

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЖУВАКА КАТЕРИНА СЕРГІЇВНА

УДК 577.2:616Ф006

ДИСЕРТАЦІЯ

**ДОСЛІДЖЕННЯ НОВИХ НЕНУКЛЕОЗИДНИХ ІНГІБІТОРІВ
MGMT ПРИ АЛКІЛУВАЛЬНІЙ ХІМІОТЕРАПІЇ ПУХЛИННИХ
КЛІТИН В МОДЕЛЬНИХ СИСТЕМАХ**

Галузь знань 09 Біологія

Спеціальність 091 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії (PhD) в біології

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

Науковий керівник: **Лукаш Любов Леонідівна**, доктор біологічних наук, професор.

Київ – 2024

АНОТАЦІЯ

Жувака К.С. *«Дослідження нових ненуклеозидних інгібіторів MGMT при алкілувальній хіміотерапії пухлинних клітин в модельних системах»*
– Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 Біологія, за спеціальністю 091 Біологія, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ, 2024.

Одним із підходів у лікуванні онкозахворювань є алкілувальна хіміотерапія з використанням алкілувальних препаратів, які спричиняють пошкодження клітинної ДНК, а це, в свою чергу, може призводити до загибелі пухлинних клітин. Проте, алкілувальна хіміотерапія не завжди приносить очікувані результати у лікуванні онкохворих через активацію індукцйбельного репаративного ферменту O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансферази (MGMT), який видаляє алкільні групи з пошкодженої ДНК, знижуючи тим самим цитотоксичну дію хіміопрепаратів на ракові клітини. Відомо, що фермент MGMT переносить алкільну групу з позиції O⁶ гуаніну в клітинній ДНК на себе, внаслідок чого інактивується, тобто ця реакція є одноразовою та необерненою. Саме тому в клітинах при систематичному застосуванні алкілувальних сполук посилюється експресія гена *MGMT*, що в свою чергу, призводить до виникнення хіміорезистентності.

Для подолання таких негативних наслідків алкілувальної хіміотерапії як значна токсичність і хіміорезистентність в медичній практиці застосовують інгібітори індукцйбельного репаративного ферменту MGMT. Найвідоміші з нуклеозидних інгібіторів - це O⁶-бензилгуанін (O⁶-BG) та його похідні, які діють за механізмом конкурентного інгібування, тобто є псевдосубстратами для ферменту MGMT. На жаль, в ході багаторічних клінічних досліджень було

виявлено, що ці інгібітори є цитотоксичними для нормальних гематопоетичних та інших клітин, а також здатні спричиняти утворення вторинних пухлин. Застосування інших модифікацій O⁶-BG та його похідних, таких як кон'югати з глюкозою, також не призвело до очікуваних позитивних ефектів у лікуванні раку. Тому пошук нових інгібіторів MGMT залишається важливим завданням для покращення алкілувальної хіміотерапії пухлин.

З колекції потенційних низькомолекулярних нуклеозидних інгібіторів MGMT, які були виявлені методом напівгнучного молекулярного докінгу та синтезовані у відділі біомедичної хімії ІМБГ НАН України і далі досліджувалися у відділі генетики людини ІМБГ НАН України, було відібрано низку сполук, які демонстрували найбільш обнадійливі властивості в попередніх дослідах з використанням низки культуральних і біохімічного флуоресцентного методів. Низка відібраних пронумерованих нуклеозидних інгібіторів MGMT, була вперше детально досліджена в даній роботі.

Спочатку відібрані 5 інгібіторів MGMT у певній концентрації, підібраній раніше, були протестовані на можливу цитотоксичність двома культуральними методами з використанням клітин карциноми гортані людини (лінія Нер-2). Було показано, що нові інгібітори мають незначну цитотоксичність в концентрації 10 мкМ, крім інгібітора 46, який проявляв певну цитотоксичність при використанні одного з культуральних тестів. Тому інгібітор 46 було виключено з подальших дослідів.

Далі інгібувальну активність відібраних сполук та ефективність їх як інгібіторів репаративного ферменту MGMT досліджували з використанням клоногенного методу, який дозволяє оцінити їхню здатність сенсibilізувати пухлинні клітини до цитотоксичної дії алкілувальних сполук. За сумарними даними декількох експериментів на пухлинних клітинах Нер-2 було показано, що три інгібітори 41, 41В та 89 проявляють інгібувальну активність у

комбінації з модельною алкілувальною сполукою N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином (MNNG) навіть більшу, ніж стандартний інгібітор O⁶-BG. Ці нові інгібітори діяли в більш широкому діапазоні концентрацій, і, що особливо є важливим при лікуванні, вони підсилювали цитотоксичний ефект алкілувального агента за його найменших концентрацій.

Далі постало питання, чи впливають нові інгібітори на цитотоксичний ефект MNNG через пряму систему репарації, представлену ферментом MGMT, як і стандартний інгібітор O⁶-бензилгуанін. Щоб дослідити ефект і тривалість інгібувальної дії досліджуваних сполук відносно MGMT, використовували метод Вестерн-блот аналізу. Оскільки фермент MGMT є «суїцидальним» білком, за зміною його кількості в оброблених клітинах можна, певним чином, оцінити інгібувальну активність сполук. Дійсно було показано, що нові інгібітори здійснюють свій інгібувальний вплив через фермент MGMT, адже результати продемонстрували стійке зниження кількості білка MGMT в оброблених клітинах лінії HEP-2 та в гліомних клітинах лінії T98G. Також було зафіксовано синергічний ефект комбінованої обробки новими інгібіторами та алкілувальною сполукою MNNG. Крім того, на клітинах T98G було виявлено, що термін інгібувальної дії однієї дози досліджуваного інгібітора в концентрації 10 мкМ, становить 24 години, тобто діє він доволі м'яко, на відміну від стандартного інгібітора O⁶-BG, який демонстрував стійке зниження білка MGMT навіть після третьої доби інкубації з ним.

Для дослідження впливу нових інгібіторів на деякі ключові клітинні процеси визначали їхній вплив на рівень аутофагії та летальність пухлинних клітин людини в культурі. Отримані результати дали змогу оцінити цитотоксичність і ефективність досліджуваних сполук у пухлинних клітинах, що мають різні рівні експресії гена *MGMT*. У дослідженні використовували

гліомні клітинні лінії: T98G, яка характеризується високим рівнем експресії *MGMT*, та U251MG, яка має метильований промотор гена *MGMT*, що передбачає відсутність білка *MGMT*. Встановлено, що самі по собі нові інгібітори (41 та 41B) не впливають на виживаність гліомних клітин та рівень аутофагії в клітинах обох ліній. Однак, обробка цими інгібіторами клітин лінії T98G підвищує чутливість останніх до алкілувальних сполук. В той же час в клітинах U251MG такі ефекти відсутні. Ці дані вказують на те, що досліджувані сполуки можуть мати терапевтичний ефект при комбінованій алкілувальній хіміотерапії гліом, які мають високий рівень *MGMT* в ракових клітинах.

Для дослідження терапевтичних властивостей нових інгібіторів було створено модель *in vivo* з використанням лабораторних мишей лінії ICR, для яких характерне спонтанне утворення пухлин молочної залози. На цій моделі було підтверджено, що терапія алкілувальною сполукою MNNG спричиняє уповільнення росту пухлин. Комбінована терапія з використанням нових інгібіторів 41, 41B та 89 продемонструвала ще більш виражене уповільнення росту пухлин, а в окремих випадках навіть їхню регресію. Тим самим вперше було зафіксовано терапевтичний ефект ненуклеозидних інгібіторів *MGMT* на моделі *in vivo*. Зокрема, інгібітор 89 показав високу ефективність, що призвело до стійкої регресії 5 із 6 досліджуваних пухлин. Інгібітори 41 та 41B також проявили терапевтичний ефект, проте, не такий виражений, як у інгібітора 89.

