

ВІДГУК

офіційного рецензента, доктора біологічних наук,
професора, завідувача відділу молекулярної генетики Інституту
молекулярної біології і генетики НАН України

Геннадія ТЕЛЕГЕСВА

на дисертаційну роботу Катерини Жуваки **«Дослідження нових нуклеозидних інгібіторів MGMT при алкілювальній хіміотерапії пухлинних клітин в модельних системах»**“, подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія

Актуальність обраної теми

Дисертаційна робота Катерини Жуваки присвячена дослідженню властивостей нових нуклеозидних інгібіторів MGMT та їхнього впливу на пухлинні клітини під час алкілювальної терапії в модельних системах *in vitro* та *in vivo*.

Використання алкілювальних сполук – один із методів сучасної терапії онкозахворювань. Проте, алкілювальна терапія не завжди приносить очікувані результати у лікуванні онкохворих через активацію репаративного ферменту O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансферази (MGMT), який видаляє алкільні групи з пошкодженої ДНК, знижуючи тим самим цитотоксичну дію хіміопрепаратів на ракові клітини. Цей фермент переносить алкільну групу з позиції O⁶ гуаніну в клітинний ДНК на себе, внаслідок чого інактивується, реакція є одноразовою та необерненою. Саме тому в клітинах при систематичному застосуванні алкілювальних сполук посилюється експресія гена *MGMT*, що в свою чергу, призводить до виникнення хіміорезистентності. Саме цій актуальній проблемі – подоланню хіміорезистентності до алкілювальних препаратів і присвячена ця робота. Вкрай важливим є й те, що авторка використовує новий клас інгібіторів, розширюючи тим самим можливості ефективного лікування.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота Катерини Жуваки містить результати експериментальних досліджень, виконаних у відділі генетики людини

Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалась в рамках бюджетної теми «Вплив нових інгібіторів репаративного ензиму MGMT на ефективність алкілувальної терапії пухлин в модельних системах», 2019-2023 рр., № державної реєстрації 0119U100158

Ступінь обґрунтованості основних положень, висновків та практичних рекомендацій, сформульованих у дисертації

Основні положення, висновки та практичні рекомендації дисертації Катерини Жуваки витікають із отриманих нею експериментальних результатів і є добре обґрунтованими. Вони опрацьовані статистично різними методами і знайшли достатнє відображення у 3 статтях та 5 тезах доповідей у збірках матеріалів наукових конференцій.

Достовірність основних наукових положень, висновків і практичних досліджень та одержаних результатів

Достовірність основних наукових положень, висновків, практичних рекомендацій та одержаних результатів не викликає ніяких сумнівів, оскільки в роботі оскільки в роботі проведено комплексний аналіз даних за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 2016, Origin 8.1 та ImageJ. Статистичний аналіз включав розрахунок середнього арифметичного значення (M), стандартної похибки (SEM) та стандартних відхилень (SD). Експерименти були повторені 2-4 рази, а вестерн-блот аналіз виконувався в кількох технічних повторях. Для аналізу відмінностей між групами застосовували дисперсійний аналіз (ANOVA) з поправкою Бонферроні, вважаючи результати значущими при $P < 0,05$. Отримані результати представлені з використанням середніх значень, стандартних відхилень та медіани, з вибором найбільш презентативних зображень для презентації.

Новизна основних наукових положень, висновків і практичних рекомендацій, а також проведених наукових досліджень та одержаних результатів

Наукова новизна проведених Катериною Жувакою наукових досліджень та одержаних нею результатів, а також основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій полягає :

