний профіль токсичності НПЛЗ корелював з їх ульцерогенною дією, зокрема індометацину та диклофенаку (найбільша ступінь прояву), ацетилсаліцилової кислоти (середня) та мелоксикаму (мінімальні, зафіксовані лише поодинокі ураження та низька ступінь пошкоджень у 40% тварин).

2. Довготривале призначення лабораторним щурам НПЛЗ призводило до приросту нітротирозину, особливо на тлі введення лабораторним щурам

диклофенаку та індометацину (в середньому, в 51 разів по відношенню до контрольної групи тварин). Підвищення нітротирозину відбувалось на тлі приросту iNOS, під дією індометацину та диклофенаку - у середньому в 6,2 рази по відношенню до контролю) та ацетилсаліцилової кислоти (в 2,4 рази по відношенню до контролю). Призначення ацетилсаліцилової кислоти, диклофенаку та індометацину, статистично достовірно впливало на підвищення активності АДА (відповідно в 1,3 та 3,5 рази відповідно контрольної групи тварин), КО (2,2, 7,2 та 8 разів), а також сечової кислоти (1,4, 1,7 та 1,8 разів). Подібний напрямок побічної дії вищезазначених НПЛЗ був зафіксований при дослідженні концентрації 8-оксигідроксигуаніну та окисненого глутатіону. Призначення мелоксикаму не призводило до статистично значущих змін стосовно дослідних показників.

3. Всі досліджувані НПЛЗ достовірно впливали на підвищення HSP70, MMP8 в порівнянні з контрольною групою, причому найбільший вплив мав індометацин, а найменший мелоксикам. Призначення індометацину призводило до збільшення цих показників відповідно в 3,9 та 7,4 рази; диклофенаку – в 1,9 та 2,9 рази; ацетилсаліцилової кислоти – в 2,8 та 4,7 разів; мелоксикаму – в 1,9 та 2,9 рази. Динаміка концентрації греліну була протилежна до MMP8, знижуючись під дією диклофенаку та індометацину відповідно в 2,6 та 3,9 рази; та підвищуючись під дією ацетилсаліцилової кислоти – в 3,2 рази та мелоксикаму - в 1,4 рази. Концентрація fCAL, при призначенні диклофенаку та індометацину, відповідала вираженому запаленню тканин кишківника ($\geq 160\mu\text{g/g}$); під дією ацетилсаліцилової кислоти та мелоксикаму ($\geq 160\mu\text{g/g}$) - відповідала рівню легкого запалення.

4. Тривале введення індометацину, диклофенаку, ацетилсаліцилової кислоти та мелоксикаму призводило до статистично достовірного збільшення повногеномного метилювання ДНК та до інтенсифікації процесів її фрагментації. Під дією індометацину та диклофенаку збільшення MeDNA складало у середньому 95% по відношенню до контрольної групи тварин, ацетилсаліцилової кислоти та мелоксикаму відповідно на 56% та 41%. Аналогічні зміни були

встановлені також при дослідженні ступеню загальної фрагментації ДНК під дією НПЛЗ. За своїм впливом на експресію TL4-рецепторів усі НПЛЗ достовірно перевищували показники контрольної групи тварин: ацетилсаліцилова кислота - збільшення в 1,8 рази по відношенню до контролю, диклофенак та індометацин - збільшення у 3,3 рази та 2,7 рази відносно аналогічних показників мелоксикаму. Також індометацин та диклофенак більш виражено впливали на вміст SMO та Shh-білків, збільшуючи їх відповідно у 1,8 і 2,77 разів та у 2 і 2,9 разів; ацетилсаліцилова кислота та мелоксикам чинили менш виражений ефект (збільшення відповідно у 1,3 і 1,6 разів та у 1,2 і 1,3 рази. Подібні зміни нами були встановлені при вивченні концентрації білка- проонкогену c-Kit в умовах застосування НПЛЗ, за виключенням мелоксикаму, який не мав статистично достовірного впливу на цей показник.

5. На підставі математико-статистичного аналізу, за допомогою регресійних моделей встановлено, що MeDNA та нітротирозин мають значущий вплив на прояви ульцерогенної дії. Високі коефіцієнти детермінації та значення F-критеріїв підтверджують важливість цих молекулярних маркерів у механізмах реалізації побічних ефектів НПЛЗ. 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 сигналіну та гену c-kit. Аналіз кореляційних взаємодій фрагментації ДНК з окисненим глутатіоном та MMP8, показав, що фрагментація ДНК відіграє ключову роль у виникненні ушкоджень слизової оболонки кишківника, а вплив окисненого глутатіону та MMP8 на цей процес підкреслює складний характер регуляції.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Smith, W. L., DeWitt, D. L., & Garavito, R. M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 145–182. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.145>
2. Rebecca, S. Y. Wong. (2019). Role of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Cancer Prevention and Cancer Promotion. *Advances in Pharmacological*, 2019, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2019/3418975>
3. Dierssen-Sotos, T., Gómez-Acebo, I., de Pedro, M., Pérez-Gómez, B., Servitja, S., Moreno, V., ... Llorca, J. (2016). Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of breast cancer: the Spanish Multi-Case-control (MCC) study. *BMC Cancer*, 16(1), 660. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2692-4>
4. Doat, S., Cénée, S., Trétarre, B., Rebillard, X., Lamy, P.-J., Bringer, J.-P., ... Menegaux, F. (2017). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and prostate cancer risk: results from the EPICAP study. *Cancer Medicine*, 6(10), 2461–2470. <https://doi.org/10.1002/cam4.1186>
5. Trabert, B., Ness, R. B., Lo-Ciganic, W. H., Murphy, M. A., Goode, E. L., Poole, E. M., ... Wentzensen, N. (2014). Aspirin, nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drug, and acetaminophen use and risk of invasive epithelial ovarian cancer: a pooled analysis in the ovarian cancer association consortium. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 106(2), djt431. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt431>
6. Shi, J., Leng, W., Zhao, L., Xu, C., Wang, J., Chen, X., ... Peng, X. (2017). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs using and risk of head and neck cancer: a dose–response meta-analysis of prospective cohort studies. *Oncotarget*, 8(58), 99066–99074. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21524>
7. Prizment, A. E., Folsom, A. R., & Anderson, K. E. (2010). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Risk for Ovarian and Endometrial Cancers in the Iowa Women's Health Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 19(2), 435–442. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-09-0976>
8. Choueiri, T. K., Je, Y., & Cho, E. (2013). Analgesic use and the risk of

kidney cancer: a meta-analysis of epidemiologic studies. *International Journal of Cancer*, 134(2), 384–396. <https://doi.org/10.1002/ijc.28093>

9. Harirforoosh, S., Asghar, W., & Jamali, F. (2013). Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 16(5), 821–847. <https://doi.org/10.18433/j3vw2f>

10. Peek, R. M., Jr., & Crabtree, J. E. (2005). Helicobacter infection and gastric neoplasia. *Journal of Pathology*, 208, 233–248. <https://doi.org/10.1002/path.1868>

11. Chambers, W. M., Warren, B. F., Jewell, D. P., & Mortensen, N. J. (2005). Cancer surveillance in ulcerative colitis. *British Journal of Surgery*;92, 928–936. <https://doi.org/10.1002/bjs.5106>

12. Brasky, T. M., Felix, A. S., Cohn, D. E., McMeekin, D. S., Mutch, D. G., Creasman, W. T., ... Brinton, L. A. (2016). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and endometrial carcinoma mortality and recurrence. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(3), djw251. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw251>

13. Orrell, K. A., Cices, A. D., Guido, N., Majewski, S., Ibler, E., Huynh, T., ... Nardone, B. (2018). Malignant melanoma associated with chronic once-daily aspirin exposure in males: a large, single-center, urban, US patient population cohort study from the “Research on Adverse Drug events and Report” (RADAR) project. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 79(4), 762–764. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.03.031>

14. Kumar, D., Rahman, H., Tyagi, E., Liu, T., Li, C., Lu, R., ... Grossman, D. (2018). Aspirin suppresses PGE2 and activates AMP kinase to inhibit melanoma cell motility, pigmentation, and selective tumor growth in vivo. *Cancer Prevention Research*, 11(10), 629–642. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.capr-18-0087>

15. Bindu, S., Mazumder, S., & Bandyopadhyay, U. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical Pharmacology*, 180, 114–147. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>

16. Pandey, J., Mishra, S., & Jaiswal, K. (2018). In vitro evaluation of the

antihelminthic activity of rhizome extracts of curcuma longa (linn.). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 10(1), 62–66. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i12.28313>

17. Bjarnason, I., Scarpignato, C., Holmgren, E., Olszewski, M., Rainsford, K. D., & Lanas, A. (2018). Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Gastroenterology*. 154(3), 500–514. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.10.049>

18. Jana, N.R. (2008). NSAIDs and apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci*, 65, 1295–1301. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7511-x>

19. Arfè, A., Scotti, L., Varas-Lorenzo, C., Nicotra, F., Zambon, A., Kollhorst, B., ... Corrao, G. (2016). Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of heart failure in four European countries: nested case-control study. *BMJ*, 354, 48–57. <https://doi.org/10.1136/bmj.i4857>

20. van den Bekerom, M. P. J., Sjer, A., Somford, M. P., Bulstra, G. H., Struijs, P. A. A., & Kerkhoffs, G. M. M. J. (2015). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for treating acute ankle sprains in adults: benefits outweigh adverse events. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 23(8), 2390–2399. <https://doi.org/10.1007/s00167-014-2851-6>

21. Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., & Crowe, S. E. (2014). Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *American Physiological Society*, 94(2), 329–354. <https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2012>

22. Pérez, S., Taléns-Visconti, R., Rius-Pérez, S., Finamor, I., & Sastre, J. (2017). Redox signaling in the gastrointestinal tract. *Free Radical Biology and Medicine*, 104, 75–103. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.048>

23. Erel, O., & Neselioglu, S. (2014). A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clinical Biochemistry*, 47(18), 326–332. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.09.026>

24. Topuz, M., Şen, O., Kaplan, M., Akkus, O., Erel, O., & Gur, M. (2017). The Role of Thiol/Disulphide Homeostasis in Anthracycline Associated Cardiac

Toxicity. *International Heart Journal*, 58(1), 69–72. <https://doi.org/10.1536/ihj.16-124>

25. Dirican, N., Dirican, A., Sen, O., Aynali, A., Atalay, S., Bircan, H. A., ... Akkaya, A. (2016). Thiol/disulfide homeostasis: A prognostic biomarker for patients with advanced non-small cell lung cancer. *Redox Report*, 21(5), 197–203. <https://doi.org/10.1179/1351000215Y.0000000027>

26. Nawaz, H, Ali, A, Rehman, T, & Aslam, A. (2020). Chronological effects of non-steroidal anti-inflammatory drug therapy on oxidative stress and antioxidant status in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*, 40(5), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10067-020-05438-0>

27. Pretorius, E., Akeredolu, O.-O., Soma, P., & Kell, D. B. (2017) Major involvement of bacterial components in rheumatoid arthritis and its accompanying oxidative stress, systemic inflammation and hypercoagulability. *Experimental Biology and Medicine*, 242, 355–373. <https://doi.org/10.1177/1535370216681549>

28. Mittal, N., Kanwar, S. S., & Sanyal, S. N. (2008). Effect of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and the Procarcinogen 1,2-Dimethylhydrazine on the Antioxidant Defense System. *International Journal of Toxicology*, 27(2), 169–174. <https://doi.org/10.1080/10915810801977880>

29. Okoroama, C. E., Unekwe, P. C., Okoroama, L. C., Okparaoka, S. U., & Akuodor, G. C. (2023). Evaluation of the protective role of antioxidants: α -tocopherol, vitamin C, and quercetin, against ibuprofen-induced renal damage in male Wistar rats. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, 12(5), 631–639. <https://doi.org/10.18203/2319-2003.ijbcp20232557>

30. Sinha, M., Gautam, L., Shukla, P. K., Kaur, P., Sharma, S., & Singh, T. P. (2013). Current Perspectives in NSAID-Induced Gastropathy. *Mediators of Inflammation*, 2013, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/258209>

31. Hijos-Mallada, G, Sostres, C, & Gomollon, F. (2022). NSAIDs, gastrointestinal toxicity and inflammatory bowel disease. AINE, toxicidad gastrointestinal y enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterologia y hepatologia*, 45(3), 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2021.06.003>

32. Bhala, N., Emberson, J., Merhi, A., Abramson, S., Arber, N., Baron, J. A., Bombardier, C., Cannon, C., Farkouh, M. E., FitzGerald, G. A., Goss, P., Halls, H., Hawk, E., Hawkey, C., Hennekens, C., Hochberg, M., Holland, L. E., Kearney, P. M., Laine, L., & Baigent, C. (2013). Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials. *Lancet (London, England)*, *382*(9894), 769–779. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60900-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60900-9)