Окрім вимірювання динаміки росту пухлин, було проведено молекулярні дослідження на зразках пухлин. За результатами Вестерн-блот аналізу було виявлено зниження рівня білка *MGMT* у пухлинних клітинах молочної залози після застосування комбінованої терапії. Важливо відзначити, що інгібітор 41 проявив здатність знижувати рівень *MGMT* навіть у великих пухлинах, тоді як інгібітори 41B та 89 були ефективними лише у випадку новоутворень

меншого розміру. Таким чином, у даній роботі продемонстровано, що регресія пухлин супроводжувалася зниженням рівня білка MGMT у пухлинних клітинах. Це спостереження вказує на потенційне клінічне значення нових інгібіторів для терапії пухлин з високим рівнем MGMT.

Також в ході досліджень *in vivo* виявлено, що інгібітори 41 та 41В мали деякі побічні ефекти під час комбінованої терапії, пов'язані з морфологією селезінки та некрозом прилеглих до пухлини тканин, що робить їх менш перспективними кандидатами для подальших досліджень. Отже, інгібітор 89 показав найбільш обнадійливі результати в досліджуваній модельній системі.

Додатково нами було проведено пілотне дослідження щодо ймовірних механізмів регресії пухлин. Було виявлено, що в злоякісних тканинах під дією комбінованої обробки з новими інгібіторами з'являються активні форми каспази 3. Це свідчить про можливість апоптичного шляху регресії пухлин молочної залози мишей ICR під час комбінованої алкілувальної хіміотерапії.

Таким чином, у даній роботі вперше проведено комплексне дослідження нових нуклеозидних інгібіторів MGMT у різних модельних системах. Хоча спостерігалася певна варіабельність властивостей досліджуваних сполук, загалом, три нові інгібітори продемонстрували обнадійливі результати в різних експериментальних умовах. Отже, особливий інтерес для подальших досліджень представляють інгібітори за номерами 41, 41В та 89, які показали низьку цитотоксичність у концентрації 10 мкМ і здатність підсилювати ефект алкілувального препарату при комбінованій терапії з низькими дозами останнього, що знижує ризик побічних ефектів. Це дослідження відкриває нові перспективи для розробки персоналізованих терапевтичних стратегій і глибшого розуміння механізмів дії нуклеозидних інгібіторів, що може значно покращити результати лікування онкологічних захворювань.

Ключові слова: фермент MGMT, алкілувальна хіміотерапія, пошкодження ДНК, лікування, інгібітори, цитотоксичність, гліобластома, культура пухлинних клітин, T98G, клітинний сигналінг, візуалізація клітин, флуоресценція, аутофагія, апоптоз, онкологія.

Список публікацій за темою дисертації:

Статті у наукових фаховий журналах:

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.*

Тези доповідей на наукових конференціях:

4. **K. S. Zhuvaka**, A. P. Iatsyshyna, Z. M. Nidoeva, G. P. Volynets, T. P. Ruban, L. L. Macewicz, S. M. Yarmoluk, L. L. Lukash. Investigation of effectiveness of MGMT potential inhibitors in human cell culture. XV IMBG all-Ukrainian Conference of Young Scientists with international participation. *Biopolym. Cell.* 2021; 37(3):185-244. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A56>

5. **K. S. Zhuvaka**, L. L. Macewicz, O. O. Piven, G. P. Volynets, T. P. Ruban, S. M. Yarmoluk, L. L. Lukash. Impact of new MGMT inhibitors on autophagy in glioma cells in vitro at combined action with alkylating agent N-methyl-N’nitro-Nnitrosoguanidine. Conference of young scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics — 2023. The conference is dedicated to young scientists who defend Ukraine and those who gave their lives for our Motherland. *Biopolym. Cell.* 2023; 39(1):60-73. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A89>

6. **K. S. Zhuvaka**, O. O. Piven, L. L. Macewicz, G. P. Volynets, T. P. Ruban, S. M. Yarmoluk, L. L. Lukash. Comparison of new non-nucleoside MGMT inhibitors’ effectiveness in HEp-2 and T98G cancer cells. The Conference of Young Scientists within the framework of XVIII International Conference «Factors in Experimental Evolution of Organisms», dedicated to the 50th anniversary of the foundation of the Institute of Molecular Biology and Genetics of the NASU. *Biopolym. Cell.* 2023; 39(4):311-322. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000AA8>

7. **K. S. Zhuvaka**, L. L. Macewicz, T. P. Ruban, G. P. Volynets, S. M. Yarmoluk, L. L. Lukash. The therapeutic effect of new non-nucleoside MGMT inhibitors during combined alkylating chemotherapy in vivo. The materials of the XVIII Ukrainian Conference of Young Scientists of IMBG of NAS of Ukraine. Biopolym. Cell. 2024; 40(2):153-168. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000AB8>

8. **K. S. Zhuvaka**, L. L. Macewicz, O. O. Piven, G. P. Volynets, T. P. Ruban, S. M. Yarmoluk, L. L. Lukash. Novel non-nucleoside MGMT inhibitors: potential in combined alkylating chemotherapy. BioGENext Conference: Shaping the future of medicine through biomedical research and development. Biopolym. Cell. 2024; 40(3):242. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000ADC>

ABSTRACT

Zhuvaka K.S. «*The Impact of Novel Non-Nucleoside MGMT Inhibitors on Alkylating Therapy of Cancer Cells in Model Systems*» – A qualification scientific work as a manuscript.

The thesis for a scientific degree of Doctor of Philosophy by speciality 091 – Biology (09 – Biology) – Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, 2024.

One of the approaches in cancer treatment is alkylating chemotherapy, which uses alkylating agents to cause DNA damage, potentially leading to the death of cancer cells. However, alkylating chemotherapy does not always yield the expected results in cancer patients due to the activity of the repair enzyme O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), which removes alkyl groups from DNA, thereby reducing the cytotoxic effect of chemotherapeutic agents on cancer cells. The MGMT enzyme transfers the alkyl group from the O⁶ position of guanine in cellular

DNA onto itself, rendering it inactive, as this reaction is a single-use and irreversible process. Consequently, cells must enhance the expression of the MGMT gene to protect themselves under systematic alkylating agent exposure, which leads to the development of chemoresistance.

To overcome such negative consequences of alkylating chemotherapy, such as significant toxicity and chemoresistance, MGMT inhibitors are used in medical practice. The most well-known of these are O⁶-benzylguanine (O⁶-BG) and its derivatives, which act by competitive inhibition, serving as pseudosubstrates for the MGMT enzyme. Unfortunately, long-term clinical studies have revealed that these inhibitors are cytotoxic to hematopoietic cells and can induce the formation of secondary tumors. Other modifications of O⁶-BG and its derivatives, such as conjugation with glucose, have also failed to achieve the desired positive effects in cancer treatment. Therefore, the search for new MGMT inhibitors remains an important task for improving alkylating chemotherapy of tumors.

From a collection of potential low-molecular-weight non-nucleoside MGMT inhibitors identified by semi-flexible molecular docking and synthesized at the Department of Biomedical Chemistry of the IMBG of the NAS of Ukraine, and later studied at the Department of Human Genetics of the IMBG of the NAS of Ukraine, several compounds were selected that showed the most promising properties in preliminary experiments using various cell culture and biochemical fluorescence methods. Several numbered non-nucleoside MGMT inhibitors were first investigated in detail in this work.