1. У роботі вперше проведено комплексне дослідження нових ненеуклеозидних інгібіторів MGMT у різних модельних системах. З використанням культуральних методів встановлено, що декілька потенційних ненеуклеозидних інгібіторів MGMT мають значно меншу цитотоксичність порівняно зі стандартним інгібітором O⁶-бензилгуанідином (O⁶-BG) у пухлинних клітинах людини лінії HEP-2.
2. Серед досліджуваних сполук відібрано три нові інгібітори (41, 41B та 89), які з високою ефективністю сенсibiliзували пухлинні клітини HEP-2 до цитотоксичної дії MNNG у широкому діапазоні концентрацій (від 0,5 до 0,0005 мкг/мл) на відміну від дії O⁶-BG спільно з MNNG, де ефект виявлявся у вузькому інтервалі концентрацій останнього (0,5 та 0,05 мкг/мл).
3. За результатами Вестерн-блот аналізу виявлено ефект зниження рівня білка MGMT в клітинах HEP-2 та T98G під впливом нових інгібіторів у концентрації 10 мкМ; і цей ефект значно підсилювався при їх комбінованій обробці з алкілувальною сполукою MNNG, що підтверджує інгібувальні властивості досліджуваних сполук.
4. Ефект зниження кількості MGMT в клітинах гліоми T98G під впливом нових інгібіторів (41 та 41B) був нижчим і тривав коротший час (одна доба) порівняно зі стандартним інгібітором O⁶-BG (три доби), що вказує на їхню, можливо, меншу токсичність для організму.
5. Нові інгібітори (41 та 41B) самі по собі не спричиняють підвищення рівня аутофагії та загибелі клітин гліомних ліній T98G та U251MG, що свідчить про низьку цитотоксичність цих сполук. Водночас, у комбінації з алкілувальною сполукою MNNG інгібітори здатні збільшувати рівень аутофагії та кількість загиблих клітин, але цей ефект спостерігався лише в клітинах T98G, що характеризуються високим рівнем експресії MGMT.
6. У створеній авторами моделі *in vivo* нові інгібітори (41, 41B та 89) продемонстрували виражений терапевтичний ефект у комбінації з MNNG, зокрема здатність значно уповільнювати ріст пухлин молочної залози у ми-

шей лінії ICR. У деяких випадках спостерігалась повна регресія пухлин, і найчастіше цей ефект відзначався при застосуванні інгібітору 89.

7. Вестерн-блот аналіз зразків пухлинних тканин мишей лінії ICR під дією комбінованої терапії новими інгібіторами та MNNG показав значне зниження кількості білка MGMT, що, ймовірно, є основним механізмом підвищення ефективності алкілувальної терапії пухлин.

8. Згідно з даними пілотних досліджень механізмів регресії пухлин молочної залози під впливом комбінованої терапії новими інгібіторами та MNNG, у зразках пухлинних тканин мишей виявлено активні форми каспази-3, що свідчить про можливу індукцію апоптозу.

Результати цієї роботи мають важливе наукове значення, оскільки спрямовані на вирішення актуальної наукової проблеми щодо молекулярних механізмів регуляції формування хіміорезистентності і її подолання. Це дослідження відкриває нові перспективи для розробки персоналізованих терапевтичних стратегій і глибшого розуміння механізмів дії ненуклеозидних інгібіторів, що може значно покращити результати лікування онкологічних захворювань

Практичне значення одержаних результатів

Жуваки Катерини, безумовно, має практичне значення. Воно полягає в тому, що відібрані інгібітори, а саме (41, 41В та 89) продемонстрували виражений протипухлинний ефект у комбінації з MNNG, зокрема здатність уповільнення зростання пухлин молочної залози у мишей лінії ICR. При цьому спостерігається зниження кількості білка MGMT, що, в свою чергу, призводить до більшої ефективності алкілувальних препаратів. Подальша розробка цього напрямку може мати певний елемент ад'ювантної терапії, зокрема для молочної залози.

Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій в опублікованих працях

Основні наукові положення, висновки та практичні рекомендації в повній мірі відображені у 3 статтях, опублікованих Катериною Жувакою у журналах,

представлених у міжнародних базах даних та в 5 тезах доповідей на наукових конференціях.

Структура дисертації

Дисертація викладена на 146 сторінках друкованого тексту і містить 23 рисунки та 4 таблиці. Вона має всі необхідні для дисертації розділи – анотацію, вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень, обговорення результатів, висновки, список використаних джерел літератури і додаток. У вступі чітко відображена актуальність теми досліджень, мета і завдання досліджень, методи досліджень, наукова новизна отриманих результатів і їх практичне значення, особистий внесок здобувача, зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами, апробація результатів та публікації по темі дисертаційної роботи.

В огляді літератури детально проаналізовані сучасні наукові досягнення по темі дисертації на основі 143 джерел, Він складається з 5 підрозділів.

