

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Жуваки Катерини Сергіївни

«Вплив нових ненуклеозидних інгібіторів MGMT на алкілувальну терапію пухлинних клітин в модельних системах»,
представлену на здобуття наукового ступеня Доктора філософії в галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія.

Актуальність теми дисертації. Захворювання на рак займає друге місце за смертністю, поступаючись лише рівню смертності від серцево-судинних захворювань. Наразі солідні пухлини лікуються хірургічним втручанням, а також поєднанням хіміотерапії, радіотерапії і хірургії. Для лікування онкогематологічних захворювань використовують хіміо- та радіотерапію. Імунотерапія використовується для всіх типів злоякісних новоутворень, проте наразі цей метод є складним і затратним.

Тому дослідження, направлене на пошук нових хіміопрепаратів (особливо малих молекул) та вивчення механізмів дії хіміопрепаратів для підвищення їх ефективності і зниження рівня побочної дії для пацієнта є важливою задачею сучасної медицини і біології. Одним із класів хіміотерапевтичних агентів є ДНК-алкілувальні сполуки, причому у клітинах існує захисний механізм проти цитотоксичної дії таких препаратів, а саме – нормальне функціонування Об-метилгуанін-ДНК метилтрансферази (MGMT), репараторного ферменту, що видаляє алкільні групи з ДНК. Тому логічним є пригнічення функції MGMT за рахунок інгібіторів при хіміотерапії. Інгібіторами можуть слугувати Об-бензилгуанін та його похідні (наприклад, із залишком глюкози), проте такі хімічні сполуки призводять до важких побічних ефектів. Тому пошук альтернативних інгібіторів MGMT є важливою і актуальною задачею.

Я вважаю, що дослідження, спрямоване на вивчення властивостей і цитотоксичної дії інгібіторів MGMT, є важливим і актуальним.

Оцінка достовірності, ступеню обґрунтованості і новизни наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Метою представленої дисертаційної роботи було дослідження цитотоксичності нових препаратів та ефективності інгібування ферменту MGMT у комбінації із N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідом (алкілувальною сполукою), а також їх функціонального впливу на ключові клітинні процеси, такі, як аутофагія та апоптоз, у модельних системах *in vitro* та *in vivo*. Мету роботи повністю розкривають поставлені задачі.

Для виконання поставлених задач дисертантка застосувала сучасні методи дослідження, включаючи рутинні методи культивування пухлинних ліній клітин людини (HEp-2 і T98G), МТТ-тест (виживаність клітин), клоногенний тест (тест на проліферативну активність), екстракція білків, електрофорез білків в поліакриламідному гелі, трансфер білків, Вестерн-блот аналіз (для оцінки ефективності інгібування), флуоресцентна спектрофотометрія та мікроскопія (для вивчення ефективності інгібування), методи дослідження динаміки росту пухлин в експериментальних тваринах, статистичний аналіз даних (за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 2016, Origin 8.1 та Image J) з використанням тестів для непараметричних даних.

Достовірність наукових положень, висновків і практичних рекомендацій дисертаційної роботи обґрунтовано вдало обраним комплексом методологічних підходів для досягнення поставленої мети та вирішення завдань дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів. Наукова новизна результатів дисертації Жуваки К.С. полягає у тому, що вперше продемонстровано інгібувальні властивості та ефективність нових ненуклеозидних інгібіторів MGMT у комбінації з алкілувальною сполукою MNNG в різних модельних системах *in vitro* та *in vivo*. Виявлено синергічний ефект від їхньої комбінації з MNNG, що сприяло зниженню рівня білка MGMT у пухлинних клітинах лінії HEp-2. Вперше показано, що комбінована терапія з використанням нових ненуклеозидних інгібіторів призводить до посилення

аутофагії та підвищення летальності клітин лінії T98G. Вперше показано терапевтичний ефект нових ненуклеозидних інгібіторів MGMT у модельній системі *in vivo* (у експериментальних тваринах, мишах лінії ICR), причому регресії пухлин молочної залози відповідало зниження рівня білка MGMT під час комбінованої хіміотерапії.

Практичне значення одержаних результатів. Запропоновано три нових ненуклеозидні інгібітори MGMT, які показують низьку цитотоксичність при високій ефективності інгібування MNNG у модельних системах, як *in vitro*, так і *in vivo*.

Отримані результати дисертаційного дослідження є експериментальним підґрунтям для вивчення потенційного використання встановлених інгібіторів у схемах алкілувальної хіміотерапії пухлин з високим рівнем репаративного білка MGMT.