33. Chu, S.J., Yoon, K.T., & Kim, J.S. (2020). Prevention of Non-steroidal Anti-inflammatory Drug-induced Peptic Ulcers. *The Korean journal of gastroenterology*, *76*(5), 232–237. <https://doi.org/10.4166/kjg.2020.139>

34. Şener, M. U., Sönmez, Ö., Keyf, İ. A., Erel, Ö., Alışık, M., Bulut, S., & Erdoğan, Y. (2020). Evaluation of Thiol/Disulfide Homeostasis in Lung Cancer. *Turkish thoracic journal*, *21*(4), 255–260. <https://doi.org/10.5152/TurkThoracJ.2019.19033>

35. Hizal, M., Sendur, M. A. N., Bilgin, B., Akinci, M. B., Dede, D. S., Neselioglu, S., ... Yalcin, B. (2018). Evaluation of dynamic serum thiol/disulfide homeostasis in locally advanced and metastatic gastric cancer. *Journal of Oncological Sciences*, *4*(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.jons.2018.01.002>

36. Brasky, T. M., Bonner, M. R., Moysich, K. B., Ambrosone, C. B., Nie, J., Tao, M. H., ... Freudenheim, J. L. (2011). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and breast cancer risk: differences by molecular subtype. *Cancer causes & control: CCC*, *22*(7), 965–975. <https://doi.org/10.1007/s10552-011-9769-9>

37. Patel, N. P., Bates, C. M., & Patel, A. (2023). Developmental Approaches to Chronic Pain: A Narrative Review. *Cureus*, *15*(9), e45238. <https://doi.org/10.7759/cureus.45238>

38. Borges, T. J., Wieten, L., van Herwijnen, M. J., Broere, F., van der Zee R., Bonorino, C., & van Eden W. (2012). The anti-inflammatory mechanisms of HSP70. *Frontiers in immunology*, *3*, 95. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00095>

39. Miova, B., Dinevska-Kjovkarovska, S. V., & Apostolova, N. (2015). Heat Stress Induces Extended Plateau of HSP70 Accumulation--A Possible Cytoprotection

Mechanism in Hepatic Cells. *Journal of cellular biochemistry*, 116(10), 2365–2374. <https://doi.org/10.1002/jcb.25187>

40. Thiruchenthooran, V., Sánchez-López, E., & Gliszczyńska, A. (2023). Perspectives of the Application of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Cancer Therapy: Attempts to Overcome Their Unfavorable Side Effects. *Cancers*, 15(2), 475. <https://doi.org/10.3390/cancers15020475>

41. Moon, H. J., Park, S. Y., Lee, S. H., Kang, C. D., & Kim, S. H. (2019). Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Sensitize CD44-Overexpressing Cancer Cells to Hsp90 Inhibitor Through Autophagy Activation. *Oncology research*, 27(7), 835–847. <https://doi.org/10.3727/096504019X15517850319579>

42. Endo, H., Yano, M., Okumura, Y., & Kido, H. (2014). Ibuprofen enhances the anticancer activity of cisplatin in lung cancer cells by inhibiting the heat shock protein 70. *Cell death & disease*, 5(1), e1027. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.550>

43. Hodkovicova, N., Hollerova, A., Blahova, J., Mikula, P., Crhanova, M., Karasova, D., ... Svobodova, Z. (2022). Non-steroidal anti-inflammatory drugs caused an outbreak of inflammation and oxidative stress with changes in the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Science of the total environment*, 849, 157921. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157921>

44. Gunaydin, C., & Bilge, S. S. (2018). Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs at the Molecular Level. *The Eurasian journal of medicine*, 50(2), 116–121. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2018.0010>

45. Klomjit, N., & Ungprasert, P. (2022). Acute kidney injury associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *European journal of internal medicine*, 101, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2022.05.003>

46. Federica, S., Francesco, C., Sabrina, D., Marco, G., Margherita, M., Francesca, R., Noemi Irma, B., Giorgio, M., & Giovanni, T. (2023). Inflammatory Bowel Diseases: An Updated Overview on the Heat Shock Protein Involvement. *International journal of molecular sciences*, 24(15), 12129. <https://doi.org/10.3390/ijms241512129>

47. Kvivik, I., Grimstad, T., Bårdsen, K., Jonsson, G., Kvaløy, J. T., & Omdal,

R. (2023). High mobility group box 1 and a network of other biomolecules influence fatigue in patients with Crohn's disease. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 29(1), 81. <https://doi.org/10.1186/4>

48. Gong, M., Zhang, F., Miao, Y., & Niu, J. (2022). Advances of Heat Shock Family in Ulcerative Colitis. *Frontiers in pharmacology*, 13, 869–930. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.869930>

49. Kim, B. Y., Son, Y., Eo, S. K., Park, Y. C., & Kim, K. (2016). Diclofenac inhibits 27-hydroxycholesterol-induced inflammation. *Biochemical and biophysical research communications*, 478(3), 1456–1461. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.145>

50. Sakai, A. (1996). Diclofenac inhibits endothelial cell adhesion molecule expression induced with lipopolysaccharide. *Life sciences*, 58(26), 2377–2387. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(96\)00241-x](https://doi.org/10.1016/0024-3205(96)00241-x)

51. Nackiewicz, J., Kołodziej, Ł., Poliwoda, A., & Broda, M. A. (2021). Oxidation of diclofenac in the presence of iron(II) octacarboxyphthalocyanine. *Chemosphere*, 265, 129–145. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129145>

52. Sokołowska, P., Siatkowska, M., Józwiak-Bębenista, M., Komorowski, P., Koptas, M., Kowalczyk, E., & Wiktorowska-Owczarek, A. (2022). Diclofenac Diminished the Unfolded Protein Response (UPR) Induced by Tunicamycin in Human Endothelial Cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(11), 34–49. <https://doi.org/10.3390/molecules27113449>

53. Peng, B., Ling, X., Huang, T., & Wan, J. (2023). HSP70 via HIF-1 α SUMOylation inhibits ferroptosis inducing lung cancer recurrence after insufficient radiofrequency ablation. *PloS one*, 18(11), e0294263. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294263>

54. Mathiou, V., Tsiambas, E., Maipas, S., Thymara, I., Mastronikoli, S., Peschos, D., Tsamis, K. I., Lazaris, A. C., Kavantzias, N., & Stathopoulos, P. (2023). Heat Shock Proteins' Expression Profiles in Odontogenic Ameloblastomas and Cysts. *Cancer diagnosis & prognosis*, 3(6), 635–638. <https://doi.org/10.21873/cdp.10265>

55. Ishihara, T., Suemasu, S., Asano, T., Tanaka, K., & Mizushima, T. (2011).

Stimulation of gastric ulcer healing by heat shock protein 70. *Biochemical pharmacology*, 82(7), 728–736. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.06.030>

56. El-Shiekh, R. A., Salama, A., Al-Mokaddem, A. K., Bader, A., & Abdel-Sattar, E. A. (2021). Russelioside B; A pregnane glycoside for treatment of gastric ulcer via modulation of heat shock protein-70 and vascular endothelial growth factor. *Steroids*, 165, 108759. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108759>

57. Mohamed, W. A., Abd-Elhakim, Y. M., & Ismail, S. A. A. (2019). Involvement of the anti-inflammatory, anti-apoptotic, and anti-secretory activity of bee venom in its therapeutic effects on acetylsalicylic acid-induced gastric ulceration in rats. *Toxicology*, 419, 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.03.003>

58. Asano, T., Tanaka, K., Yamakawa, N., Adachi, H., Sobue, G., Goto, H., Takeuchi, K., & Mizushima, T. (2009). HSP70 confers protection against indomethacin-induced lesions of the small intestine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 330(2), 458–467. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.152181>

59. Neamatallah, T. (2023). Caffeic acid phenethyl ester attenuates indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02730-z>

60. Khotib, J., Rahmadi, M., Ardianto, C., Nisak, K., Oktavia, R., Ratnasari, A., Dinintia, Y., Shinta, D. W., Aryani, T., & Suharjono. (2019). Selective serotonin reuptake inhibitor fluvoxamine ameliorates stress- and NSAID-induced peptic ulcer possibly by involving HSP70. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 30(2), 195–203. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2018-0067>

61. Beyer, I., Njemini, R., Bautmans, I., Demanet, C., & Mets, T. (2012). Immunomodulatory effect of NSAID in geriatric patients with acute infection: effects of piroxicam on chemokine/cytokine secretion patterns and levels of heat shock proteins. A double-blind randomized controlled trial. (ISRCTN58517443). *Cell stress & chaperones*, 17(2), 255–265. <https://doi.org/10.1007/s12192-011-0304-4>

62. Lee, J., Kim, M. H., & Kim, H. (2022). Anti-Oxidant and Anti-

Inflammatory Effects of Astaxanthin on Gastrointestinal Diseases. *International journal of molecular sciences*, 23(24), 15471. <https://doi.org/10.3390/ijms232415471>

63. Hirata, I., Naito, Y., Handa, O., Hayashi, N., Mizushima, K., Adachi, S., ... Yoshikawa, T. (2009). Heat-shock protein 70-overexpressing gastric epithelial cells are resistant to indomethacin-induced apoptosis. *Digestion*, 79(4), 243–250. <https://doi.org/10.1159/000215352>

64. Guarnieri, T. (2016). Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs As Gatekeepers Of Colon Carcinoma Highlight New Scenarios Beyond Cyclooxygenases Inhibition. *Current cancer drug targets*, 16(2), 186–197. <https://doi.org/10.2174/1568009615666150827093012>

65. Fajardo, A. M., & Piazza, G. A. (2015). Chemoprevention in gastrointestinal physiology and disease. Anti-inflammatory approaches for colorectal cancer chemoprevention. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 309(2), G59–G70. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00101.2014>

66. Aliabadi, A., Khanniri, E., Mahboubi-Rabbani, M., & Bayanati, M. (2023). Dual COX-2/15-LOX inhibitors: A new avenue in the prevention of cancer. *European journal of medicinal chemistry*, 261, 115866. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115866>

67. Gurpinar, E., Grizzle, W. E., & Piazza, G. A. (2014). Piazza; NSAIDs Inhibit Tumorigenesis, but How? *Clin Cancer Res*, 20(5), 1104–1113. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1573>

68. Ganduri, V., Rajasekaran, K., Duraiyaran, S., Adefuye, M. A., & Manjunatha, N. (2022). Colorectal Carcinoma, Cyclooxygenases, and COX Inhibitors. *Cureus*, 14(8), e28579. <https://doi.org/10.7759/cureus.28579>

69. Gadi, V., & Shetty, S. R. (2022). Potential of Anti-inflammatory Molecules in the Chemoprevention of Breast Cancer. *Recent advances in inflammation & allergy drug discovery*, 16(2), 60–76. <https://doi.org/10.2174/2772270816666220829090716>

70. Kolawole, O. R., & Kashfi, K. (2022). NSAIDs and Cancer Resolution: New Paradigms beyond Cyclooxygenase. *International journal of molecular*

sciences, 23(3), 1432. <https://doi.org/10.3390/ijms23031432>

71. Sahin, I. H., Hassan, M. M., & Garrett, C. R. (2014). Impact of non-steroidal anti-inflammatory drugs on gastrointestinal cancers: current state-of-the science. *Cancer letters*, 345(2), 249–257.