Initially, five MGMT inhibitors were tested for potential cytotoxicity at a previously determined concentration using two cell culture methods on human laryngeal carcinoma cells (HEp-2 line). It was shown that the new inhibitors exhibited low cytotoxicity at a concentration of 10 μ M, except for inhibitor 46,

which showed some cytotoxicity in one of the culture tests. Therefore, inhibitor 46 was excluded from further experiments.

Next, the inhibitory activity of the selected compounds and their efficacy as MGMT repair enzyme inhibitors were investigated using the clonogenic assay, which allows the assessment of their ability to sensitize tumor cells to the cytotoxic effects of alkylating compounds. The cumulative data from several experiments on HEp-2 tumor cells demonstrated that three inhibitors, 41, 41B, and 89, exhibited greater inhibitory activity in combination with the model alkylating agent N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) than the standard inhibitor O⁶-BG. These new inhibitors worked over a broader concentration range and, importantly for treatment, enhanced the cytotoxic effect of the alkylating agent at its lowest concentrations.

The next question was whether the new inhibitors influenced the cytotoxic effect of MNNG through the direct repair system represented by the MGMT enzyme, similar to the standard inhibitor O⁶-benzylguanine. To investigate the effect and duration of the inhibitory action of the studied compounds on MGMT, Western blot analysis was used. Since MGMT is a "suicidal" protein, changes in its levels in treated cells can provide some insight into the inhibitory activity of the compounds. It was indeed shown that the new inhibitors exerted their inhibitory effect through the MGMT enzyme, as the results demonstrated a sustained reduction in MGMT protein levels in treated HEp-2 cells and glioma T98G cells. A synergistic effect of combined treatment with the new inhibitors and the alkylating agent MNNG was also observed. Additionally, in T98G cells, it was found that the inhibitory effect of a single dose of the inhibitor at a concentration of 10 μ M lasted for 24 hours, meaning it acted relatively mildly, unlike the standard inhibitor O⁶-BG, which showed sustained MGMT protein suppression even after 72 hours of incubation.

To study the effects of the new inhibitors on key cellular processes, their impact on the level of autophagy and the lethality of cultured human tumor cells was assessed. The obtained results allowed an evaluation of the cytotoxicity and efficacy of the compounds in tumor cells with different levels of MGMT gene expression. The study used glioma cell lines: T98G, characterized by high MGMT expression, and U251MG, which has a methylated MGMT gene promoter, indicating the absence of the MGMT protein. It was established that the new inhibitors (41 and 41B) alone did not affect glioma cell survival or autophagy levels in either cell line. However, treatment with these inhibitors increased the sensitivity of T98G cells to alkylating compounds, while such effects were absent in U251MG cells. These data suggest that the compounds may have therapeutic potential in combination with alkylating chemotherapy in glioma patients with high MGMT expression in cancer cells.

For the investigation of the therapeutic properties of the new inhibitors, an *in vivo* model was created using ICR mice, which are prone to spontaneous mammary tumor development. In this model, it was confirmed that treatment with the alkylating compound MNNG caused tumor growth retardation. Combined therapy with the new inhibitors 41, 41B, and 89 demonstrated even more pronounced tumor growth retardation, and in some cases, even tumor regression. This study thus established for the first time the therapeutic effect of non-nucleoside MGMT inhibitors in an *in vivo* model. In particular, inhibitor 89 showed high efficacy, leading to stable regression in 5 of 6 studied tumors. Inhibitors 41 and 41B also demonstrated a therapeutic effect, though not as pronounced as inhibitor 89.

In addition to measuring tumor growth dynamics, molecular studies were conducted on tumor samples. Western blot analysis revealed a decrease in MGMT protein levels in mammary tumor cells after combined therapy. Notably, inhibitor 41 was capable of reducing MGMT levels even in large tumors, whereas inhibitors 41B

and 89 were effective only in smaller tumors. Thus, this study demonstrated that tumor regression was accompanied by a reduction in MGMT protein levels in tumor cells, suggesting the potential clinical significance of these new inhibitors in the treatment of tumors with high MGMT levels.

Moreover, *in vivo* studies revealed that inhibitors 41 and 41B had some side effects during combination therapy, affecting spleen morphology and causing necrosis in tissues adjacent to the tumor, making them less promising candidates for further research. In contrast, inhibitor 89 produced the most promising results in the model system studied.

In addition, a pilot study on the potential mechanisms of tumor regression was conducted, revealing that active forms of caspase-3 appeared in malignant tissues following combined treatment with the new inhibitors, indicating a possible apoptotic pathway in the regression of mammary tumors in ICR mice during combined alkylating chemotherapy.

Thus, this study represents the first comprehensive investigation of new non-nucleoside MGMT inhibitors in various model systems. Although some variability in the properties of the studied compounds was observed, three new inhibitors generally showed promising results across different experimental conditions. Therefore, inhibitors 41, 41B, and 89, which exhibited low cytotoxicity at 10 μ M and the ability to enhance the effect of alkylating agents in combination therapy at low doses, thereby reducing the risk of side effects, are of particular interest for further research. This study opens new prospects for the development of personalized therapeutic strategies and a deeper understanding of the mechanisms of action of non-nucleoside inhibitors, which could significantly improve the outcomes of cancer treatment.

Keywords: MGMT enzyme, alkylating chemotherapy, DNA damage, treatment, inhibitors, cytotoxicity, glioblastoma, cancer cell line, T98G, cell signaling, cell imaging, fluorescence, autophagy, apoptosis, oncology.

List of publications:

Articles:

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>
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>
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>

Conference abstracts:

4. **K. S. Zhuvaka**, A. P. Iatsyshyna, Z. M. Nidoeva, G. P. Volynets, T. P. Ruban, L. L. Macewicz, S. M. Yarmoluk, L. L. Lukash. Investigation of effectiveness of MGMT potential inhibitors in human cell culture. XV IMBG all-Ukrainian Conference of Young Scientists with international

participation. Biopolym. Cell. 2021; 37(3):185-244.
<http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A56>

5. **K. S. Zhuvaka**, L. L. Macewicz, O. O. Piven, G. P. Volynets, T. P. Ruban, S. M. Yarmoluk, L. L. Lukash. Impact of new MGMT inhibitors on autophagy in glioma cells in vitro at combined action with alkylating agent N-methyl-N'nitro-Nnitrosoguanidine. Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics — 2023. The conference is dedicated to young scientists who defend Ukraine and those who gave their lives for our Motherland. Biopolym. Cell. 2023; 39(1):60-73. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A89>

6. **K. S. Zhuvaka**, O. O. Piven, L. L. Macewicz, G. P. Volynets, T. P. Ruban, S. M. Yarmoluk, L. L. Lukash. Comparison of new non-nucleoside MGMT inhibitors' effectiveness in HEp-2 and T98G cancer cells. The Conference of Young Scientists within the framework of XVIII International Conference «Factors in Experimental Evolution of Organisms», dedicated to the 50th anniversary of the foundation of the Institute of Molecular Biology and Genetics of the NASU. Biopolym. Cell. 2023; 39(4):311-322. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000AA8>

7. **K. S. Zhuvaka**, L. L. Macewicz, T. P. Ruban, G. P. Volynets, S. M. Yarmoluk, L. L. Lukash. The therapeutic effect of new non-nucleoside MGMT inhibitors during combined alkylating chemotherapy in vivo. The materials of the XVIII Ukrainian Conference of Young Scientists of IMBG of NAS of Ukraine. Biopolym. Cell. 2024; 40(2):153-168. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000AB8>