- 1.1. Характеристика репаративного ферменту MGMT.
- 1.2 Хіміотерапія пухлин з використанням алкілувальних сполук.
- 1.3 Інгібітори MGMT
- 1.4 MGMT як біомаркер у комбінованій хіміотерапії пухлин
- 1.5. Апоптоз та аутофагія як терапевтичні стратегії у лікуванні раку

Детально обґрунтована актуальність та необхідність проведення досліджень, направлених на більш детальне вивчення механізмів формування резистентності злоякісних пухлин. Він написаний логічно, з критичним аналізом даних літератури, свідчить про добру обізнаність авторки із сучасним станом проблеми, дає хорошу основу для подальшого розуміння логіки експерименту.

Другий розділ присвячений опису методів і матеріалів дослідження, які відповідають меті та завданням дисертації дослідження. Детально описано методологію проведених досліджень, використані методи статистичної обробки даних та їх аналізу. Все це свідчить про багатий методичний арсенал цієї роботи.

Розділі “Результати досліджень” складається з двох великих підрозділів:

3. “Комплексне дослідження впливу нових інгібіторів MGMT на пухлинні клітини” де перевіряється можлива цитотоксична дія потенційних інгібіторів MGMT, порівнюється ефективність дії потенційних інгібіторів MGMT71, досліджується вплив нових інгібіторів на пухлинні клітини людини з різним рівнем експресії гену *MGMT*, на аутофагію в пухлинних клітинах, вплив нових інгібіторів на летальність пухлинних клітин.

4. “Терапевтичний ефект нових інгібіторів MGMT на моделі *in vivo*”. Для цього на основі мишей лінії ICR94 було створено експериментальної моделі, проведено порівняння ефективності терапевтичної дії нових інгібіторів MGMT на моделі алкілувальної терапії пухлин молочної залози, вивчено вплив нових інгібіторів на рівень білка MGMT в пухлинах молочної залози та досліджено ймовірні механізми регресії пухлин під впливом комбінованої хіміотерапії пухлин.

В цілому робота справляє приємне враження, вона носить багаторівневий характер, починаючи з аналізу бази даних, перевірки токсичності відібраних препаратів, перевірки їхньої дії *in vitro* та *in vivo* і закінчуючи гіпотезою щодо механізмів дії.

Варто відмітити, що отримані Жувакою Катериною результати детально і логічно проаналізовані в розділі “Обговорення результатів”, Висновки є конкретними, чітко сформульовані і повністю відображають результати всіх основних досліджень.

Недоліки дисертації щодо їх змісту та оформлення

Дисертаційна робота Катерини Жуваки містить всю необхідну для дисертації інформацію, написана і оформлена зразково, вона добре вичитана та не містить помилок, крім технічних. Принципових недоліків у цій роботі, не виявлено, але є декілька питань дискусійного характеру:

1. У літогляді Ви навели історію розвитку терапії з використанням алкілюючих агентів. А які тенденції їх використання існують зараз, які розроблюють нові препарати?

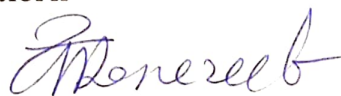
2. Ви показали, що перевірені інгібітори трохи по різному діють на різні культури. Чим це пояснити? Чи передбачає це, що їх використання має бути залежним від типу пухлин?

3. В остаточному варіанті Ви відібрали 3 інгібітора MGMT-(41,41B,89). З яким із них надалі було б перспективно працювати?
4. На скільки знизився рівень MGMT після обробки інгібіторами?

Висновок

Дисертаційна робота Катерини Жуваки «Дослідження нових ненуклеозидних інгібіторів MGMT при алкілувальній хіміотерапії пухлинних клітин в модельних системах» є завершеною науковою працею, за своєю актуальністю, науково-теоретичним рівнем, науковою новизною і практичним значенням повністю відповідає вимогам Постанови Кабінету Міністрів України «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» від 12 січня 2022 р., № 44, а здобувачка - **Жувака Катерина Сергіївна** заслуговує на присудження їй ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія.

Доктор біологічних наук, професор,
завідувач відділу молекулярної генетики
Інституту молекулярної біології
і генетики НАН України



Геннадій ТЕЛЕГЕСВ