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.09.001>

72. Fletcher, R., Tong, J., Risnik, D., Leibowitz, B. J., Wang, Y.-J., Concha-Benavente, F., ... Zhang, L. (2021). Non-steroidal anti-inflammatory drugs induce immunogenic cell death in suppressing colorectal tumorigenesis. *Oncogene*, 40(11), 2035–2050. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01687-8>

73. Barber, L. E., Bertrand, K. A., Sheehy, S., White, L. F., Roy, H. K., Rosenberg, L., Palmer, J. R., & Petrick, J. L. (2023). Aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drug use and occurrence of colorectal adenoma in Black American women. *International journal of cancer*, 153(12), 1978–1987. <https://doi.org/10.1002/ijc.34674>

74. Fu, Q., Liao, H., Li, Z., Chen, X., Zhang, X., & Di, J. (2023). Preventive effects of 13 different drugs on colorectal cancer: a network meta-analysis. *Archives of medical science: AMS*, 19(5), 1428–1445. <https://doi.org/10.5114/aoms/167480>

75. Herbert, K., Kerr, R., Kerr, D. J., & Church, D. N. (2014). Are NSAIDs Coming Back to Colorectal Cancer Therapy or Not? *Current Colorectal Cancer Reports*, 10, 363–371 <https://doi.org/10.1007/s11888-014-0247-0>

76. Singer, E. A., Palapattu, G. S., & van Wijngaarden, E. (2008). Prostate-specific antigen levels in relation to consumption of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and acetaminophen: results from the 2001-2002 National Health and Nutrition Examination Survey. *Cancer*, 113(8), 2053–2057. <https://doi.org/10.1002/cncr.23806>

77. Efstathiou, M., & Settas, L. (2017). The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on matrix metalloproteinases levels in patients with osteoarthritis. *Mediterranean journal of rheumatology*, 28(3), 133–141. <https://doi.org/10.31138/mjr.28.3.133>

78. Owen, C., & Jojas-Quintero, J. (2016). Matrix metalloproteinases in cystic fibrosis: pathophysiologic and therapeutic perspectives. *Metalloproteinases In*

Medicine, 3, 49-62. <https://doi.org/10.2147/MNM.S96916>

79. Juurikka, K., Butler, G. S., Salo, T., Nyberg, P., & Åström, P. (2019). The Role of MMP8 in Cancer: A Systematic Review. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4506. <https://doi.org/10.3390/ijms20184506>

80. Koskensalo, S., Hagström, J., Linder, N., Lundin, M., Sorsa, T., Louhimo, J., & Haglund, C. (2012). Lack of MMP-9 expression is a marker for poor prognosis in Dukes' B colorectal cancer. *BMC clinical pathology*, 12, 24. <https://doi.org/10.1186/1472-6890-12-24>

81. Väyrynen, J. P., Vornanen, J., Tervahartiala, T., Sorsa, T., Bloigu, R., Salo, T., Tuomisto, A., & Mäkinen, M. J. (2012). Serum MMP-8 levels increase in colorectal cancer and correlate with disease course and inflammatory properties of primary tumors. *International journal of cancer*, 131(4), E463–E474. <https://doi.org/10.1002/ijc.26435>

82. Laitinen, A., Hagström, J., Mustonen, H., Kokkola, A., Tervahartiala, T., Sorsa, T., Böckelman, C., & Haglund, C. (2018). Serum MMP-8 and TIMP-1 as prognostic biomarkers in gastric cancer. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 40(9), 49–68. <https://doi.org/10.1177/1010428318799266>

83. Sirniö, P., Tuomisto, A., Tervahartiala, T., Sorsa, T., Klintrup, K., Karhu, T., ... Väyrynen, J. P. (2018). High-serum MMP-8 levels are associated with decreased survival and systemic inflammation in colorectal cancer. *British journal of cancer*, 119(2), 213–219. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0136-4>

84. Böckelman, C., Beilmann-Lehtonen, I., Kaprio, T., Koskensalo, S., Tervahartiala, T., Mustonen, H., Stenman, U. H., Sorsa, T., & Haglund, C. (2018). Serum MMP-8 and TIMP-1 predict prognosis in colorectal cancer. *BMC cancer*, 18(1), 679. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4589-x>

85. Liu, Y., Sethi, N. S., Hinoue, T., Schneider, B. G., Cherniack, A. D., Sanchez-Vega, F., ... Mariamidze, A. (2018). Comparative Molecular Analysis of Gastrointestinal Adenocarcinomas. *Cancer cell*, 33(4), 721–735. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.010>

86. Yu, H., Jiang, W., Chen, G., Yang, F., Zhao, X., Ji, Z., Ni, J., Fu, Y., Chen, F., & Zhao, B. (2019). Impact of Colon-Specific DNA Methylation-Regulated Gene Modules on Colorectal Cancer Patient Survival. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 25, 3549–3557. <https://doi.org/10.12659/MSM.916181>
87. Ibrahim, J., Op de Beeck, K., Fransen, E., Croes, L., Beyens, M., Suls, A., Vanden Berghe, W., Peeters, M., & Van Camp, G. (2019). Methylation analysis of Gasdermin E shows great promise as a biomarker for colorectal cancer. *Cancer medicine*, 8(5), 2133–2145. <https://doi.org/10.1002/cam4.2103>
88. Moss, J., Magenheim, J., Neiman, D., Zemmour, H., Loyfer, N., Korach, A., ... Dor, Y. (2018). Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nature communications*, 9(1), 50–68. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07466-6>
89. Guccione, E., & Richard, S. (2019). The regulation, functions and clinical relevance of arginine methylation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(10), 642–657. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0155-x>
90. Perovanovic, J., Dell'Orso, S., Gnochì, V. F., Jaiswal, J. K., Sartorelli, V., Vigouroux, C., Mamchaoui, K., Mouly, V., Bonne, G., & Hoffman, E. P. (2016). Laminopathies disrupt epigenomic developmental programs and cell fate. *Science translational medicine*, 8(335), 58. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad4991>
91. Yao, Z., Di Poto, C., Mavodza, G., Oliver, E., Ransom, H. W., & Sherif, Z. A. (2019). DNA Methylation Activates TP73 Expression in Hepatocellular Carcinoma and Gastrointestinal Cancer. *Scientific reports*, 9(1), 19367. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55945-7>
92. Wang, X., Zhang, D., Zhang, C., & Sun, Y. (2020). Identification of epigenetic methylation-driven signature and risk loci associated with survival for colon cancer. *Annals of translational medicine*, 8(6), 324. <https://doi.org/10.21037/atm.2020.02.94>
93. Steinke, J. W., & Wilson, J. M. (2016). Aspirin-exacerbated respiratory disease: pathophysiological insights and clinical advances. *Journal of asthma and*

allergy, 9, 37–43. <https://doi.org/10.2147/JAA.S88739>

94. Laidlaw, T. M., & Boyce, J. A. (2016). Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease--New Prime Suspects. *The New England journal of medicine*, 374(5), 484–488. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1514013>

95. Rodríguez-Jiménez, J. C., Moreno-Paz, F. J., Terán, L. M., & Guaní-Guerra, E. (2018). Aspirin exacerbated respiratory disease: Current topics and trends. *Respiratory medicine*, 135, 62–75. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2018.01.002>

96. Dahlin, A., & Weiss, S. T. (2016). Genetic and Epigenetic Components of Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *Immunology and allergy clinics of North America*, 36(4), 765–789. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2016.06.010>

97. Yiannakopoulou, E. (2014). Targeting epigenetic mechanisms and microRNAs by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory agents-implications for cancer treatment and chemoprevention. *Cellular oncology (Dordrecht)*, 37(3), 167–178. <https://doi.org/10.1007/s13402-014-0175-7>

98. Pham, D. L., Kim, J. H., Trinh, T. H., & Park, H. S. (2016). What we know about nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity. *The Korean journal of internal medicine*, 31(3), 417–432. <https://doi.org/10.3904/kjim.2016.085>

99. Lauschke, V. M., Zhou, Y., & Ingelman-Sundberg, M. (2019). Novel genetic and epigenetic factors of importance for inter-individual differences in drug disposition, response and toxicity. *Pharmacology & therapeutics*, 197, 122–152. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.01.002>

100. Lee, Y., Shin, Y. S., & Park, H. S. (2019). New phenotypes in hypersensitivity reactions to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 19(4), 302–307. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000541>

101. Trinh, H. K. T., Pham, L. D., Le, K. M., & Park, H. S. (2021). Pharmacogenomics of Hypersensitivity to Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs. *Frontiers in genetics*, 12, 647257. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.647257>

102. Wilson, L. E., Kim, S., Xu, Z., Harlid, S., Sandler, D. P., & Taylor, J. A. (2015). Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use and Genomic DNA Methylation

in Blood. *PLoS one*, 10(9), e0138920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138920>

103. Marra, P. S., Nishizawa, Y., Yamanashi, T., Sullivan, E. J., Comp, K. R., Crutchley, K. J., ... Shinozaki, G. (2023). NSAIDs use history: impact on the genome-wide DNA methylation profile and possible mechanisms of action. *Clinical and experimental medicine*, 23(7), 3509–3516. <https://doi.org/10.1007/s10238-023-01119-9>

104. Tahara, T., Shibata, T., Yamashita, H., Nakamura, M., Yoshioka, D., Okubo, M., Hirata, I., & Arisawa, T. (2009). Chronic nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) use suppresses multiple CpG islands hyper methylation (CIHM) of tumor suppressor genes in the human gastric mucosa. *Cancer science*, 100(7), 1192–1197. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01175.x>

105. Kashani, B., Zandi, Z., Pourbagheri-Sigaroodi, A., Bashash, D., & Ghaffari, S. H. (2021). The role of toll-like receptor 4 (TLR4) in cancer progression: A possible therapeutic target? *Journal of cellular physiology*, 236(6), 4121–4137. <https://doi.org/10.1002/jcp.30166>

106. Watanabe, T., Higuchi, K., Kobata, A., Nishio, H., Tanigawa, T., Shiba, M., Tominaga, K., Fujiwara, Y., Oshitani, N., Asahara, T., Nomoto, K., Takeuchi, K., & Arakawa, T. (2008). Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage is Toll-like receptor 4 dependent. *Gut*, 57(2), 181–187. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.125963>

107. Nadatani, Y., Watanabe, T., Tanigawa, T., Machida, H., Okazaki, H., Yamagami, H., Watanabe, K., Tominaga, K., Fujiwara, Y., & Arakawa, T. (2012). High mobility group box 1 promotes small intestinal damage induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs through Toll-like receptor 4. *The American journal of pathology*, 181(1), 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.03.039>

108. Biloglazov, V., Byeloglazova, K., & DuBuske L. (2011). Impact of a Polymorphisms of Toll Like Receptor 4 Genes on Anti-endotoxin Immunity in Patients with Rheumatoid Arthritis and Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Induced Gastropathy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(2), 228. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.12.907>.

109. Steckling, F. M., Lima, F. D., Farinha, J. B., Rosa, P. C., Royes, L. F. F., Cuevas, M. J., Bresciani, G., Soares, F. A., González-Gallego, J., & Barcelos, R. P. (2020). Diclofenac attenuates inflammation through TLR4 pathway and improves exercise performance after exhaustive swimming. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 30(2), 264–271. <https://doi.org/10.1111/sms.13579>

110. Chen, C.-Y., Kao, C.-L., & Liu, C.-M. (2018). The Cancer Prevention, Anti-Inflammatory and Anti-Oxidation of Bioactive Phytochemicals Targeting the TLR4 Signaling Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 27–29. <https://doi.org/10.3390/ijms19092729>

111. Kumar, V., Vashishta, M., Kong, L., Wu, X., Lu, J. J., Guha, C., & Dwarakanath, B. S. (2021). The Role of Notch, Hedgehog, and Wnt Signaling Pathways in the Resistance of Tumors to Anticancer Therapies. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 650–772. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.650772>

112. On the protection of animals used for scientific purposes: Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 site: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/TXT/?uri=CELEX:32010L0063>

113. Наказ МОЗ України від 01.03.2012 р. № 249. (2012). Порядок проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах. Доступно: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0416-12#Text>

114. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>

115. Стефанов, О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекомендації. К. Авіцена, 2002. 527с.

116. Чекман, І. С., & Губський, Ю. І. Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних нейропротективних препаратів. К. ДФЦ МОЗ України, 2010. 81 с.