8. **K. S. Zhuvaka**, L. L. Macewicz, O. O. Piven, G. P. Volynets, T. P. Ruban, S. M. Yarmoluk, L. L. Lukash. Novel non-nucleoside MGMT inhibitors: potential in combined alkylating chemotherapy. BioGENext Conference: Shaping the future of medicine through biomedical research and development. Biopolym. Cell. 2024; 40(3):242. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000ADC>

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	20
ВСТУП	23
РОЗДІЛ 1	30
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	30
1.1. Характеристика репаративного ферменту MGMT	30
1.1.1. Роль MGMT в репарації ДНК	31
1.1.2. Структура і функції MGMT	32
1.1.3. Варіабельність експресії гену <i>MGMT</i> в різних тканинах організму	35
1.2. Хіміотерапія пухлин з використанням алкілувальних сполук	37
1.2.1. Алкілувальні сполуки: різновиди та механізми їхньої дії	37
1.2.2. Застосування алкілувальних сполук у хіміотерапії пухлин	39
1.2.3. Роль MGMT у виникненні хіміорезистентності та стратегії її подолання	42
1.3. Інгібітори MGMT	43
1.3.1. Загальна характеристика відомих інгібіторів MGMT	44
1.3.1.1. O ⁶ -бензилгуанін та його похідні	44
1.3.1.2. Глюкозо-кон'юговані інгібітори	47
1.3.1.3. ДНК-спрямовані інгібітори	49

1.3.2. Застосування інгібіторів MGMT у комбінованій алкілувальній хіміотерапії пухлин	49
1.4. MGMT як біомаркер у комбінованій хіміотерапії пухлин	51
1.5. Апоптоз та аутофагія як терапевтичні стратегії в лікуванні раку	52
РОЗДІЛ 2	57
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	57
2.1. Нові інгібітори MGMT	57
2.2. Клітинні лінії та їх культивування	57
2.3. Дослідження цитотоксичності потенційних інгібіторів MGMT з використанням МТТ-тесту	58
2.4. Дослідження потенційних інгібіторів MGMT з використанням клоногенного тесту	59
2.5. Дослідження відібраних інгібіторів MGMT <i>in vivo</i> на модельних мишах лінії ICR	60
2.5.1. Створення експериментальної моделі <i>in vivo</i>	60
2.5.2. Обробки та експериментальні групи модельних тварин	61
2.6. Молекулярно-генетичні методи	61
2.6.1. Об'єкти для виділення білків	61
2.6.2. Екстракція білків	62
2.6.3. Електрофорез білків в ПААГ	62
2.6.4. Трансфер	63

2.6.5. Вестерн-блот аналіз	63
2.7. Флуоресцентна спектрофотометрія та мікрофотографія	64
2.7.1. Визначення рівня аутофагії за допомогою MDC після обробок досліджуваними сполуками	64
2.7.2. Визначення рівня живих і мертвих клітин після обробок досліджуваними сполуками	65
2.8. Статистичний аналіз	66
РОЗДІЛ 3	67
КОМПЛЕКСНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ НОВИХ ІНГІБІТОРІВ MGMT НА ПУХЛИННІ КЛІТИНИ <i>IN VITRO</i>	67
3.1. Перевірка можливої цитотоксичної дії потенційних інгібіторів MGMT	67
3.2. Порівняння ефективності дії потенційних інгібіторів MGMT	71
3.3. Вивчення інгібувальних властивостей досліджувальних сполук	74
3.4. Дослідження впливу нових інгібіторів на пухлинні клітини людини з різним рівнем експресії гену <i>MGMT</i>	81
3.4.1. Вплив нових інгібіторів на аутофагію в пухлинних клітинах	82
3.4.2. Вплив нових інгібіторів на летальність пухлинних клітин	86
РОЗДІЛ 4	94
ТЕРАПЕВТИЧНИЙ ЕФЕКТ НОВИХ ІНГІБІТОРІВ MGMT НА МОДЕЛІ <i>IN VIVO</i>	94
4.1. Створення експериментальної моделі на основі мишей лінії ICR	94

4.2. Порівняння ефективності терапевтичної дії нових інгібіторів MGMT на моделі алкілувальної терапії пухлин молочної залози	97
4.3. Вивчення впливу нових інгібіторів на рівень білка MGMT в пухлинах молочної залози	100
4.4. Дослідження ймовірних механізмів регресії пухлин під впливом комбінованої хіміотерапії пухлин	103
РОЗДІЛ 5	108
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	108
ВИСНОВКИ	121
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	123
ДОДАТОК А	142

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДМСО – диметилсульфоксид

ПААГ – поліакриламідний гель

APC – adenomatous polyposis coli – аденоматозна поліпозна паличка, регулятор WNT-сигналіngu

APEX1 – apurinic/apyrimidinic endodeoxyribonuclease 1 – апуриново/апіримідинова ендодеоксирибонуклеаза 1

BCNU – carmustine – кармустин

CCNU – lomustine – ломустин

DIGPor – ДНК-спрямований інгібітор катіонний порфірин 5,10,15,20-тетракіс(диізопропіл-гуанідин)-21H,23H-порфін

DMEM – Dulbecco's modified Eagle medium – культуральне поживне середовище за модифікацією Дульбеко

DTIC – dacarbazine – дакарбазин

ERCC1 – excision repair cross-complementation group 1 – ексцизійна репарація перехресної комплементарної групи 1

FBS – fetal bovine serum – інактивована сироватка великої рогатої худоби

FCCP – carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon – карбонілціанід 4-(трифторметокси)фенілгідрозон

IDH1 – isocitratedehydrogenase 1 – ізоцитратдегідрогеназа 1

Glu – glucose – глюкоза

GLUT-1 – glucose transporter 1 – транспортер глюкози 1

LC3B – microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B – Асоційовані з мікотрубочками білки 1A/1B легкого ланцюга 3B

MARP – anti-methyltransferase antibody recognizable protein – білок, що розпізнається антитілами проти MGMT

MDC – monodansylcadaverine – монодансилкадаверин

MGMT – O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase – O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза, або O⁶-алкілгуанін-трансфераза (AGT)

MMR – mismatch repair system – репаративна система для неправильно спарених основ ДНК

MNNG – N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine – N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин

MTT – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) – 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід

O⁶-BG – O⁶-benzylguanine – O⁶-бензилгуанін

O⁶-BTG – O⁶-(4-bromothiobenzyl)-guanine – O⁶-(4-бромотіобензил)-гуанін

PBS – phosphate-buffered saline – фосфатний буферний розчин

SDS – Sodium dodecyl sulfate – розчин додецилсульфату натрію

STZ – streptozocine – стрептозотонин

TBS – Tris-buffered saline – трисовий буферний розчин

TBST – Tris-buffered saline with Tween 20 – трісовий буферний розчин з Твіном 20

TCF – T-cell factor – Т-клітинний фактор

TMZ – temozolomide – темозоломід

XPA – xeroderma pigmentosum, complementation group A - ксеродермія пігментна, комплементарна група А

XRCC1 – x-ray repair cross-complementing 1 – перехресна комплементарна репарація пошкоджень, внаслідок випромінювання

ВСТУП

Актуальність теми. Рівень смертності від онкозахворювань займає друге місце у світі після серцево-судинних захворювань. Одним із основних методів лікування раку є алкілувальна хіміотерапія, яка полягає в алкілюванні ДНК пухлинних клітин, що призводить до виникнення численних пошкоджень, несумісних із життям клітин, що призводить до їхньої загибелі. Проте, ця методика лікування раку не завжди ефективна через наявність у пухлинних клітинах захисного механізму проти алкілувальних препаратів. Цей механізм передбачає активну дію індукцйбельного репаративного ферменту О⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансферази (MGMT), який видаляє алкільні групи з ДНК, знижуючи цитотоксичну дію хіміопрепаратів, спрямованих на знищення пухлинних клітин. У нормальних клітинах фермент MGMT відіграє ключову роль у підтримці життєдіяльності, однак у злоякісних клітинах його активність під час алкілувальної хіміотерапії є небажаною, так як призводить до хіміорезистентності. З цієї причини в медичній практиці застосовують інгібітори MGMT, які включають до схем лікування онкозахворювань для підвищення їхньої ефективності. Крім того, додавання інгібіторів MGMT до терапії може знизити загальну токсичність лікування шляхом зменшення доз алкілувальних препаратів та їхньої побічної дії.