Мова та стиль викладення результатів. Повнота викладу результатів дисертації в опублікованих працях. Дисертаційна робота написана українською мовою науковим стилем. Основні положення та результати дисертації повністю висвітлені у наукових працях та оприлюднені на наукових конференціях та викладені у 7 наукових роботах: 3 статтях у провідних фахових виданнях, затверджених МОН України, 4 – тези доповідей. Основний зміст дисертаційної роботи повністю відображено в опублікованих наукових працях. **Оцінка змісту дисертації.** Дисертація оформлена із дотриманням існуючих правил, відповідно до вимог наказу МОН України від 12 січня 2017 р. №40 «Про затвердження вимог до оформлення дисертації». Дисертаційна робота побудована за традиційною схемою, складається з Вступу, Огляду літератури, розділів Матеріали та методи досліджень, Результати експериментальних досліджень (два розділи), Аналіз та узагальнення результатів дослідження та Висновків. **У Вступі** авторка ґрунтовно означила актуальність обраної теми, сформулювала мету і задачі, розкрила її наукову новизну і практичне значення. **Огляд літератури** структурований і складається із 3 підрозділів, у яких авторка проаналізувала більшість вагомих

літературних першоджерел з теми дослідження. Так, детально обговорено репаративний фермент MGMT, його структуру, функції, патерн експресії гену *MGMT* в різних тканинах організму. Також описано алкілувальні сполуки - їх різновиди, механізми їхньої дії при хіміотерапії та інгібітори MGMT. Коротко, проте ґрунтовно описані футофагія і апоптоз.

Практично всі найбільш вагомні наукові джерела за останніх 5 – 10 років було включено в аналіз. Огляд літератури змістовний, логічно побудований, аргументовано викладений.

У другому розділі «Матеріали та методи досліджень» представлено методи, які було застосовано для вивчення функціональної активності інгібіторів ферменту MGMT. Детально описано експериментальні моделі *in vitro* та *in vivo*. Загалом алгоритм дослідження є вдалим та цілком виправдовує поставлену мету.

У третьому та четвертому розділах «комплексне дослідження впливу нових інгібіторів MGMT на пухлинні клітини *in vitro*» та «терапевтичний ефект нових інгібіторів MGMT на моделі *in vivo*» викладено результати власних досліджень; ці розділи є найбільш фундаментальним з точки зору залучення сучасних молекулярно-біологічних методів та демонструє оволодіння дисертанткою усіма сучасними лабораторними методами, вміння глобального аналізу зібраного матеріалу для вивчення інгібіторів MGMT.

У п'ятому розділі «Аналіз та узагальнення результатів» дисертаційної роботи, проведено аналіз отриманих результатів. Авторка, інтегруючи результати власних досліджень, зводить їх у єдину систему, зіставляє з даними джерел літератури, а також висловлює власні міркування з можливості використання нових інгібіторів, базуючись на їхньому впливі на ключові клітинні процеси - рівень аутофагії та виживаність клітин. У цьому розділі надається можливість у цілому охопити масштабну наукову роботу дисертантки, простежити за умотивованою послідовністю реалізованих дослідницьких кроків, усвідомити основні положення, їх інтерпретацію та

з'ясувати зв'язок з наступними висновками, які сформульовано в десяти пунктах, які повністю відповідають меті, задачам та результатам проведеного дослідження. Вірогідність одержаних результатів підтверджена їх адекватною статистичною обробкою.

Оприлюднення результатів дисертаційної роботи. Основні наукові результати дисертаційної роботи повністю висвітлені у наукових працях та оприлюднені на наукових конференціях та викладені у 7 наукових роботах: 3-х статтях у провідних фахових виданнях, затверджених МОН України, і у 4 пар тез доповідей. Основний зміст дисертаційної роботи повністю відображено в опублікованих наукових працях.

Недоліки та зауваження до дисертаційної роботи. В дисертації мають місце окремі орфографічні та стилістичні помилки, які, втім, не перешкоджають адекватному сприйняттю результатів роботи і не впливають на загальну високу оцінку дисертаційної роботи.

Втім, є декілька питань, що стосуються подальшої можливої роботи у цьому напрямку.

- 1) Як впливають вибрані інгібітори на нормальні клітини? Чи порівнювали ефективність інгібування росту пухлинних клітин, отриманих із пухлин різного ступеню агресивності?
- 2) Чи розглядає можливість використання пухлинних клітин раку молочної залози у культурах, у паралелі з використаною моделлю мишей із раком молочної залози? Чому було вибрано пухлинні лінії клітин HeP2 – раку гортані та T98G – клітин гліобластоми?

У цілому висловлені зауваження не є визначальними, не зменшують наукову новизну і практичну значимість результатів та не впливають на загальну високу оцінку дисертаційної роботи.

Висновок про дисертацію роботу

Вважаю, що дисертаційна робота здобувачки ступеня Доктора філософії **Жуваки Катерини Сергіївни** на тему «Вплив нових ненуклеозидних

інгібіторів MGMT на алкілувальну терапію пухлинних клітин в модельних системах» виконана на високому науковому рівні, не порушує принципів академічної доброчесності та є завершеним науковим дослідженням, сукупність теоретичних та практичних результатів якого розв'язує наукові проблеми, що мають істотне значення для галузі 09 Біологія. Дисертаційна робота за актуальністю, практичною цінністю та науковою новизною повністю відповідає вимогам чинного законодавства України, що передбачені у пп. 6-9 «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №44 від 12 січня 2022 р.

Здобувачка Жувака Катерина Сергіївна зробила цінний особистий внесок у науковий напрям «молекулярна онкологія» і заслуговує на присудження ступеня доктора філософії в галузі 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія.

Офіційний опонент:

Кашуба Олена Віталіївна, завідувачка лабораторії молекулярних механізмів трансформації клітини Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є Кавецького НАН України

д.б.н., ст. досл.

Олена КАШУБА

Підпис Олени Кашуби засвідчую:

В.о. вченого секретаря ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України

К.б.н



Людмила МАКОВЕЦЬКА