117. John, R. Crowther. (2008). *ELISA: Theory and Practice* USA: Springer Science & Business Media.

118. Engvall, E. (2010). The ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical Chemistry*, 56 (2), 319–320. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.127803>
119. Reen, DJ. (1994). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Methods Mol Biol*, 32, 461–466. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-X:461>
120. Garcia-Gil, M., Tozzi, M. G., Balestri, F., Colombaioni, L., & Camici, M. (2016). Mitochondrial Damage and Apoptosis Induced by Adenosine Deaminase Inhibition and Deoxyadenosine in Human Neuroblastoma Cell Lines. *Journal of cellular biochemistry*, 117(7), 1671–1679. <https://doi.org/10.1002/jcb.25460>
121. Хоменко, Ж. М., Зильгараева, А. К., Павлов, С. В., & Безкревний, О. С. (2021). Застосування спектрофотометричних методів для дослідження оптичних показників біотканин. *Оптико-електронні інформаційно-енергетичні технології*, 39(1), 52–60. <https://doi.org/10.31649/1681-7893-2020-39-1-52-60>
122. Ketsa, O.V., Kutsak, N.B., & Marchenko, M.M. (2020). Effect of laser radiation on xanthine oxidase activity and superoxide radical generation in rat liver cytosol fraction. *The Animal Biology*, 22(2), 54–57. <https://doi.org/10.15407/animbiol22.02.054>
123. Giffard, R. G., & Yenari, M. A. (2004). Many mechanisms for HSP70 protection from cerebral ischemia. *Journal of neurosurgical anesthesiology*, 16(1), 53–61. <https://doi.org/10.1097/00008506-200401000-00010>
124. Sato, T., Nakamura, Y., Shiimura, Y., Ohgusu, H., Kangawa, K., & Kojima, M. (2012). Structure, regulation and function of ghrelin. *Journal of biochemistry*, 151(2), 119–128. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr134>
125. Von Roon, A. C., Karamountzos, L., Purkayastha, S., Reese, G. E., Darzi, A. W., Teare, J. P., Paraskeva, P., & Tekkis, P. P. (2007). Diagnostic precision of fecal calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy. *The American journal of gastroenterology*, 102(4), 803–813. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01126.x>
126. Bonetta, L. (2008). Detailed analysis. *Nature*, 454, 796–798. <https://doi.org/10.1038/454795a>
127. Liu, J., Xiao, Q., Xiao, J., Niu, C., Li, Y., Zhang, X., Zhou, Z., Shu, G., &

Yin, G. (2022). Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 3. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6>

128. Patel, T. N., & Dhanyamraju, P. K. (2021). Role of aberrant Sonic hedgehog signaling pathway in cancers and developmental anomalies. *Journal of biomedical research*, 36(1), 1–9. <https://doi.org/10.7555/JBR.35.20210139>

129. Ryan, E. P., Pollock, S. J., Kaur, K., Felgar, R. E., Bernstein, S. H., Chiorazzi, N., & Phipps, R. P. (2007). Cyclooxygenase-2 inhibition induces oxidative stress and decreases intracellular glutathione to reduce survival of human B lymphoma/leukemia cells. *Clinical Immunology*, 25(18), 76-90. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.12.012>

130. Brandolini, L., Antonosante, A., Giorgio, C., Bagnasco, M., d'Angelo, M., Castelli, V., Benedetti, E., Cimini, A., & Allegretti, M. (2020). NSAIDs-dependent adaption of the mitochondria-proteasome system in immortalized human cardiomyocytes. *Scientific reports*, 10(1), 18337. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75394-x>

131. Battelli, M. G., Polito, L., Bortolotti, M., & Bolognesi, A. (2016). Xanthine oxidoreductase in cancer: more than a differentiation marker. *Cancer medicine*, 5(3), 546–557. <https://doi.org/10.1002/cam4.601>

132. Liu, D., Yun, Y., Yang, D., Hu, X., Dong, X., Zhang, N., Zhang, L., Yin, H., & Duan, W. (2019). What Is the Biological Function of Uric Acid? An Antioxidant for Neural Protection or a Biomarker for Cell Death. *Disease markers*, 2019, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/4081962>

133. Garcia-Gil, M., Tozzi, M. G., Balestri, F., Colombaioni, L., & Camici, M. (2016). Mitochondrial Damage and Apoptosis Induced by Adenosine Deaminase Inhibition and Deoxyadenosine in Human Neuroblastoma Cell Lines. *Journal of cellular biochemistry*, 117(7), 1671–1679. <https://doi.org/10.1002/jcb.25460>

134. Thai, P. N., Ren, L., Xu, W., Overton, J., Timofeyev, V., Nader, C. E., ... Sirish, P. (2023). Chronic Diclofenac Exposure Increases Mitochondrial Oxidative Stress, Inflammatory Mediators, and Cardiac Dysfunction. *Cardiovascular drugs and*

therapy, 37(1), 25–37. <https://doi.org/10.1007/s10557-021-07253-4>

135. Gräff, J., Kim, D., Dobbin, M. M., & Tsai, L. H. (2011). Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiological reviews*, 91(2), 603–649. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2010>

136. Kong, J. H., Siebold, C., & Rohatgi, R. (2019). Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling. *Development (Cambridge, England)*, 146(10), dev166892. <https://doi.org/10.1242/dev.166892>

137. Panchal, N. K., & Prince Sabina, E. (2023). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): A current insight into its molecular mechanism eliciting organ toxicities. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 172, 113598. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113598>

138. Cui, Q., Wang, J. Q., Assaraf, Y. G., Ren, L., Gupta, P., Wei, L., Ashby, C. R., Jr, Yang, D. H., & Chen, Z. S. (2018). Modulating ROS to overcome multidrug resistance in cancer. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 41, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2018.11.001>

139. Tian, D., Shi, Y., Chen, D., Liu, Q., & Fan, F. (2017). The Wnt inhibitor LGK-974 enhances radiosensitivity of HepG2 cells by modulating Nrf2 signaling. *International journal of oncology*, 51(2), 545–554. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4042>

140. Diaz-Vivancos, P., de Simone, A., Kiddle, G., & Foyer, C. H. (2015). Glutathione--linking cell proliferation to oxidative stress. *Free radical biology & medicine*, 89, 1154–1164. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.09.023>

141. García-Giménez, J. L., Romá-Mateo, C., Pérez-Machado, G., Peiró-Chova, L., & Pallardó, F. V. (2017). Role of glutathione in the regulation of epigenetic mechanisms in disease. *Free radical biology & medicine*, 112, 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.07.008>

142. Cyr, A. R., & Domann, F. E. (2011). The redox basis of epigenetic modifications: from mechanisms to functional consequences. *Antioxidants & redox*

signaling, 15(2), 551–589. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3492>

143. Бурлака, К. А., & Павлов, С. В. (2022). MMP8- і HSP70-опосередкована ульцерогенна дія нестероїдних протизапальних засобів за тривалого введення. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 15(6), 372–379. <https://doi.org/10.33250/15.06.372>

144. Бурлака, К. А., & Павлов, С. В. (2023). Опосередкована TL4-рецепторами побічна дія нестероїдних протизапальних лікарських засобів за тривалого застосування. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 17(4), 240–247. <https://doi.org/10.33250/17.04.240>

145. Бурлака, К. А., & Павлов, С. В. (2023). Вплив тривалого введення нестероїдних протизапальних лікарських засобів на розвиток оксидативного, нітрозуючого стресів, метаболізм пуринів, сечової кислоти та вміст фекального кальпротектину у тканих кишківника. *Збірник тез доповідей V науково-практичної конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації»* (18 трав. 2023 р., м. Харків). 90.

146. Tomida, C., Nagano, H., Yamagishi, N., Uchida, T., Ohno, A., Hirasaka, K., Nikawa, T., & Teshima-Kondo, S. (2017). Regorafenib induces adaptive resistance of colorectal cancer cells via inhibition of vascular endothelial growth factor receptor. *The journal of medical investigation: JMI*, 64(3.4), 262–265. <https://doi.org/10.2152/jmi.64.262>

147. Mayer, M. P., & Gierasch, L. M. (2019). Recent advances in the structural and mechanistic aspects of HSP70 molecular chaperones. *The Journal of biological chemistry*, 294(6), 2085–2097. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.002810>

148. Edkins, A. L., & Boshoff, A. (2021). General Structural and Functional Features of Molecular Chaperones. *Advances in experimental medicine and biology*, 1340, 11–73. https://doi.org/10.1007/978-3-030-78397-6_2

149. Temby, M., Boye, T. L., Hoang, J., Nielsen, O. H., & Gubatan, J. (2023). Kinase Signaling in Colitis-Associated Colon Cancer and Inflammatory Bowel Disease. *Biomolecules*, 13(11), 16–20. <https://doi.org/10.3390/biom13111620>

150. Thrift, A. P., & El-Serag, H. B. (2020). Burden of Gastric Cancer. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 18(3), 534–542. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2019.07.045>

151. Lin, Y., Zheng, Y., Wang, H. L., & Wu, J. (2021). Global Patterns and Trends in Gastric Cancer Incidence Rates (1988-2012) and Predictions to 2030. *Gastroenterology*, 161(1), 116–127. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.03.023>

152. Zhou, W., Guo, S., Liu, M., Burow, M. E., & Wang, G. (2019). Targeting CXCL12/CXCR4 Axis in Tumor Immunotherapy. *Current medicinal chemistry*, 26(17), 3026–3041. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170830111531>

153. Rérole, A. L., Jego, G., & Garrido, C. (2011). HSP70: anti-apoptotic and tumorigenic protein. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 787, 205–230. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-295-3_16

154. Kumar, S., Stokes, J., 3rd, Singh, U. P., Scissum Gunn, K., Acharya, A., Manne, U., & Mishra, M. (2016). Targeting HSP70: A possible therapy for cancer. *Cancer letters*, 374(1), 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.056>

155. Ciocca, D. R., & Calderwood, S. K. (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell stress & chaperones*, 10(2), 86–103. <https://doi.org/10.1379/csc-99r.1>

156. Ray, S., Lu, Y., Kaufmann, S. H., Gustafson, W. C., Karp, J. E., Boldogh, I., Fields, A. P., & Brasier, A. R. (2004). Genomic mechanisms of p210BCR-ABL signaling: induction of heat shock protein 70 through the GATA response element confers resistance to paclitaxel-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 279(34), 35604–35615. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401851200>

157. Hatfield, M. P., & Lovas, S. (2012). Role of HSP70 in cancer growth and survival. *Protein and peptide letters*, 19(6), 616–624. <https://doi.org/10.2174/092986612800493968>

158. Wang, W., Ji, W., Hu, H., Ma, J., Li, X., Mei, W., Xu, Y., Hu, H., Yan, Y., Song, Q., Li, Z., & Su, C. (2014). Survivin promoter-regulated oncolytic adenovirus with HSP70 gene exerts effective antitumor efficacy in gastric cancer

immunotherapy. *Oncotarget*, 5(1), 150–160.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.1430>

159. Cabral-Pacheco, G. A., Garza-Veloz, I., Castruita-De la Rosa, C., Ramirez-Acuña, J. M., Perez-Romero, B. A., Guerrero-Rodriguez, J. F., ... Martinez-Fierro, M. L. (2020). The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9739. <https://doi.org/10.3390/ijms21249739>

160. Lugowska, I., Kowalska, M., Fuksiewicz, M., Kotowicz, B., Mierzejewska, E., Koseła-Paterczyk, H., Szamotulska, K., & Rutkowski, P. (2015). Serum markers in early-stage and locally advanced melanoma. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(11), 8277–8285. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3564-2>

161. Salmiheimo, A., Mustonen, H., Stenman, U. H., Puolakkainen, P., Kempainen, E., Seppänen, H., & Haglund, C. (2016). Systemic Inflammatory Response and Elevated Tumour Markers Predict Worse Survival in Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *PloS one*, 11(9), e0163064. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163064>

162. Mondal, S., Adhikari, N., Banerjee, S., Amin, S. A., & Jha, T. (2020). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview. *European journal of medicinal chemistry*, 194, 112260. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112260>

163. Pittayapruerk, P., Meephansan, J., Prapapan, O., Komine, M., & Ohtsuki, M. (2016). Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *International journal of molecular sciences*, 17(6), 868. <https://doi.org/10.3390/ijms17060868>

164. Miguel, A. F. P., Mello, F. W., Melo, G., & Rivero, E. R. C. (2020). Association between immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases and metastasis in oral squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis. *Head & neck*, 42(3), 569–584. <https://doi.org/10.1002/hed.26009>

165. Pezeshkian, Z., Nobili, S., Peyravian, N., Shojaee, B., Nazari, H.,

Soleimani, H., ... Mini, E. (2021). Insights into the Role of Matrix Metalloproteinases in Precancerous Conditions and in Colorectal Cancer. *Cancers*, 13(24), 6226. <https://doi.org/10.3390/cancers13246226>

166. Herszényi, L., Hritz, I., Lakatos, G., Varga, M. Z., & Tulassay, Z. (2012). The behavior of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*, 13(10), 13240–13263. <https://doi.org/10.3390/ijms131013240>

167. Kicman, A., Niczyporuk, M., Kulesza, M., Motyka, J., & Ławicki, S. (2022). Utility of Matrix Metalloproteinases in the Diagnosis, Monitoring and Prognosis of Ovarian Cancer Patients. *Cancer management and research*, 14, 3359–3382. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S385658>

168. Matuszyk, A., Ceranowicz, P., Warzecha, Z., Cieszkowski, J., Bonior, J., Jaworek, J., Kuśnierz-Cabala, B., Konturek, P., Ambroży, T., & Dembiński, A. (2016). Obestatin Accelerates the Healing of Acetic Acid-Induced Colitis in Rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 2834386. <https://doi.org/10.1155/2016/2834386>

169. Lyra Junior, H. F., Rodrigues, I. K., Schiavon, L. L., & D Acâmpora, A. J. (2018). Ghrelin and gastrointestinal wound healing. A new perspective for colorectal surgery. *Acta cirurgica brasileira*, 33(3), 282–294. <https://doi.org/10.1590/s0102-865020180030000010>

170. Wu, C. S., Wei, Q., Wang, H., Kim, D. M., Balderas, M., Wu, G., Lawler, J., Safe, S., Guo, S., Devaraj, S., Chen, Z., & Sun, Y. (2020). Protective Effects of Ghrelin on Fasting-Induced Muscle Atrophy in Aging Mice. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 75(4), 621–630. <https://doi.org/10.1093/gerona/gly256>