О⁶-бензилгуанін та його похідні, як найпоширеніші нуклеозидні інгібітори MGMT, показали обнадійливі результати в комбінованій хіміотерапії. Однак на третій фазі клінічних випробувань було виявлено суттєві побічні ефекти, зокрема стійку мієлосупресію та виникнення вторинних пухлин при тривалому використанні цих інгібіторів у лікуванні онкологічних захворювань. Для вирішення цієї проблеми було розроблено глюкозо-кон'юговані інгібітори з метою підвищення їхньої

пухлиноспецифічності, оскільки відомо, що злоякісні тканини поглинають більше глюкози. Проте, цей підхід також виявився недосконалим, оскільки кон'юговані з глюкозою інгібітори виводились із пухлинних клітин за допомогою ефлюксних насосів, що значно знижувало їхню ефективність у хіміотерапії. Інші підходи до модифікації та застосування інгібіторів також не принесли очікуваних результатів, що робить пошук альтернативних інгібіторів MGMT актуальним завданням.

Оскільки O⁶-бензилгуанін та його похідні, які проявили серйозні побічні ефекти в клінічних дослідженнях, є сполуками нуклеозидної природи, створення ненуклеозидних сполук стало актуальним напрямом досліджень. Відмінна хімічна структура таких інгібіторів може знизити їхню цитотоксичну дію на гематопоетичні клітини під час комбінованої хіміотерапії. Проте, оскільки цей клас потенційних інгібіторів MGMT є новим, необхідно провести комплексне дослідження їхніх властивостей, таких як цитотоксичність, інгібувальні властивості, ефективність їхньої дії, а також дослідити їхній вплив на ключові метаболічні процеси в клітинах та загальну безпечність для організму.

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 алкілувальної 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-нітрозогуанідином,

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 культуральних тестів *in vitro*.
2. Дослідити ефективність (здатність сенситивізувати клітини до дії алкілювальної 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 алкілювальною сполукою MNNG *in vivo* на модельних мишах лінії ICR.
6. Дослідити здатність нових інгібіторів у комбінації з алкілювальною 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 алкілювальною 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 ліній клітин людини, 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 ненуклеозидних інгібіторів MGMT у комбінації з алкілувальною 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 алкілувальною сполукою. Вперше встановлено тривалість дії (протягом доби) нових ненуклеозидних інгібіторів у концентрації 10 мкМ на клітинах лінії T98G. Вперше показано, що комбінована терапія з використанням нових ненуклеозидних інгібіторів призводить до посилення аутофагії та підвищення летальності пухлинних клітин лінії T98G, що характеризуються високим рівнем білка MGMT. Також вперше виявлено терапевтичний ефект нових ненуклеозидних 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 апоптичного механізму регресії пухлин під час комбінованої терапії із застосуванням нових інгібіторів MGMT.

Практичне значення одержаних результатів. Було відібрано три нові ненуклеозидні інгібітори MGMT, які характеризуються низькою цитотоксичністю, інгібувальними властивостями та ефективністю дії в комбінації з алкілувальною 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 алкілувальної хіміотерапії пухлин з високим рівнем репаративного білка MGMT.

Отримані результати вносять вагомий внесок у базові знання про новий клас ненуклеозидних інгібіторів MGMT та їх взаємодію з алкілувальними сполуками в різних експериментальних умовах. Крім того, ці результати розширюють розуміння впливу ненуклеозидних 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 культуральні досліди на гліомних клітинах. Дослідження рівня аутофагії та летальності клітин методами флуоресцентної спектрометрії 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 за співпрацю протягом виконання експериментальної роботи, обговорення та аналізу результатів, а також за допомогу у підготовці матеріалів до публікацій.

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).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 8 наукових праць, з них 3 статті у наукових журналах та 5 тези доповідей у збірках матеріалів наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, двох розділів результатів досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, а також додатку. Роботу викладено на 143 сторінках стандартного друкованого тексту, текст містить 23 рисунки і 4 таблиці. Список використаних джерел охоплює 143 найменування.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Клітини постійно зазнають шкідливого впливу зовнішніх та внутрішніх факторів. Пошкодження нативної структури ДНК може призвести до порушення процесів життєдіяльності клітин. У випадку сумісності з життям клітина може передавати ці пошкодження дочірнім клітинам після поділу. Якщо ж первинних пошкоджень ДНК надто багато, і вони не видаляються вчасно репараційними системами, то це може призвести до мутацій, хромосомних аберацій і загибелі клітин через апоптоз [1].

Саме тому в нормальних клітинах розвинені різноманітні системи репарації ДНК відповідно до типу індукованих первинних пошкоджень ДНК. Однією з таких надважливих систем є пряма репарація алкільних аддуктів, яка реалізується за допомогою репаративного фермента MGMT.

1.1. Характеристика репаративного ферменту MGMT

Фермент O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза (MGMT), або ж O⁶-алкільгуанін-ДНК алкільтрансфераза (AGT), належить до родини ферментів, відомих як алкільтрансферази. Ці ферменти спеціалізуються на перенесенні алкільних груп з однієї молекули на іншу, а у випадку MGMT, його специфічна функція полягає у перенесенні метильної групи із положення O⁶ гуаніну. Ця родина ферментів відноситься до систем прямої репарації і

відіграє ключову роль у захисті генетичного матеріалу клітини від пошкоджень, які можуть призводити до мутацій або загибелі клітини. MGMT був знайдений у багатьох видів бактерій, архей, грибів та в усіх представників тваринного царства, яких досліджували. Цікаво, що серед представників рослинного царства не було знайдено жодного виду з геном *MGMT* [2]. Порівнюючи білок різних видів і, навіть, таксонів, було виявлено, що фермент має висококонсервативну структуру, що свідчить про важливість його функції в організмі [2, 3].

1.1.1. Роль MGMT в репарації ДНК. Одним з найпоширеніших видів пошкоджень ДНК є алкілювання гуанінових основ у позиції O⁶. Особливо часто утворюється O⁶-метилгуанін, що пояснюється його найменшим розміром серед O⁶-алкілгуанінів. O⁶-метилгуанін є причиною точкових мутацій, які виникають через неправильне спарювання з тиміном під час реплікації, що призводить до трансзиції G:C → A:T (гуанін : цитозин → аденін : тимін). Отже, цей процес є мутагенним і цитотоксичним [4].

