

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

директор Інституту молекулярної біології і
генетики НАН України, д. б. н., професор,
член-кореспондент НАН України

Михайло ПУКАЛО

“29” жовтня 2024 р.

ВИСНОВОК

про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертації
на тему «Дослідження нових ненуклеозидних інгібіторів MGMT при алкілувальній
хіміотерапії пухлинних клітин в модельних системах»
на здобуття ступеня доктора філософії у галузі знань 09 Біологія
за спеціальністю 091 Біологія

ВИТЯГ

із протоколу засідання об'єднаного семінару відділу генетики людини, відділу біомедичної
хімії, відділу сигнальних систем клітини, відділу молекулярної генетики, відділу молекулярної
онкогенетики, відділу синтетичних біорегуляторів, відділу регуляторних механізмів клітини,
відділу генетики клітинних популяцій, відділу білкової інженерії та біоінформатики ІМБГ
НАН України від 29 жовтня 2024 р.

З метою надання висновку про наукову новизну, теоретичне та практичне значення
результатів дисертації 29 жовтня 2024 року на об'єднаному семінарі наукових відділів ІМБГ
НАН України – здобувач ступеня доктора філософії Жувака Катерина Сергіївна публічно
презентувала наукові результати дисертації на тему «Дослідження нових ненуклеозидних
інгібіторів MGMT при алкілувальній хіміотерапії пухлинних клітин в модельних системах».

Присутні. Головуючий на засіданні д.б.н., академік НАН України, зав. відділу Філоненко
В.В., заст.директора Лукаш Л.Л., інж. Сухорада О.М., н.сп. Рубан Т.П., с.н.с. Підпала О.В.,
м.н.с. Бджола А.В., с.н.с. Мацевич Л.Л., с.н.с. Шувалова Н.С., с.н.с. Карпова Н.С., к.б.н. Лило
В.В., зав.від. Дубей І.Я., с.н.с. Бджола В.Г., с.н.с. Швачко Л.Б., м.н.с. Скиданович О.І., студент
КАУ Гармаш Д.В., с.н.с. Кропивко С.В., с.н.с. Заїка, н.с. Болсунова О.І., пров.інж. Коломієць
Ю.М., н.с. Засєць В.М., н.с. Кацан В.А., зав.від. Телегєєв Г.Д., зав.від. Негруцький Б., т.в.о.
зав.від. Арешков П.О..

На засіданні були присутні 24 особи, у тому числі 5 докторів біологічних наук, 1 доктор
хімічних наук, 10 кандидатів біологічних наук, 1 кандидат хімічних наук.

Порядок денний. Обговорення дисертаційного дослідження аспірантки відділу
генетики людини Жуваки Катерини Сергіївни на тему «Дослідження нових ненуклеозидних
інгібіторів MGMT при алкілувальній хіміотерапії пухлинних клітин в модельних системах»,
поданого на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія за спеціальністю
091 Біологія.

Дисертація виконувалася у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і
генетики НАН України. Тема дисертації затверджена на засіданні Вченої ради Інституту
молекулярної біології і генетики НАН України (протокол № 27 від 18 грудня 2018 року).

Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор, заступник директора з наукової роботи, завідувач відділу генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України Лукаш Любов Леонідівна.

З дисертаційною роботою попередньо ознайомилися доктор хімічних наук, ст.н.с., доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу молекулярної генетики ІМБГ НАН України Телегєєв Г.Д., і доктор хімічних наук, ст.н.с., завідувач відділу синтетичних біорегуляторів ІМБГ НАН України Дубей І.Я.

Виступили

Здобувач Жувака Катерина Сергіївна представила презентацію за основними положеннями дисертації на тему «Дослідження нових нуклеозидних інгібіторів MGMT при алкілювальній хіміотерапії пухлинних клітин в модельних системах», поданої на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія.

З відгуком на роботу виступили науковий керівник – доктор біологічних наук, професор, заступник директора з наукової роботи, завідувач відділу генетики людини Лукаш Л.Л. та рецензенти - доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу молекулярної генетики ІМБГ НАН України Телегєєв Г.Д., доктор хімічних наук, ст.н.с., завідувач відділу синтетичних біорегуляторів ІМБГ НАН України Дубей І.Я., які дали позитивну оцінку виконаній роботі, підкреслили її наукову новизну та актуальність, створення та дослідження нових нуклеозидних інгібіторів MGMT, виокремили високий теоретичний та експериментальний рівень проведеного дослідження.