171. Fang, C., Xu, H., Guo, S., Mertens-Talcott, S. U., & Sun, Y. (2018). Ghrelin Signaling in Immunometabolism and Inflamm-Aging. *Advances in experimental medicine and biology*, 1090, 165–182. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1286-1_9

172. Stempniewicz, A., Ceranowicz, P., & Warzecha, Z. (2019). Potential

Therapeutic Effects of Gut Hormones, Ghrelin and Obestatin in Oral Mucositis. *International journal of molecular sciences*, 20(7), 1534. <https://doi.org/10.3390/ijms20071534>

173. Ma, Y., Zhang, H., Guo, W., & Yu, L. (2022). Potential role of ghrelin in the regulation of inflammation. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 36(9), e22508. <https://doi.org/10.1096/fj.202200634R>

174. Koutouratsas, T., Kalli, T., Karamanolis, G., & Gazouli, M. (2019). Contribution of ghrelin to functional gastrointestinal disorders' pathogenesis. *World journal of gastroenterology*, 25(5), 539–551. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i5.539>

175. Sipponen, T., Kärkkäinen, P., Savilahti, E., Kolho, K. L., Nuutinen, H., Turunen, U., & Färkkilä, M. (2008). Correlation of faecal calprotectin and lactoferrin with an endoscopic score for Crohn's disease and histological findings. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 28(10), 1221–1229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2008.03835.x>

176. Jukic, A., Bakiri, L., Wagner, E. F., Tilg, H., & Adolph, T. E. (2021). Calprotectin: from biomarker to biological function. *Gut*, 70(10), 1978–1988. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-324855>

177. Ayling, R. M., & Kok, K. (2018). Fecal Calprotectin. *Advances in clinical chemistry*, 87, 161–190. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.07.005>

178. Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7), 1073–1081. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp127>

179. Stríz, I., & Trebichavský, I. (2004). Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *PubMed*, 53(3), 245–253. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15209531/>

180. Alibrahim, B., Aljasser, M. I., & Salh, B. (2015). Fecal calprotectin use in inflammatory bowel disease and beyond: A mini-review. *Canadian journal of gastroenterology & hepatology*, 29(3), 157–163. <https://doi.org/10.1155/2015/950286>

181. Павлов, С. В., & Бурлака, К. А. (2022). Молекулярний механізм ультрогенної дії нестероїдних протизапальних лікарських засобів при їх тривалому введенні у щурів. *Матеріали I Міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики та громадського здоров'я»* (15 лист. 2022 р., м. Житомир). 212-213.

182. Fischer, S. M., Hawk, E. T., & Lubet, R. A. (2011). Coxibs and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs in animal models of cancer chemoprevention. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 4(11), 1728–1735. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0166>

183. Gurpinar, E., Grizzle, W. E., & Piazza, G. A. (2013). COX-Independent Mechanisms of Cancer Chemoprevention by Anti-Inflammatory Drugs. *Frontiers in oncology*, 3, 181. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00181>

184. Pantziarka, P., Sukhatme, V., Bouche, G., Meheus, L., & Sukhatme, V. P. (2016). Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-diclofenac as an anti-cancer agent. *Ecancermedicalscience*, 10, 610. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2016.610>

185. Soto Ocaña, J., Bayard, N. U., Hart, J. L., Thomas, A. K., Furth, E. E., Lacy, D. B., Aronoff, D. M., & Zackular, J. P. (2023). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs sensitize epithelial cells to *Clostridioides difficile* toxin-mediated mitochondrial damage. *Science advances*, 9(29), eadh5552. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adh5552>

186. Ganesan, A., Arimondo, P. B., Rots, M. G., Jeronimo, C., & Berdasco, M. (2019). The timeline of epigenetic drug discovery: from reality to dreams. *Clinical epigenetics*, 11(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0776-0>

187. Biswas, S., & Rao, C. M. (2018). Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *European journal of pharmacology*, 837, 8–24. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.08.021>

188. Han, M., Jia, L., Lv, W., Wang, L., & Cui, W. (2019). Epigenetic Enzyme Mutations: Role in Tumorigenesis and Molecular Inhibitors. *Frontiers in oncology*, 9, 194. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00194>

189. Ilango, S., Paital, B., Jayachandran, P., Padma, P. R., & Nirmaladevi, R.

(2020). Epigenetic alterations in cancer. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 25(6), 1058–1109. <https://doi.org/10.2741/4847>

190. Kaixiang, Cao, & Ali, Shilatifard. (2019). Enhancers in Cancer: Genetic and Epigenetic Deregulation. *Biomedical Sciences*, 2019, 559-568, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65063-8>

191. Nishiyama, A., & Nakanishi, M. (2021). Navigating the DNA methylation landscape of cancer. *Trends in genetics: TIG*, 37(11), 1012–1027. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.05.002>

192. Prado-Romero, D. L., & Medina-Franco, J. L. (2021). Advances in the Exploration of the Epigenetic Relevant Chemical Space. *ACS omega*, 6(35), 22478–22486. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c03389>

193. Gul, S. (2017). Epigenetic assays for chemical biology and drug discovery. *Clinical epigenetics*, 9, 41. <https://doi.org/10.1186/s13148-017-0342-6>

194. Achinger-Kawecka, J., Valdes-Mora, F., Luu, P.-L., Giles, K. A., Caldon, C. E., Qu, W., ... Clark, S. J. (2020). Epigenetic reprogramming at estrogen-receptor binding sites alters 3D chromatin landscape in endocrine-resistant breast cancer. *Nature communications*, 11(1), 320. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14098-x>

195. Lee, J. U., Soo Chang, H., Kyung Kim, M., Park, S. L., Kim, J. H., Park, J. S., & Park, C. S. (2022). Genome-wide DNA methylation profile of peripheral blood lymphocytes from subjects with nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced respiratory diseases. *Pharmacogenetics and genomics*, 32(6), 226–234. <https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000475>

196. Mavioglu, R. N., Ramo-Fernandez, L., Gump, A. M., Kolassa, I. T., & Karabatsiakakis, A. (2022). A history of childhood maltreatment is associated with altered DNA methylation levels of DNA methyltransferase 1 in maternal but not neonatal mononuclear immune cells. *Frontiers in psychiatry*, 13, 945343. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.945343>

197. Müller, D., & Györfy, B. (2022). DNA methylation-based diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in colorectal cancer. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, 1877(3), 188722.

<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188722>

198. Wang, Y., Chen, P. M., & Liu, R. B. (2018). Advance in plasma SEPT9 gene methylation assay for colorectal cancer early detection. *World journal of gastrointestinal oncology*, *10*(1), 15–22. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v10.i1.15>

199. Piotrowski, I., Kulcenty, K., & Suchorska, W. (2020). Interplay between inflammation and cancer. *Reports of practical oncology and radiotherapy: journal of Great Poland Cancer Center in Poznan and Polish Society of Radiation Oncology*, *25*(3), 422–427. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2020.04.004>

200. Bhogal, B., Weir, B. A., Crescenzo, R., Marien, A., Kwon, M. C., Philippar, U., & Cowley, G. S. (2022). The methyltransferase domain of DNMT1 is an essential domain in acute myeloid leukemia independent of DNMT3A mutation. *Communications biology*, *5*(1), 1174. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04139-5>

201. Takeuchi, K., Smale, S., Premchand, P., Maiden, L., Sherwood, R., Thjodleifsson, B., Bjornsson, E., & Bjarnason, I. (2006). Prevalence and mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced clinical relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, *4*(2), 196–202. [https://doi.org/10.1016/s1542-3565\(05\)00980-8](https://doi.org/10.1016/s1542-3565(05)00980-8)

202. Hil'ovská, L., Jendželovský, R., & Fedoročko, P. (2015). Potency of non-steroidal anti-inflammatory drugs in chemotherapy (Review). *Molecular and Clinical Oncology*, *3*, 3–12. <https://doi.org/10.3892/mco.2014.446>

203. Vane, J.R., & Botting, R.M. (2003). The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis Research*, *110*(5–6), 255–258, [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(03\)00379-7](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(03)00379-7)

204. Pastille, E., Faßnacht, T., Adamczyk, A., Ngo Thi Phuong, N., Buer, J., & Westendorf, A. M. (2021). Inhibition of TLR4 Signaling Impedes Tumor Growth in Colitis-Associated Colon Cancer. *Frontiers in immunology*, *12*, 669747. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.669747>

205. Burgueño, J. F., & Abreu, M. T. (2020). Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis and disease. *Nature reviews. Gastroenterology &*

hepatology, 17(5), 263–278. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0261-4>

206. Gill, R., Tsung, A., & Billiar, T. (2010). Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free radical biology & medicine*, 48(9), 1121–1132. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.006>

207. Li, J., Yang, F., Wei, F., & Ren, X. (2017). The role of toll-like receptor 4 in tumor microenvironment. *Oncotarget*, 8(39), 66656–66667. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19105>

208. Zhan, T., Rindtorff, N., & Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, 36(11), 1461–1473. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.304>

209. Bailey, J. M., Mohr, A. M., & Hollingsworth, M. A. (2009). Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer. *Oncogene*, 28(40), 3513–3525. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.220>

210. Plotnikova, O. V., Golemis, E. A., & Pugacheva, E. N. (2008). Cell cycle-dependent ciliogenesis and cancer. *Cancer research*, 68(7), 2058–2061. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5838>

211. Veitonmäki, T., Murtola, T. J., Määtänen, L., Taari, K., Stenman, U. H., Tammela, T. L., & Auvinen, A. (2014). Prostate cancer risk and nonsteroidal antiinflammatory drug use in the Finnish prostate cancer screening trial. *British journal of cancer*, 111(7), 1421–1431. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.381>

212. Burlaka, K. A. (2023). Influence of long-term administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the level of whole genome dna methylation and its fragmentation in rats. *Bulletin of Problems Biology and Medicine*, 1(1), 114–119. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2023-1-168-114-119>

213. Павлов, С. В., & Бурлака, К. А. Можливий епігенетичний вплив нестероїдних протизапальних лікарських засобів на шлунково-кишковий тракт. *Тези науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасні питання молекулярно-біохімічних досліджень та лабораторного скринінгу у клінічній та експериментальній медицині 2020»* (05-06 бер. 2020 р., м. Запоріжжя). 42.

214. Павлов, С. В., & Бурлака, К. А. Вплив тривалого введення нестероїдних протизапальних засобів на рівень повногеномного метилювання днк, її фрагментації, вміст білків wnt, hedgehog - сигналіngu та гену c-kit. Матеріали VI науково-практичної internet-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція» (16 лист. 2023 р., м. Харків,). 118-120.

215. Montinari, M. R., Minelli, S., & De Caterina, R. (2019). The first 3500 years of aspirin history from its roots - A concise summary. *Vascular pharmacology*, *113*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.10.008>

216. Terzi, M., Altun, G., Şen, S., Kocaman, A., Kaplan, A. A., Yurt, K. K., & Kaplan, S. (2018). The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in neurological diseases. *Journal of chemical neuroanatomy*, *87*, 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2017.03.003>

217. Robb, C. T., Goepf, M., Rossi, A. G., & Yao, C. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs, prostaglandins, and COVID-19. *British journal of pharmacology*, *177*(21), 4899–4920. <https://doi.org/10.1111/bph.15206>

218. Alison, B. (2017). *Martindale: The Complete Drug Reference (39th ed.)*. London: Pharmaceutical Press. ISBN 978-0857113092

219. Bindu, S., Mazumder, S., & Bandyopadhyay, U. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical pharmacology*, *180*, 114–147. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>

220. Sandoval-Acuña, C., Lopez-Alarcón, C., Aliaga, M. E., & Speisky, H. (2012). Inhibition of mitochondrial complex I by various non-steroidal anti-inflammatory drugs and its protection by quercetin via a coenzyme Q-like action. *Chemico-biological interactions*, *199*(1), 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.05.006>

221. Mazumder, S., De, R., Sarkar, S., Siddiqui, A. A., Saha, S. J., Banerjee, C., Iqbal, M. S., Nag, S., Debsharma, S., & Bandyopadhyay, U. (2016). Selective scavenging of intra-mitochondrial superoxide corrects diclofenac-induced

mitochondrial dysfunction and gastric injury: A novel gastroprotective mechanism independent of gastric acid suppression. *Biochemical pharmacology*, *121*, 33–51. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.027>

222. Mazumder, S., De, R., Debsharma, S., Bindu, S., Maity, P., Sarkar, S., ... Bandyopadhyay, U. (2019). Indomethacin impairs mitochondrial dynamics by activating the PKC-p38-DRP1 pathway and inducing apoptosis in gastric cancer and normal mucosal cells. *The Journal of biological chemistry*, *294*(20), 8238–8258. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004415>

223. Campos, A. C., Molognoni, F., Melo, F. H., Galdieri, L. C., Carneiro, C. R., D'Almeida, V., Correa, M., & Jasiulionis, M. G. (2007). Oxidative stress modulates DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *9*(12), 1111–1121. <https://doi.org/10.1593/neo.07712>

224. Jiménez-Garza, O., Guo, L., Byun, H. M., Carrieri, M., Bartolucci, G. B., Zhong, J., & Baccarelli, A. A. (2017). Promoter methylation status in genes related with inflammation, nitrosative stress and xenobiotic metabolism in low-level benzene exposure: Searching for biomarkers of oncogenesis. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, *109*(Pt 1), 669–676. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.019>

225. Pogribny, I. P., Shpyleva, S. I., Muskhelishvili, L., Bagnyukova, T. V., James, S. J., & Beland, F. A. (2009). Role of DNA damage and alterations in cytosine DNA methylation in rat liver carcinogenesis induced by a methyl-deficient diet. *Mutation research*, *669*(1-2), 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.05.003>

226. Lanovenko, I., & Gaschuk, A. (2022). Reactivity and interaction of glutathione of erythrocytes and oxygen blood transport function in haemic hypoxia of hemolytic genesis. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine*, *4*, 106–114. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2022.04.106>

227. Rubio, K., Hernández-Cruz, E. Y., Rogel-Ayala, D. G., Sarvari, P., Isidoro, C., Barreto, G., & Pedraza-Chaverri, J. (2023). Nutriepigenomics in Environmental-

Associated Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(3), 771.
<https://doi.org/10.3390/antiox12030771>

228. Cui, N., Hu, M., & Khalil, R. A. (2017). Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Progress in molecular biology and translational science*, 147, 1–73. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.005>

ДОДАТОК А1

«Затверджую»

Директор ННЦ
«Інститут біології та медицини»
Київського національного
університету імені Тараса Шевченка
Остапченко Л.І.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

айменування пропозиції: молекулярно-біохімічні та генетичні методи скринінгу побічної дії лікарських засобів.