Під час реплікації ДНК система репарації «намагається» видалити некоректну пару O⁶-метилгуанін-тимін. У впізнанні та виправленні неправильно спарованих пар основ беруть участь репаративні білки системи MMR (Mismatch Repair), такі як MLH1, MSH2, MSH3, MSH6 та PMS2. Білок MLH1 (MutL Homolog 1) є частиною комплексу MutL α , який взаємодіє з іншими білками для виявлення та видалення помилок у спарюванні нуклеотидів у ДНК. MSH2 (MutS Homolog 2) утворює комплекси з білками MSH6 (MutS Homolog 6) або MSH3 (MutS Homolog 3). Ці комплекси, MSH2-MSH6 і MSH2-MSH3, забезпечують виявлення неправильно спарованих нуклеотидів і ініціюють процес репарації. Білок PMS2 (Postmeiotic Segregation Increased 2) утворює комплекс з MLH1, формуючи активну структуру, яка

бере участь у видаленні неправильно спарованих основ і репарації ДНК [5-7]. Однак при значних пошкодженнях клітинної ДНК активація цих білків призводить до так званих "марних" циклів репарації, які, врешті-решт, спричиняють арешт клітинного циклу та загибель клітини [3, 5, 8].

Для нормальних клітин характерна репарація пошкоджень до початку реплікації, що здійснюється із залученням індукцибельного білка прямої репарації MGMT [2]. MGMT індукується у відповідь на наявність метильованої ДНК у клітині і діє шляхом переносу метильної групи з O⁶-метилгуаніну на свій власний активний сайт, де акцептором є цистеїн. Це призводить до відновлення нормальної структури гуанінової основи в ДНК, що дозволяє клітині уникнути мутацій і забезпечити геномну стабільність [3, 5].

Отже, MGMT є ключовим компонентом механізму захисту клітини від мутацій та цитотоксичності, спричинених алкілюванням ДНК. Недостатня активність цього білка може призводити до підвищеної чутливості до алкілювальних агентів та збільшення частоти мутацій, що робить його важливим об'єктом для досліджень у контексті канцерогенезу та терапії раку.

1.1.2. Структура і функції MGMT. Білок MGMT є дуже консервативним за своєю структурою. Він складається з одного поліпептидного ланцюга і має два домени: С-кінцевий та N-кінцевий. С-кінцевий домен містить активний сайт та ДНК-зв'язувальну ділянку, які з'єднані аспарагіновою петлею, утвореною залишком Asn137 (для MGMT людини). N-кінцевий домен містить зв'язаний атом цинку, що відіграє важливу структурну роль і стабілізує комплекс ДНК-фермент [3, 9].

MGMT взаємодіє з ДНК через мотив спіраль-поворот-спіраль, який локалізований у ДНК-зв'язувальній ділянці ферменту. Розпізнавальна спіраль має компактну структуру і містить гідрофобні залишки, що дозволяють їй щільно упаковуватися в малу борозенку ДНК-спіралі. Така конфігурація дозволяє MGMT зв'язуватися з ДНК з мінімальною специфічністю до послідовності, що є критичним для його функціонування. Зв'язування ферменту зі структурою ДНК спричиняє її зміщення, включаючи згинання ланцюга на 15 градусів, розширення малої борозенки та витіснення O^6 -метильованої гуанінової основи до кишені активного сайту ферменту [3, 8].

Ключову роль у цій реакції відіграє залишок тирозину (Tyr114), який зазнає ротації, що спричиняє стеричний або електростатичний вплив, необхідний для активації процесу деметилювання. Важливу функцію також виконує аргініновий залишок (Arg128), який діє як «палець», що стабілізує зв'язок між ферментом і ДНК-спіралю, забезпечуючи належне позиціонування субстрату. Ці залишки є критичними для роботи ферменту, і вони зберігаються серед різних видів, у яких наявний MGMT. При цьому, залишок тирозину у деяких видів може бути замінений фенілаланіном, що виконує аналогічну функцію [3, 8, 10].

Механізм перетворення O^6 -метилгуаніну на гуанін, що здійснюється активним сайтом MGMT, полягає в перенесенні метильної групи на фермент. Центральну роль у цій реакції відіграє залишок цистеїну (Cys145), який виступає як акцептор метильної групи. Цистеїн стає високореактивним завдяки взаємодії з консервативними залишками гістидину (His146) та глутамінової кислоти (Glu172). Ці залишки утворюють мережу водневих зв'язків, яка включає молекулу води між цистеїном та гістидином (Cys145-вода-His146-Glu172) (рис.1.1). Така організація забезпечує ефективне

перетворення цистеїну в тіолатний аніон, що захоплює метильний залишок, здійснюючи ключовий етап у процесі репарації ДНК [3].

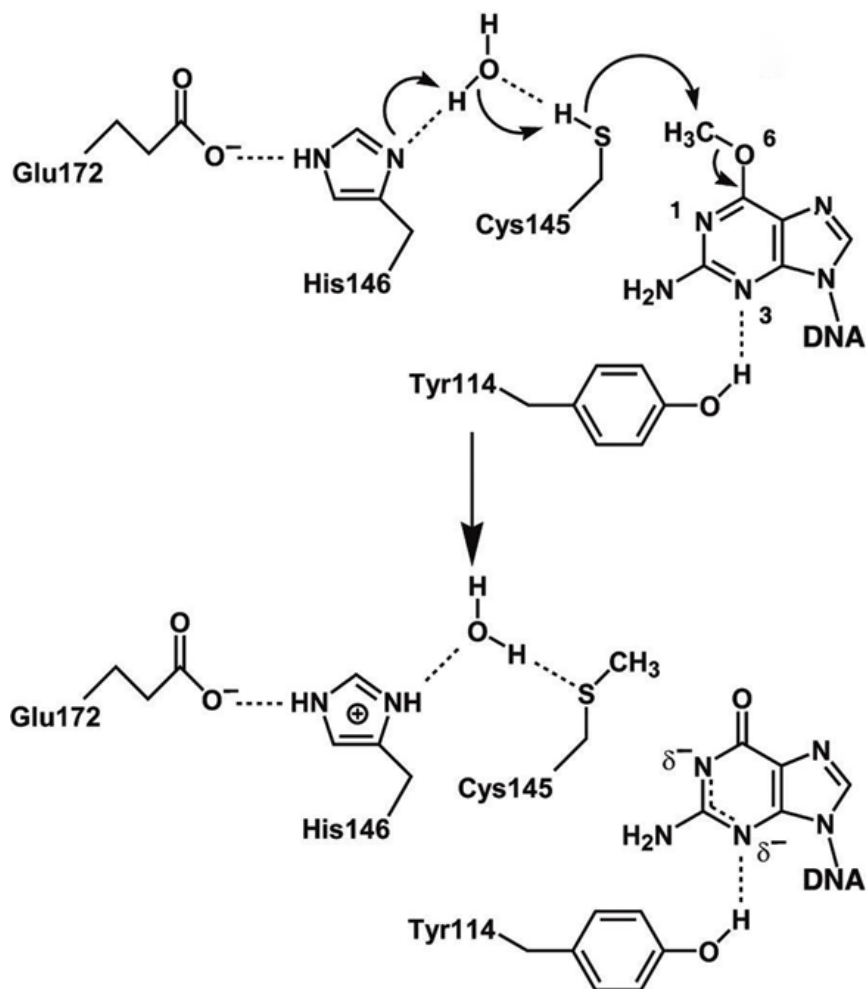


Рис.1.1. Схематичне зображення механізму роботи активного сайту MGMT (за [3])

Найчастіше MGMT діє на O⁶-метилгуанін, відновлюючи його до гуаніну шляхом перенесення метильної групи на свій активний центр. Проте, функціональна здатність MGMT не обмежується лише відновленням метильованого гуаніну. MGMT здатний відновлювати практично всі алкілгуаніни, включаючи ті, які містять етильну, пропілну або інші більш

складні алкільні групи. Однак ефективність MGMT знижується зі збільшенням довжини та складності алкільної групи, що пов'язано зі зміною конформації молекули ДНК і доступності алкільованої основи для ферменту [3, 8].