В обговоренні також взяли участь зав.від. Негруцький Б., зав.від. Дубей І.Я., зав.від. Філоненко В.В.. Питання задавали с.н.с. Карпова Н.С., зав.від. Філоненко В.В., зав.від. Негруцький Б., зав.від. Телегєєв Г.Д., с.н.с. Швачко Л.Б., с.н.с. Шувалова Н.С..

На засіданні обговорили проєкт висновку про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертації «Дослідження нових нуклеозидних інгібіторів MGMT при алкілювальній хіміотерапії пухлинних клітин в модельних системах».

Актуальність теми. Одним із сучасних методів лікування онкозахворювань є алкілювальна хіміотерапія. Принцип її дії полягає в численних пошкодженнях клітинної ДНК під дією алкілювальних сполук, що спричиняє загибель пухлинних клітин. Проте, ефективність хіміотерапії знижується під впливом індукційного репаративного ферменту O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансферази (MGMT), який видаляє алкільні залишки з гуаніну ДНК. Тривала систематична терапія алкілювальними препаратами спричиняє підвищення експресії гену MGMT, результатом чого є виникнення ефекту хіміорезистентності пухлин. Одним із підходів подолання цієї проблеми є додавання до схеми терапії інгібіторів MGMT. Проте, на жаль, найпоширеніший інгібітор O⁶-бензилгуанін та його похідні виявились цитотоксичними для гематопоетичних клітин вже на третій стадії клінічних випробувань. Тому пошук нових низькотоксичних та ефективних інгібіторів є актуальним завданням.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалась в рамках бюджетної теми «Вплив нових інгібіторів репаративного ензиму MGMT на ефективність алкілювальної терапії пухлин в модельних системах», 2019-2023 рр., № державної реєстрації 0119U100158.

Мета і завдання дослідження. Мета дисертаційної роботи – виявити і дослідити можливу цитотоксичність, інгібувальні властивості та ефективність терапевтичної дії нових ненуклеозидних інгібіторів ферменту MGMT у комбінації з алкілувальною сполукою N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідом (MNNG), а також їхній вплив на такі ключові процеси клітини, як аутофагія та апоптоз, у модельних системах *in vitro* та *in vivo*.

Відповідно до мети були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити можливу цитотоксичність нових потенційних інгібіторів репаративного ферменту MGMT з використанням пухлинних клітин людини лінії HEP-2 за допомогою тестів *in vitro*.
2. Дослідити ефективність (здатність сенсibiliзувати клітини до дії алкілувальної сполуки MNNG) нових інгібіторів MGMT з використанням лінії пухлинних клітин HEP-2 за допомогою клоногенного методу *in vitro*.
3. Дослідити здатність нових інгібіторів знижувати рівень білка MGMT з використанням різних ліній пухлинних клітин людини (HEP-2 і T98G) за допомогою Вестерн-блот аналізу *in vitro*.
4. Визначити особливості дії нових інгібіторів на аутофагію та виживаність пухлинних клітин з різним рівнем експресії гена MGMT (лінії клітин гліом людини T98G та U251MG) із застосуванням відповідних методів *in vitro*.
5. Дослідити можливий терапевтичний ефект нових інгібіторів у комбінації з алкілувальною сполукою MNNG *in vivo* на модельних мишах лінії ICR.
6. Дослідити здатність нових інгібіторів у комбінації з алкілувальною сполукою MNNG знижувати рівень білка MGMT у зразках тканин модельних мишей лінії ICR.
7. Дослідити ймовірні механізми регресії пухлин під дією нових інгібіторів у комбінації з алкілувальною сполукою MNNG *in vivo*.

Об'єкт дослідження – нові ненуклеозидні інгібітори репаративного ензиму MGMT.

Предмет дослідження – властивості нових ненуклеозидних інгібіторів MGMT та їхній вплив на комбіновану алкілувальну терапію пухлинних клітин в модельних системах *in vitro* та *in vivo*.

Методи дослідження: У роботі використані наступні методи досліджень: рутинні методи культивування пухлинних клітин людини різних ліній, МТТ-тест, клоногенний тест, екстракція білків, електрофорез білків в поліакриламідному гелі, трансфер білків, Вестерн-блот аналіз, флуоресцентна спектрометрія та мікроскопія, методи роботи з модельними тваринами (миші лінії ICR із спонтанними пухлинами молочної залози), дослідження динаміки росту пухлин, статистичний аналіз даних.