станова-розробник, автор: Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, МОЗ України, кафедра клінічної лабораторної діагностики (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського 26), асистент Бурлака К.А.

жерела інформації: Вплив тривалого введення нестероїдних протизапальних засобів на рівень повногеномного метилювання ДНК та її фрагментації у шурів. Бурлака К. А. / Вісник проблем біології та медицини. 2023. Вип. 1 (168). С. 114– протизапальних лікарських засобів на шлунково-кишковий тракт// Збірник тез та доповідей науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасні питання молекулярно-біохімічних досліджень та лабораторного скринінгу у клінічній та експериментальній медицині 2020». - 2020р. – 58с.

е і коли введено: кафедра клінічної медицини Київського національного університету ім. Тараса Шевченка, квітень-травень 2023 р.

езультати застосування методу: матеріали дослідження введено у навчальний процес кафедри клінічної медицини на практичних та лекційних заняттях з навчальної дисципліни «Вплив фармакологічних препаратів на лабораторні показники»

фективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелах інформації (п. 3): використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо лабораторного моніторингу побічної дії лікарських засобів, зокрема НПЛЗ.

ауваження та пропозиції: Не вносилися.

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедри клінічної медицини
ННЦ «Інститут біології та медицини»
КНУ імені Тараса Шевченка,
д.мед.н., професор

Олександр МАЄВСЬКИЙ

ДОДАТОК А2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор закладу вищої освіти з
наукової роботи
Вінницького національного
медичного університету ім. М.І. Пирогова
проф. Олег ВЛАСЕНКО

«31» травня 2023 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- Найменування пропозицій:** MMP-8 та HSP70 залежні механізми ульцерогенної дії нестероїдних протизапальних лікарських засобів.
- Установа-розробник, автор:** Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, МОЗ України, кафедра клінічної лабораторної діагностики (69074, м. Запоріжжя, вул. Академіка Амосова 83), асистент Бурлака К.А.
- Джерела інформації:** Бурлака К. А. MMP8- і HSP70-опосередкована ульцерогенна дія нестероїдних протизапальних засобів за тривалого введення / К. А. Бурлака, С. В. Павлов // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2021. – Т. 15, № 6. – С. 372-379. - <https://doi.org/10.33250/15.06.372>; Павлов С.В., Бурлака К.А. // Можливий епігенетичний вплив нестероїдних протизапальних лікарських засобів на шлунково-кишковий тракт// Збірник тез та доповідей науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасні питання молекулярно-біохімічних досліджень та лабораторного скринінгу у клінічній та експериментальній медицині 2020». - 2020р. – 58с.
- Де і коли впроваджено:** кафедра фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, МОЗ України, квітень-травень 2023 р. Протокол № 10 від 3.05 2023 р.
- Результати застосування методу:** матеріали дослідження впроваджено у науково-педагогічний процес кафедри фармакології під час вивчення тем: Ненаркотичні анальгетики. Нестероїдні протизапальні лікарські засоби.
- Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелах інформації (п. 3):** використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо MMP-8 та HSP70 залежних механізмів ульцерогенної дії НПЗЗ
- Зауваження та пропозиції:** Не вносилися.

Відповідальна за впровадження:
Завідувачка кафедри фармакології
Вінницького національного медичного
університету ім. М.І. Пирогова,
д.мед.н., професор

Наталія ВОЛОЦУК

ДОДАТОК АЗ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Запорізького державного медико-
фармацевтичного університету,
проф. Вадим ВІЗІР

«25» 09 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції:** Епігенетичні механізми побічної дії нестероїдних протизапальних лікарських засобів.
2. **Установа-розробник, автор:** Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, МОЗ України, кафедра клінічної лабораторної діагностики (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26), асистент Бурлака К.А.
3. **Джерела інформації:** Бурлака К. А. MMP8- і HSP70-опосередкована ульцерогенна дія нестероїдних протизапальних засобів за тривалого введення / К. А. Бурлака, С. В. Павлов // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2021. – Т. 15, № 6. - С. 372-379. - <https://doi.org/10.33250/15.06.372>; Павлов С.В., Бурлака К.А. // Можливий епігенетичний вплив нестероїдних протизапальних лікарських засобів на шлунково-кишковий тракт// Збірник тез та доповідей науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасні питання молекулярно-біохімічних досліджень та лабораторного скринінгу у клінічній та експериментальній медицині 2020». - 2020р. – 58с.
4. **Де і коли введено:** кафедра фармакології та медичної рецептури з курсом нормальної фізіології, квітень-травень 2023 р.
5. **Результати застосування методу:** матеріали дослідження введено у навчальний процес кафедри фармакології на практичних та лекційних заняттях з теми: Ненаркотичні анальгетики. Нестероїдні протизапальні лікарські засоби.
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелах інформації (п. 3):** використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів епігенетичних механізмів побічної дії нестероїдних протизапальних лікарських засобів.
7. **Зауваження та пропозиції:** Не вносилися.

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри фармакології
та медичної рецептури
з курсом нормальної фізіології ЗДМФУ,
професор

Ігор БСЛЕНЧІВ

ДОДАТОК А4

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор закладу вищої освіти з
науково-педагогічної роботи

проф. Ірина ПАДИМИРОВА

09 2023р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції:** Біохімічні методи скринінгу побічної дії лікарських засобів
2. **Установа-розробник, автор:** Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, МОЗ України, кафедра клінічної лабораторної діагностики (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського 26), асистент Бурлака К.А.
3. **Джерела інформації:** Вплив тривалого введення нестероїдних протизапальних засобів на рівень повногеномного метилювання ДНК та її фрагментації у щурів. Бурлака К. А. / Вісник проблем біології та медицини. 2023. Вип. 1 (168). С. 114–119. DOI: 10.29254/2077-4214-2023-1-168-114-119 ; Бурлака К.А. Павлов С.В., // Вплив тривалого введення нестероїдних протизапальних лікарських засобів на розвиток оксидативного, нітрозуючого стресів, метаболізм пуринів, сечової кислоти та вміст фекального кальпротектину у тканинах кишківника // Матеріали V науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації», м. Харків, 18 травня 2023 р. – 90с.
4. **Де і коли введено:** кафедра клінічної лабораторної діагностики, квітень-травень 2023 р.
5. **Результати застосування методу:** матеріали дослідження введено у навчальний процес кафедри клінічної лабораторної діагностики на практичних та лекційних заняттях з навчальної дисципліни «Доказова медицина. Алгоритми і стандарти лабораторних досліджень».
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелах інформації (п. 3):** використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо методів оцінки та прогнозу побічної дії лікарських засобів.
7. **Зауваження та пропозиції:** Не вносилися.

Відповідальний за впровадження:
Завідувачка кафедри клінічної
лабораторної діагностики НФаУ,
професор

Римма СРЬОМЕНКО

ДОДАТОК А5

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Проректор з наукової роботи
Запорізького
державного медико-
фармацевтичного університету
МОЗ України
професор Тувацький В.О.

«29» _____ 2023 р

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції:** молекулярно-біохімічні методи скринінгу побічної дії лікарських засобів
2. **Установа-розробник, автор:** Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, МОЗ України, кафедра клінічної лабораторної діагностики (69074, м. Запоріжжя, вул. Академіка Амосова 83), асистент Бурлака К.А.
3. **Джерела інформації:** Вплив тривалого введення нестероїдних протизапальних засобів на рівень повногеномного метилювання ДНК та її фрагментації у щурів. Бурлака К. А. / Вісник проблем біології та медицини. 2023. Вип. 1 (168). С. 114–119. DOI: 10.29254/2077-4214-2023-1-168-114-119
4. **Де і коли введено:** навчальний медико-лабораторний центр Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, МОЗ України, квітень-травень 2023 р.
5. **Результати застосування методу:** матеріали дослідження введено у роботу навчального медико-лабораторного центру Запорізького державного медико-фармацевтичного університету.
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелах інформації (п. 3):** використання результатів наукових досліджень у науковому процесі дозволить підвищити ефективність лабораторного моніторингу побічної дії лікарських засобів та запровадити у роботу лабораторії новітніх молекулярних методів.
7. **Зауваження та пропозиції:** Не вносилися.

Керівник навчального
медико-лабораторного центру
Запорізького державного
медико-фармацевтичного університету,
МОЗ України, професор

Роман ЩЕРБИНА

ДОДАТОК А6

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор

ДУ «Інститут фармакології та токсикології

НАМН України»

д. біол. н. Олег ЯДЛОВСЬКИЙ



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції** : «Генетичні, молекулярно-біохімічні маркери скринінгу побічної дії нестероїдних протизапальних лікарських засобів».
2. **Установа-розробник, автор** : Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, МОЗ України, кафедра клінічної лабораторної діагностики (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26), асистент Бурлака К. А.
3. **Джерела інформації** : MMP8- і HSP70-опосередкована ульцерогенна дія нестероїдних протизапальних засобів за тривалого введення. Бурлака К. А., Павлов С. В. / Фармакологія та лікарська токсикологія. 2021. Т. 15, № 6. С. 372–379, <https://doi.org/10.33250/15.06.372>.
Вплив тривалого введення нестероїдних протизапальних засобів на рівень повногеномногOMETИЛЮВАННЯ ДНК та її фрагментації у щурів. Бурлака К. А. / Вісник проблем біології та медицини. 2023. Вип. 1 (168). С. 114–119. DOI: 10.29254/2077-4214-2023-1-168-114-119.
4. **Де і коли введено** : Лабораторія фармакології ефektorних органів і систем ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», травень 2023 р.
5. **Результати застосування методу**: матеріали дослідження введено у роботу лабораторії фармакології ефektorних органів і систем ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелах інформації (п. 3)** : використання результатів наукових досліджень забезпечить використання новітніх молекулярно-біохімічних та генетичних маркерів у моніторингу побічної дії нестероїдних протизапальних лікарських засобів.
7. **Зауваження та пропозиції** : Не вносилися.

Відповідальний за впровадження:
Завідувачка відділу фармакології
ДУ «Інститут фармакології та токсикології
НАМН України,
д-р мед. н.

Handwritten signature of Natalya Seredin'ska in blue ink.