MGMT також здатний відновлювати O⁴-метилтимін, хоча цей субстрат зустрічається значно рідше, ніж алкілгуаніни. Незважаючи на це, утворення O⁴-метилтиміну спричиняє мутації, що можуть мати більш тяжкі наслідки для клітини, ніж мутації, що виникають внаслідок алкілування гуаніну [3].

Реакція відновлення, яку каталізує MGMT, є необоротною. Після перенесення алкільної групи на свій активний сайт фермент стає інактивованим. Ця інактивація є результатом ковалентного зв'язування алкільної групи з ключовим залишком цистеїну в активному центрі MGMT, що перешкоджає ферменту продовжувати свою каталітичну діяльність. Через це MGMT називають «суїцидальним» білком, оскільки після виконання одного циклу реакції він стає непридатним для подальшого використання. Інактивований MGMT розпізнається системою внутрішньоклітинного контролю як білок, що підлягає деградації. Зокрема, фермент убіквітин лігаза мітить інактивований MGMT убіквітиновою міткою, що є сигналом для подальшого руйнування цього білка у протеасомах [3, 11, 12].

Останнім часом накопичується все більше даних, що свідчать про участь ензиму MGMT у багатьох інших внутрішньоклітинних процесах, однак це питання виходить за рамки даної роботи, і тому не розглядається у дисертації.

1.1.3. Варіабельність експресії гена *MGMT* в різних тканинах організму. Ген *MGMT* виявляє різну ступінь експресії в різних тканинах організму людини, що свідчить про значну варіабельність його регуляції. Варто зазначити, що концентрація MGMT може значно відрізнятися навіть у

одній і тій же тканині у різних індивідів. Це свідчить про важливу роль генетичних і епігенетичних факторів у регуляції цього гена. Зокрема, такі варіації можуть бути обумовлені наявністю поліморфізмів у регуляторних ділянках геному, що впливають на активність промоторної області гена *MGMT*, а також змінами у рівні метилування ДНК, що визначає доступність цього гена для транскрипції [2, 13].

Високий рівень експресії гена *MGMT* було виявлено в таких тканинах, як печінка, нирки, шлунок, кишечник та кров [2]. Найвищий рівень експресії *MGMT* був зафіксований у печінці, де його концентрація досягала 1070 фентомоль/мг білка [14]. Це можна пояснити тим, що зазначені органи піддаються найбільшому впливу шкідливих зовнішніх факторів, які потрапляють в організм із повітрям, їжею, водою та іншими джерелами [2].

Активність ферменту *MGMT* також змінюється в залежності від стадії розвитку організму та віку людини. Зокрема, у плода рівень *MGMT* у тонкому і товстому кишечнику, селезінці, шлунку, легенях та головному мозку був порівнянний з рівнем, що спостерігається у дорослих. Однак, ембріональна печінка демонструвала рівень експресії *MGMT*, який був у п'ять разів нижчим, ніж у дорослої печінки [2].

Додатково, під час канцерогенезу спостерігаються зміни рівня експресії гена *MGMT*. Зокрема, порівняння нормальних і неопластичних зразків тканин мозку, легень, молочної залози, кишечника та шлунку виявило підвищений рівень експресії *MGMT* у ракових клітинах. Водночас, у печінці та яєчках було зафіксовано зниження рівня ферменту *MGMT* у ракових клітинах порівняно з нормальними тканинами [2, 15, 16].

1.2. Хіміотерапія пухлин з використанням алкілувальних сполук

Як зазначено вище, частіше в неопластичних тканинах спостерігається високий рівень MGMT, порівняно з нормальними тканинами. Імовірно, це пов'язано із механізмами захисту пухлини від зовнішніх та внутрішніх факторів. Крім того, підвищення рівня білка MGMT також є відповіддю ракових клітин на хіміотерапію з використанням алкілувальних сполук, або ж алкілувальну хіміотерапію, якщо така застосовується для лікування пацієнта.

1.2.1. Алкілувальні сполуки: різновиди та механізми їхньої дії.

Перші задокументовані випадки використання алкілувальних агентів як протиракових препаратів було зафіксовано в 1940-х. Їхнє використання зробило прорив в сфері терапії ракових захворювань. Алкілувальні сполуки застосовують для лікування широкого спектру онкозахворювань; вони мають подібний механізм дії, проте відрізняються клінічною ефективністю [17].

За свою здатністю взаємодіяти з атомами азотистих основ ДНК алкілувальні агенти поділяють на 2 типи: монофункціональні – мають 1 реактивну групу та взаємодіють з 1 атомом азотистої основи, який має високу електонну густину; та біфункціональні – ті, що мають 2 реактивні групи та взаємодіють відразу з двома атомами, що належать до двох різних азотистих основ ДНК [18, 19].

Алкілувальні сполуки спричиняють різні структурні пошкодження ДНК, що можуть призводити до утворення мутацій, які визначаються як механізм дії:

1. Утворення зшивки між спареними ланцюгами ДНК за рахунок утворення ковалентного зв'язку між двома гуанінами в позиції N⁷.
2. Утворення алкільного залишку в позиції O⁶ гуаніну [17].

Відповідно, перший механізм дії є характерним для монофункціональних алкілувальних агентів, тоді як другий механізм притаманний біфункціональним сполукам [16]. Обидва типи цих хімічних сполук зазвичай спричиняють загибель клітини, проте механізми цієї загибелі відрізняються. Зокрема, у випадку утворення міжланцюгових зшивок порушується нормальна взаємодія ферментів з ланцюгом ДНК, що зумовлює інгібування процесів транскрипції та реплікації. Це, у свою чергу, активує програму апоптозу клітини. Водночас, при алкілуванні залишків гуаніну у наступних циклах реплікації виникають некоректно спарені основи, що під час спроби репарації цієї ділянки призводить до фрагментації ДНК, арешту клітинного циклу та припинення проліферації. Як наслідок, ці процеси також завершуються активацією апоптозу [17, 18].

За хімічною структурою розрізняють 6 типів алкілувальних сполук (табл.1.1.): алкілсульфанати, етиленеміни, азотні іприти, триазини, піперазини, нітросечовини [17].

Таблиця 1.1.

Типи алкілувальних сполук за хімічною структурою (за [16])

Тип алкілувальної сполуки	Приклади з даної групи сполук
1. Алкілсульфанати	Бусульфан
2. Етиленаміни	Альтретамін, тріотепа

3. Азотні іприти	Бендамустин, хлорамбуцил, циклофосфамід, іфосфамід, мехлоретамін, мелфалан
4. Триазини	Дакарбазин, темозоломід
5. Піперазини	Гексагідропіразин, диетилендіамін
6. Нітросечовини	Кармустин, ломустин, стрептозоцин

1.2.2. Застосування алкілувальних сполук у хіміотерапії пухлин.

Шляхом проведення доклінічних та клінічних досліджень було виявлено, що багато алкілувальних сполук мають виражені протипухлинні властивості. Однак, під час досліджень також було встановлено, що більшість з них супроводжується появою різноманітних побічних ефектів, що значно обмежує їх застосування. Важливість таких параметрів, як дозування, тривалість застосування, специфічність щодо виду онкологічного захворювання та індивідуальні характеристики пацієнта, є критичними під час використання цих сполук у клінічній практиці. Це дозволяє знизити ризики та підвищити ефективність терапії, зменшуючи токсичний вплив на здорові клітини організму [18].