Наукова новизна одержаних результатів. У цій дослідницькій роботі вперше детально досліджено інгібувальні властивості та показано ефективну дію нових нуклеозидних інгібіторів MGMT у комбінації з алкілювальною сполукою MNNG у різних модельних системах *in vitro* та *in vivo*. Вперше виявлено синергічний ефект зниження кількості білка MGMT при спільній дії нових інгібіторів і MNNG у широкому діапазоні концентрацій в пухлинних клітинах людини HEp-2, що відрізняє їх від ефекту стандартного інгібітора O⁶-бензилгуаніну у комбінації з алкілювальною сполукою. Вперше встановлено тривалість дії (протягом доби) нових нуклеозидних інгібіторів у концентрації 10 мкМ на клітинах лінії T98G. Вперше показано, що комбінована терапія з використанням нових нуклеозидних інгібіторів призводить до посилення аутофагії та підвищення летальності пухлинних клітин лінії T98G, що характеризуються високим рівнем білка MGMT. Також вперше виявлено терапевтичний ефект нових нуклеозидних інгібіторів MGMT у модельній системі *in vivo* на мишах лінії ICR, де зафіксовано стійку регресію пухлин молочної залози та зниження рівня білка MGMT під дією комбінованої хіміотерапії. Крім того, вперше у зразках пухлинних тканин відзначено ознаки регресії пухлин через механізм апоптозу під час комбінованої терапії із застосуванням нових інгібіторів MGMT.

Практичне значення одержаних результатів. Було відібрано три нові нуклеозидні інгібітори MGMT, які характеризуються низькою цитотоксичністю, інгібувальними властивостями та ефективністю дії в комбінації з алкілювальною сполукою MNNG у різних модельних системах. Відібрані сполуки також демонструють терапевтичний ефект у моделях *in vivo*, що робить їх перспективними кандидатами для подальших досліджень в галузі біомедицини та клінічних випробувань стосовно можливостей їхнього використання при лікуванні онкозахворювань. У разі позитивних результатів наступних досліджень, ці нові інгібітори можуть бути включені до схем алкілювальної хіміотерапії пухлин з високим рівнем репаративного білка MGMT.

Отримані результати вносять вагомий внесок у базові знання про новий клас нуклеозидних інгібіторів MGMT та їх взаємодію з алкілювальними сполуками в різних експериментальних умовах. Крім того, ці результати розширюють розуміння впливу нуклеозидних інгібіторів MGMT на ключові клітинні процеси, такі, наприклад, як аутофагія та апоптоз.

Особистий внесок здобувача. Автор самостійно здійснила підбір та аналіз літературних джерел, представлених у цій дисертації. Розробка концепції, формулювання завдань, планування експериментів та аналіз результатів проводилися у співпраці з науковим керівником, д.б.н., проф. Л.Л. Лукаш. Усі результати отримані автором особисто або за її безпосередньої участі. Культуральні дослідження на клітинах HEp-2 виконані спільно з н.с. Т.П. Рубан та н.с. О.М. Сухорадою. Автор самостійно здійснювала екстракцію білків, електрофорез у ПААГ, Вестерн-блот аналіз, а також проводила досліди на гліомних клітинах *in vitro*. Дослідження рівня аутофагії та летальності клітин методами флуоресцентної спектроскопії та мікрофотографії виконано у співпраці з д.б.н., пров.н.с. О.О. Півень. Експерименти на моделі *in vivo* проведені спільно з к.б.н., пров.н.с. Л.Л. Мацевич.

Автор висловлює подяку науковому керівнику та співавторам відділів генетики людини та біомедичної хімії за спільну працю протягом виконання експериментальної роботи, обговорення та аналізу результатів, а також за допомогу у підготовці матеріалів до публікацій.