Наталія СЕРЕДИНСЬКА

ДОДАТОК А7



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Заступник медичного директора
поліклінічного розділу роботи
КНП «Міська лікарня №9» ЗМР,
Рак О.В. *О. Рак*

«25» 08 2023р

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- Найменування пропозиції:** молекулярно-біохімічні методи скринінгу побічної дії лікарських засобів.
- Установа-розробник, автор:** Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, МОЗ України, кафедра клінічної лабораторної діагностики (69074, м. Запоріжжя, вул. Академіка Амосова 83), аспірант Бурлака К.А.
- Джерела інформації:** Павлов С.В., Бурлака К.А. Вплив тривалого введення нестероїдних протизанальних лікарських засобів на розвиток окислювального, нітрозуючого стресів, метаболізм пуринів, сечової кислоти та вміст фекального кальпротектину у тканин кишечника. *Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації:* матеріали V науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю, м. Харків, 2023. С. 90-92.
- Де і коли впроваджено:** відділення клініко-діагностичної лабораторії КНП «Міська лікарня №9» ЗМР, травень 2023 р.
- Результати застосування методу:** матеріали використовуються в діагностичному напрямку у відділенні клініко-діагностичної лабораторії КНП «Міська лікарня №9» ЗМР для ранньої діагностики запальних захворювань кишечника.
- Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелах інформації (п. 3):** використання результатів наукових досліджень у клінічній лабораторії дозволить прискорити ранню діагностику запальних захворювань кишечника при тривалому використанні НПЛЗ та проводити диференційну діагностику між ЗЗК та функціональними захворюваннями.
- Зауваження та пропозиції:** Не вносилися.

Завідувачка
клініко-діагностичної лабораторії

М.В. Вороніна

ДОДАТОК А8

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор
ННМЦ «Університетська клініка
ЗДМФУ»

Котлярецька Е.В.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції: лабораторний скринінг ulcerогенної дії нестероїдних протизапальних лікарських засобів.
2. Установа-розробник, автор: Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, МОЗ України, кафедра клінічної лабораторної діагностики (69074, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26), асистент Бурлака К.А.
3. Джерела інформації: MMP8- і HSP70-опосередкована ulcerогенна дія нестероїдних протизапальних засобів за тривалого введення. Бурлака К. А., Павлов С. В. / Фармакологія та лікарська токсикологія. 2021. Т. 15, № 6. С. 372–379 <https://doi.org/10.33250/15.06.372> Динаміка вмісту ендопептидаз та маркерів оксидативного стресу у плазмі крові щурів при тривалому введенні нестероїдних протизапальних лікарських засобів. Павлов С.В., Бурлака К.А. // Збірник тез та доповідей науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини та фармації – 2021». - 2021р.
4. Де і коли введено: клініко-діагностична лабораторія ННМЦ «Університетська клініка ЗДМФУ», квітень-травень 2023 р.
5. Результати застосування методу: матеріали використовуються в діагностичному напрямку клініко-діагностична лабораторія ННМЦ «Університетська клініка ЗДМФУ» для ранньої діагностики побічної дії нестероїдних протизапальних лікарських засобів.
6. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелах інформації (п. 3): використання результатів наукових досліджень у клінічній лабораторії дозволить прискорити ранню діагностику ulcerогенної дії нестероїдних протизапальних лікарських засобів
7. Зауваження та пропозиції: Не вносилися.

Відповідальна за впровадження

Завідувачка
клініко-діагностичної лабораторії
ННМЦ «Університетська клініка ЗДМФУ»

Оксана СІВАК

ДОДАТОК А9

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Харківського національного
медичного університету,
проф. Валерій М'ЯСОСЛОВ


« 03 » 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Біологічні маркери скринінгу побічної дії нестероїдних протизапальних лікарських засобів.
2. **Установа-розробник, виконавець:** Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, МОЗ України, кафедра клінічної лабораторної діагностики (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського 26), асистент Бурлака К.А.
3. **Джерела інформації:** MMP8- і HSP70-опосередкована ульцерогенна дія нестероїдних протизапальних засобів за тривалого введення. Бурлака К. А., Павлов С. В. / Фармакологія та лікарська токсикологія. 2021. Т. 15, № 6. С. 372–379 , <https://doi.org/10.33250/15.06.372> ; Бурлака К.А. Павлов С.В., // Вплив тривалого введення нестероїдних протизапальних лікарських засобів на розвиток оксидативного, нітрозуючого стресів, метаболізм пуринів, сечової кислоти та вміст фекального кальпротектину у тканинах кишківника // Матеріали V науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації», м. Харків, 18 травня 2023 р. – 90с.
4. **Впроваджено:** у навчальний процес та наукову роботу кафедри клінічної лабораторної діагностики, квітень-травень 2023 р.
5. **Результати впровадження:** матеріали дослідження впроваджено у навчальний процес кафедри клінічної лабораторної діагностики на практичних та лекційних заняттях з освітніх компонентів «Вплив лікарських засобів на лабораторні показники» (ОПП «Лабораторна діагностика», другий магістерський рівень) та «Побічна дія ліків» (ОПП «Стоматологія»).
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелах інформації (п. 3):** використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання здобувачів вищої освіти щодо методів біохімічного скринінгу побічної дії лікарських засобів.
7. **Зауваження та пропозиції:** Не вносилися.

Відповідальний за впровадження:
Завідувачка кафедри клінічної
лабораторної діагностики ХНМУ,
професор



Ольга ЗАЛЮБОВСЬКА

ДОДАТОК Б
СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ НА ТЕМУ
ДИСЕРТАЦІЇ

1. Бурлака, К. А., & Павлов, С. В. (2022). MMP8- і HSP70-опосередкована улцерогенна дія нестероїдних протизапальних засобів за тривалого введення. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 15(6), 372–379. <https://doi.org/10.33250/15.06.372> (Дисертант виконала набір матеріалу, імуноферментне дослідження та статистичну обробку результатів).
2. Burlaka, K. A. (2023). Influence of long-term administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the level of whole genome dna methylation and its fragmentation in rats. *Bulletin of problems biology and medicine*, 1(168), 114–119. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2023-1-168-114-119> (Дисертант виконала набір матеріалу, статистичну обробку результатів, узагальнення, написання та оформлення статті).
3. Бурлака, К. А., & Павлов, С. В. (2023). TL-4-рецептор-опосередкована побічна дія нестероїдних протизапальних лікарських засобів при їх тривалому застосуванні. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 17(4), 240–247. <https://doi.org/10.33250/17.04.240> (Дисертант виконала набір матеріалу, імуноферментне дослідження та статистичну обробку результатів).
4. Павлов, С.В., & Бурлака, К.А. (2020). Вплив нестероїдних протизапальних лікарських засобів на обмін вітаміну Д у щурів при їх тривалому застосуванні. *Збірник тези доповідей наукової конференції студентів ЗДМУ «Досягнення сучасної медичної та фармацевтичної науки»* (16 груд. 2020 р., м. Запоріжжя). 77-78. (Дисертант виконала набір матеріалу, імуноферментне дослідження та статистичну обробку результатів, написання та підготовку тез до друку, усна доповідь).
5. Павлов, С.В., & Бурлака, К.А. (2020). Можливий епігенетичний вплив нестероїдних протизапальних лікарських засобів на шлунково-кишковий тракт.

Тези науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасні питання молекулярно-біохімічних досліджень та лабораторного скринінгу у клінічній та експериментальній медицині 2020». (05-06 бер. 2020 р., м. Запоріжжя). 42. (Дисертант виконала набір матеріалу, імуноферментне дослідження та статистичну обробку результатів, написання та підготовку тез до друку, усна доповідь).

6. Павлов, С.В., & Бурлака, К.А. (2022). Молекулярний механізм ульцерогенної дії нестероїдних протизапальних лікарських засобів при їх тривалому введенні у щурів. *Тези I Міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики та громадського здоров'я»* (15 лист. 2022 р., м. Житомир). 212. (Дисертант виконала набір матеріалу, імуноферментне дослідження та статистичну обробку результатів, написання та підготовку тез до друку, усна доповідь).

7. Павлов, С.В., & Бурлака, К.А. (2023). Вплив тривалого введення нестероїдних протизапальних лікарських засобів на розвиток оксидативного, нітрозуючого стресів, метаболізм пуринів, сечової кислоти та вміст фекального кальпротектину у тканих кишківника. *Матеріали V науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації»* (18 трав. 2023 р., м. Харків). 90-92. (Дисертант виконала набір матеріалу, імуноферментні, біохімічні дослідження та статистичну обробку результатів, написання та підготовку тез до друку, усна доповідь).

8. Павлов, С.В., & Бурлака, К.А. (2023). Вплив тривалого введення нестероїдних протизапальних засобів на рівень повногеномного метилювання днк, її фрагментації, вміст білків wnt, hedgehog - сигналіну та гену c-kit. *Матеріали VI науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція»* (16 лист. 2023 р., м. Харків). 118-120. (Дисертант виконала набір матеріалу, ПЛР, імуноферментне дослідження та статистичну обробку результатів, написання та підготовку тез до друку).

ДОДАТОК В

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. International conference «Modern Molecular-biochemical Markers in Clinical and Experimental Medicine – 2019 (м. Прага, 2019 р.) – усна доповідь.
2. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Сучасні питання молекулярно-біохімічних досліджень та лабораторного скринінгу у клінічній та експериментальній медицині - 2019 р». (м. Запоріжжя, 2019р.) – усна доповідь.
3. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Сучасні питання молекулярно-біохімічних досліджень та лабораторного скринінгу у клінічній та експериментальній медицині-2020». (м. Запоріжжя, 2020р.) – усна доповідь з публікацією тез.
4. Всеукраїнська науково-практична конференція студентів та молодих вчених ЗДМУ «Досягнення сучасної медичної та фармацевтичної науки». (м. Запоріжжя, 2020р.) – усна доповідь з публікацією тез.
5. 81 всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини та фармації – 2021». (м. Запоріжжя, 2021 р.) – усна доповідь.
6. I Міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики та громадського здоров'я» - 2022. (м. Житомир, 2022 р.) – усна доповідь з публікацією тез.
7. V науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» - 2023. (м. Харків, 18 травня 2023 р.) – усна доповідь з публікацією тез.
8. VI науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція». – 2023. (м. Харків, 16 лист. 2023 р.) – усна доповідь з публікацією тез.

ДОДАТОК Г

КОРЕЛЯЦІЙНА МАТРИЦЯ МІЖ ПОКАЗНИКАМИ РАНГУ СПІРМЕНА

	Нітротирозин	8-OhG	GSS	HSP70	MMP8	TL4рецеп	MeDNA	фраг. ДНК	Вираз. слиз
Нітротирозин	1,000	0,840	0,831	0,835	-0,305	0,864	0,864	0,659	0,704
8-OhG	0,840	1,000	0,805	0,850	-0,316	0,849	0,783	0,686	0,637
GSS	0,831	0,805	1,000	0,768	-0,232	0,845	0,757	0,734	0,593
HSP70	0,835	0,850	0,768	1,000	-0,328	0,772	0,812	0,620	0,509
MMP8	-0,305	-0,316	-0,232	-0,328	1,000	-0,207	-0,321	-0,517	-0,171
TL4рецеп	0,864	0,849	0,845	0,772	-0,207	1,000	0,822	0,631	0,694
MeDNA	0,864	0,783	0,757	0,812	-0,321	0,822	1,000	0,607	0,704
фраг. ДНК	0,659	0,686	0,734	0,620	-0,517	0,631	0,607	1,000	0,487
Вираз. слиз.	0,704	0,637	0,593	0,509	-0,171	0,694	0,704	0,487	1,000

Примітка. Червоним кольором виділено статистично значущі зв'язки; зеленим кольором цифри – ті, що увійшли до моделей

ДОДАТОК Д

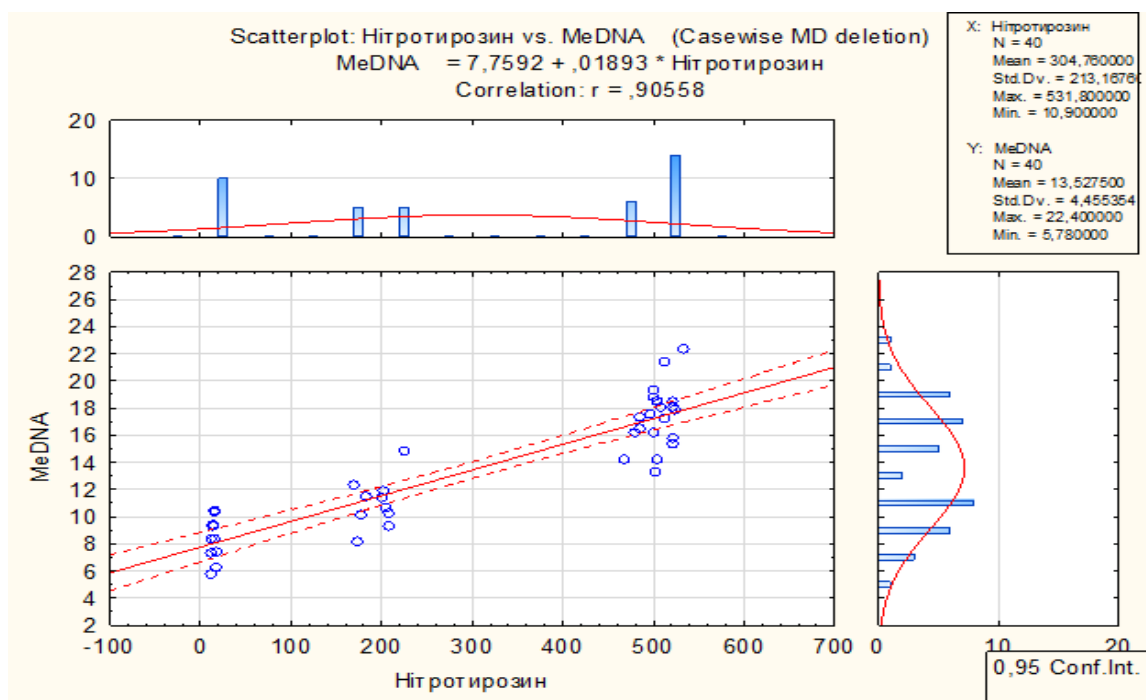


Рисунок Д.1 – Точкова діаграма взаємозв'язку двох змінних – нітротирозину та метильованої ДНК.

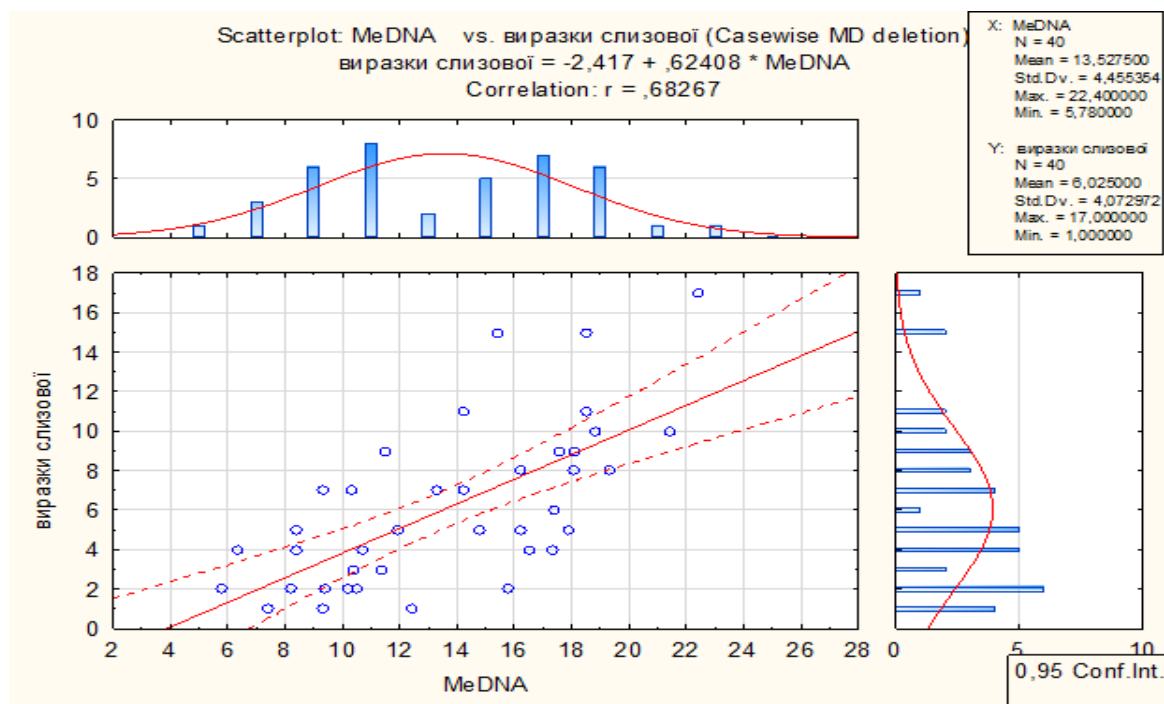


Рисунок Д.2 – Точкова діаграма взаємозв'язку двох змінних – метильованої ДНК та враженість виразко-утворень слизової оболонки шлунку.

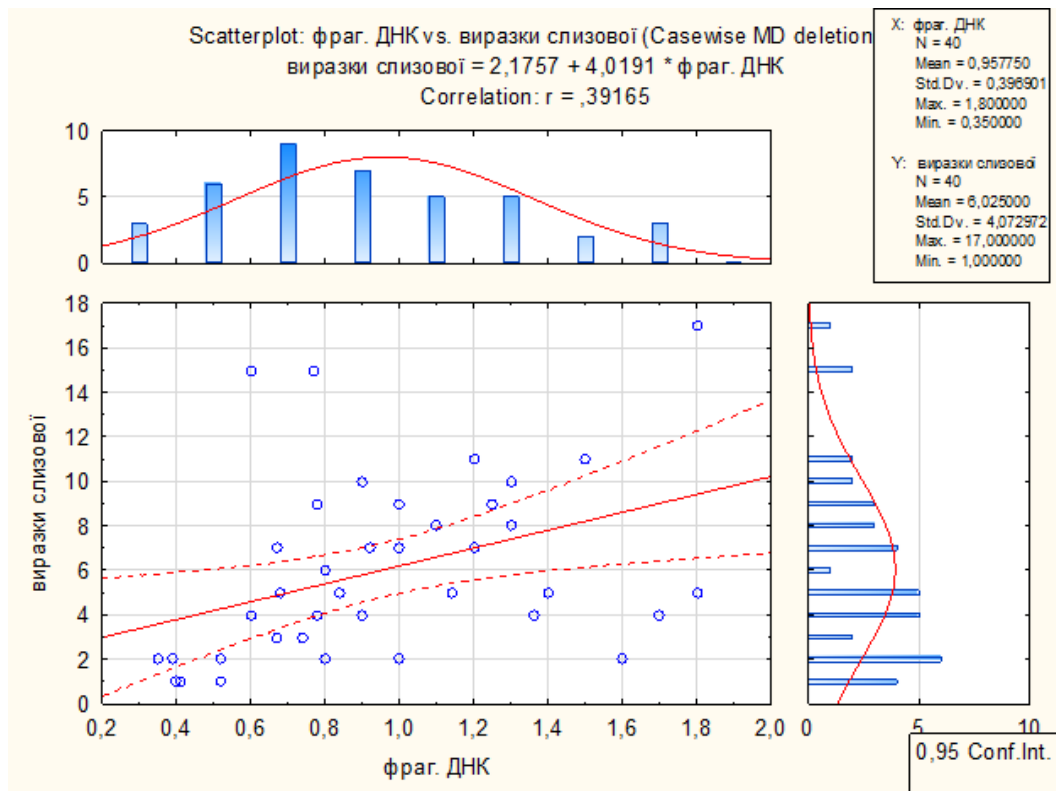


Рисунок Д.3 – Точкова діаграма взаємозв'язку двох змінних – фрагментація ДНК та вираженість виразко-утворень.

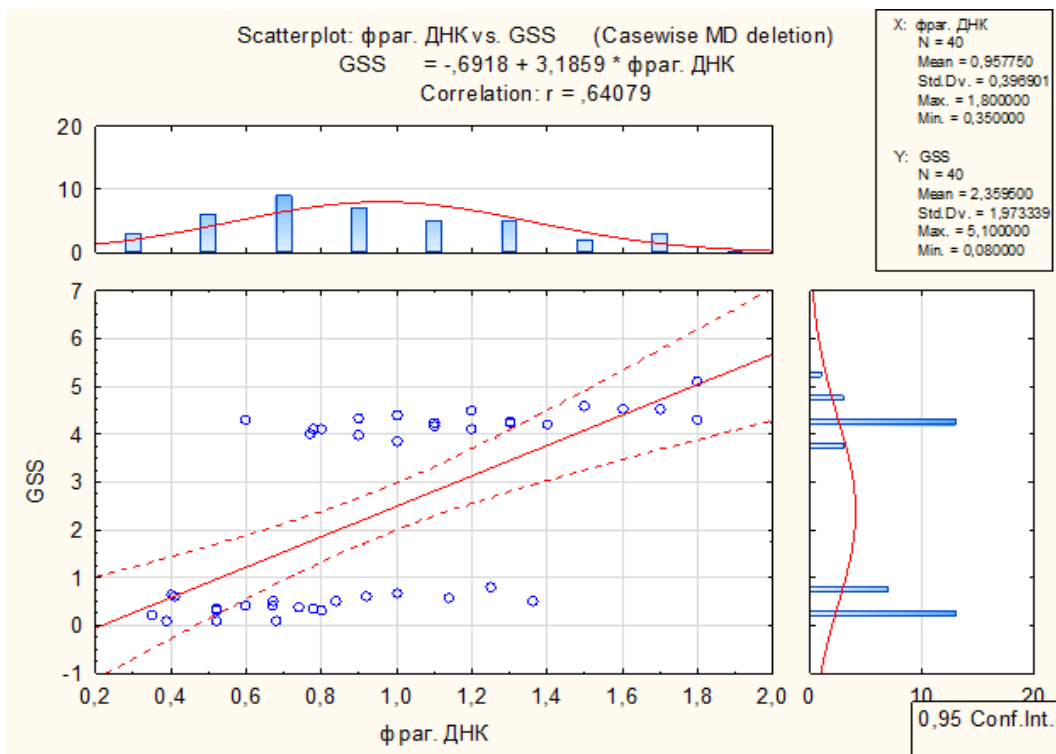


Рисунок Д.4 – Точкова діаграма взаємозв'язку двох змінних – фрагментація ДНК та окиснений глутатіон (GSS).

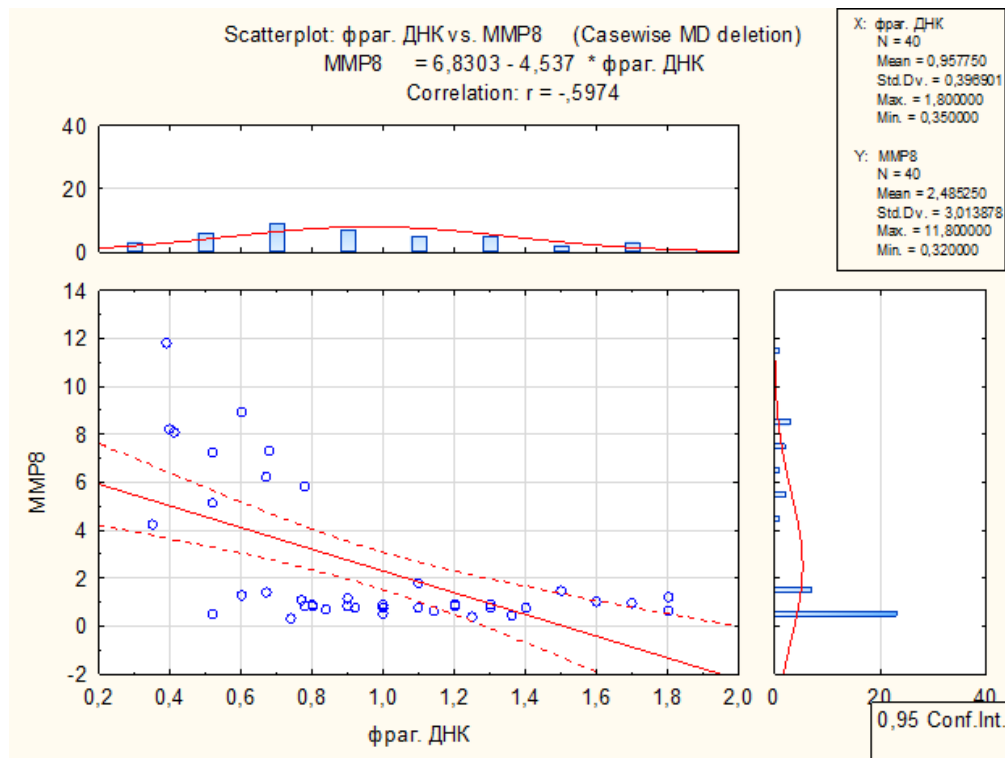


Рисунок Д.5 – Точкова діаграма взаємозв'язку двох змінних – фрагментація ДНК та матриксна металопротеїназа 8 (MMP8).



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: №05/02/02-1424 від 05.04.2016;
Цілісність даних: не порушена;

Підпис № 1 (реквізити підписувача та дані сертифіката)
Підписувач: БУРЛАКА КРИСТИНА АНАТОЛІВНА 3363706226;
Належність до Юридічної особи: ФІЗИЧНА ОСОБА;
Код юридичної особи в ЄДР: 3363706226;
Серійний номер кваліфікованого сертифіката: 5E984D526F82F38F040000005A233801CC7FA604;
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): 14:37 18.12.2023;
Чинний на момент підпису. Підтверджено позначкою часу для підпису від АЦСК (кваліфікованого надавача електронних довірчих послуг)
Час та дата підпису (позначка часу для даних): 14:37 18.12.2023;
Чинний на момент підпису. Підтверджено позначкою часу для даних від АЦСК (кваліфікованого надавача електронних довірчих послуг)