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 3 статті у наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та Scopus:

1. **Zhuvaka, K. S.**, Volynets, G. P., Ruban, T. P., Nidoeva, Z. M., Iatsyshyna, A. P., Macewicz, L. L., Bdzhola, V. G., Yarmoluk, S. M., & Lukash, L. L. (2023). Activity of nonnucleoside inhibitors of O6-methylguanine-DNA methyltransferase repair enzyme in human cells in vitro. *Cytology and Genetics*, 57(6), 48-59. <https://doi.org/10.3103/S0095452723060105> *Особистий внесок здобувача - безпосередня участь в культуральних експериментах, власноруч проведені екстракція білків, електрофорез, Вестерн-блот аналіз, обробка та аналіз результатів, написання статті та підготовка матеріалів до друку.*

2. **Zhuvaka, K. S.**, Piven, O. O., Macewicz, L. L., Ruban, T. P., Volynets, G. P., Yarmoluk, S. M., Dobrzyn, P., Lukash, L. L. (2024). Novel MGMT inhibitors increase the sensitivity of glioma MGMT-positive cells to treatment with alkylating agents in vitro. *Biopolymers and Cell*, 40(1), 47-57. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000AAD> *Особистий внесок здобувача – власноруч проведені культивування клітин та їх обробки, виділення білків, електрофорез, Вестерн-блот аналіз, флуоресцентна спектрофотометрія, участь у проведенні флуоресцентної мікроскопії, обробка та аналіз результатів, написання статті, підготовка матеріалів до друку.*

3. Macewicz, L. L., **Zhuvaka, K. S.**, Papuga, O. Y., Ruban, T. P., Volynets, G. P., Bdzhola, V. G., Yarmoluk, S. M., & Lukash, L. L. (2024). Non-nucleoside O6-methylguanine-DNA methyltransferase inhibitors in murine spontaneous tumor experimental chemotherapy in vivo. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 15(3), 561–566. <https://doi.org/10.15421/022478> *Особистий внесок здобувача – власноруч проведена екстракція білків, електрофорез, Вестерн-блот аналіз, участь в обробці та аналізі результатів, написанні статті, підготовці матеріалів до друку.*

Апробація результатів. Результати досліджень були апробовані у вигляді усних доповідей та постерів на наступних наукових конференціях: XIV Всеукраїнська наукова конференція молодих вчених НАН України (Київ, Україна, 2020); XV Всеукраїнська конференція молодих вчених з міжнародною участю (Київ, Україна, 2021); XVII Конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології та генетики НАНУ, присвячена молодим вченим, які захищають Україну, та тим, хто віддав своє життя за Батьківщину (Київ, Україна, 2023); Конференція молодих вчених у рамках XVIII Міжнародної конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», присвячена 50-річчю заснування Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, Україна, 2023); XVIII Всеукраїнська конференція молодих вчених НАН України (Київ, Україна, 2024); Конференція BioGENext: формування майбутнього медицини через біомедичні дослідження та розробки (Київ, Україна, 2024).

УХВАЛИЛИ:

1. Дисертаційна робота Жуваки Катерини Сергіївни на тему «Дослідження нових ненуклеозидних інгібіторів MGMT при алкілувальній хіміотерапії пухлинних клітин в модельних системах», є завершеною науково-дослідною роботою та відповідає всім вимогам, які висуваються до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія.

2. Затвердити висновок про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертаційної роботи Жуваки Катерини Сергіївни на тему «Дослідження нових ненуклеозидних інгібіторів MGMT при алкілувальній хіміотерапії пухлинних клітин в модельних системах».

3. Рекомендувати вченій раді Інституту молекулярної біології і генетики НАН України затвердити склад разової спеціалізованої вченої ради:

Голова ради:

Філоненко Валерій Вікторович доктор біологічних наук, професор, академік НАН України, завідувач відділу сигнальних систем клітини

Рецензенти:

Телегєєв Геннадій Дмитрович доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу молекулярної генетики ІМБГ НАН України.

Дубей Ігор Ярославович доктор хімічних наук, ст.н.с., завідувач відділу синтетичних біорегуляторів ІМБГ НАН України.

Опоненти:

Сиволоб Андрій Володимирович доктор біологічних наук, професор, професор ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Кашуба Олена Віталіївна доктор біологічних наук, професор, завідувач лабораторії молекулярних механізмів трансформації клітин Інституту експериментальної патології і радіобіології, імені Р.С. Кавецького НАН України

Голова об'єднаного семінару
доктор біологічних наук,
професор, академік
НАН України, завідувач відділу
сигнальних систем клітини
ІМБГ НАН України

Валерій ФІЛОНЕНКО