У медичній практиці найчастіше використовують азотні іприти, які є одними з найбільш досліджених алкілувальних сполук. Історично, перші застосування алкілувальних сполук цього класу в терапії онкологічних захворювань розпочалися в 1940-х роках з використання хлорметину [18, 19]. Однак, хоча ці сполуки мали значну ефективність, їх застосування було

обмежено через низьку селективність та високу токсичність для всіх клітин з високим ступенем проліферації. Введення ароматичних кілець у структуру молекул дозволило дещо знизити токсичність, але й призвело до зниження загальної ефективності препарату. Наприклад, хлорамбуцил, модифікований таким чином, певний час використовувався для терапії раку яєчників, лімфатичної лейкемії та лімфосаркоми [20]. Втім, клінічні дослідження показали, що тривале застосування хлорамбуцилу може призводити до розвитку анемії та значної нейротоксичності [21].

Іншим важливим представником азотних іпритів є циклофосфамід, який є гетероциклічним амідом азоту іприту. Ця сполука виявилася менш цитотоксичною порівняно з іншими азотними іпритами, що обумовлено її гетероциклічною структурою, яка забезпечує іншу фармакодинаміку. Циклофосфамід має широкий спектр протипухлинної дії і використовується в терапії різноманітних онкологічних захворювань, включаючи злоякісні лімфоми, гостру лімфобластну лейкемію, множинну мієлому, рак легенів, нейробластому, рак молочної залози, рак яєчників та рак носоглотки [22]. На основі циклофосфаміду було розроблено наступне покоління азотних іпритів, які виявилися менш цитотоксичними та більш селективними. До них належать такі сполуки, як брeфелділ, еводіамін, орідонін та етопозид [20].

Близькими за структурою до азотних іпритів є етиленаміни. Найвідоміші з них, тріотепа та альтретамін, використовуються для лікування карциноми яєчників та легень [19].

У 90-х роках ХХ століття в медичну практику були впроваджені нітросечовини, такі як кармустин (BCNU), ломустин (CCNU), німустин (ACNU) та інші, які продемонстрували позитивні результати у клінічних дослідженнях [20, 23, 24]. Зокрема, BCNU використовується для хіміотерапії пацієнтів з мієломою, різними видами лімфом та раком мозку. CCNU знайшов

своє застосування переважно у лікуванні гліобластом та інших видів раку мозку, оскільки ця сполука здатна легше проникати через гематоенцефалічний бар'єр [18, 24, 25]. Проте, подальші дослідження виявили, що застосування нітросечовин пов'язане зі значними та серйозними побічними ефектами, такими як лейкоенцефалопатія, легенева токсичність, нефротоксичність, гепатотоксичність, нейротоксичність, мієлосупресія, вторинні лейкемії, алопеція, анемія, анорексія та інші. Через ці серйозні побічні ефекти нітросечовини зазвичай застосовуються у випадках рецидиву пухлин або в рефрактерних випадках [25, 26].

Іншим поширеним класом алкілувальних агентів є триазини, серед яких найбільш відомі дакарбазин (DTIC) і темозоломід (TMZ) [18]. Триазини використовуються для лікування хвороби Ходжкіна, деяких видів раку мозку та меланоми. Дакарбазин активується мікросомальними ферментами печінки до монометилтриазеноімідазолкарбоксаміду (MTIC), який є активним алкілувальним агентом [27]. Темозоломід, який є більш сучасним протираковим препаратом, має перевагу в тому, що він спонтанно розкладається в фізіологічних умовах з утворенням такого ж активного метаболіту, як і DTIC, і не потребує метаболічної активації за участю ферментів [28]. Серед побічних ефектів застосування триазинів спостерігається гематологічна токсичність, зокрема анемія, тромбоцитопенія, нейтропенія, а також більш загальні прояви токсичності, такі як нудота, блювання, алопеція, головний біль, анорексія, втома та інші [29].

Крім медичної практики, алкілувальні сполуки використовують з науковою метою, а саме для побудови експериментальних моделей. Таким прикладом є N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідин (MNNG), який був знайдений в *Salmonella typhimurium* як канцероген, який бактерія використовує в процесі патогенезу сальмонельозу [30]. Ця сполука не

підходить для використання в медицині через високу токсичність і мутагенність, але часто використовується як мутаген та канцероген в наукових дослідженнях, оскільки є сильним алкілувальним агентом і супермутагеном [31-33].

1.2.3. Роль MGMT у виникненні хіміорезистентності та стратегії її подолання. Систематичне застосування алкілувальних сполук у хіміотерапії, на жаль, часто призводить до розвитку хіміорезистентності у пацієнтів, що негативно впливає на ефективність лікування онкологічних захворювань [34]. У відповідь на інтенсивне алкілування гуаніну, ракові клітини активно синтезують репаративний фермент MGMT, який сприяє відновленню ДНК. Це є протидією алкілувальної хіміотерапії та значно знижує її ефективність [35].

Потенційною стратегією послаблення репарації ДНК, опосередкованої MGMT, деякий час було введення високих доз простих метилувальних агентів, таких як темозоломід (TMZ) або стрептозотоцин (STZ), з подальшим застосуванням хлоретилувальних препаратів. Метилуючі агенти створюють численні мішені для MGMT у ДНК клітин, де MGMT зв'язується з Об-позиціями гуаніну та видаляє їх, тимчасово виснажуючи клітинний пул активного MGMT. Однак, через значну токсичність для здорових тканин, цей підхід виявився непридатним [36, 37].

Іншою стратегією є регуляція експресії гена MGMT, що може здійснюватися декількома методами. Одним з таких методів є метилування гістонових білків у промоторній ділянці цього гена, що призводить до зміни структури хроматину до гетерохроматинового стану. Це, у свою чергу, ускладнює доступ транскрипційних факторів до відповідної ділянки ДНК, що обмежує транскрипцію гена. Наприклад, метилування CpG-острівців у

промоторі гена MGMT призводить до його епігенетичного пригнічення. Дослідження показали, що така епігенетична модифікація сприяє підвищенню ефективності хіміотерапії гліом за допомогою TMZ, оскільки зниження рівня MGMT у ракових клітинах підвищує їх чутливість до цитотоксичної дії алкілувальних препаратів [38, 39].

Ще одним методом пригнічення експресії гена є РНК-інтерференція. Використання малих інтерферуючих РНК, які взаємодіють з специфічною ділянкою гена MGMT або з його мРНК, призводить до пригнічення транскрипції або трансляції відповідно. Як результат, експресія гена MGMT інгібується, що збільшує чутливість клітин до алкілувальних сполук [40].

Крім того, епігенетичний вплив на MGMT може здійснюватися через посттрансляційні модифікації. Зокрема, фосфорилювання, яке може відбуватися на семи амінокислотах пептидного ланцюга і призводить до пригнічення активності або повної інактивації ферменту MGMT [41, 42].

Ще однією ефективною стратегією для подолання хіміорезистентності до алкілувальних сполук є вплив безпосередньо на білок MGMT за допомогою хімічних сполук, що інгібують ензиматичну активність ферменту [35].

1.3. Інгібітори MGMT

Інгібітори MGMT є перспективним напрямком у підвищенні ефективності алкілувальної хіміотерапії. А також можуть посприяти зниженню її загальної токсичності для організму людини, адже у разі їхньої ефективності можна знизити дозу та тривалість лікування препаратами, які

часто мають певні побічні ефекти для організму під час тривалого застосування.

1.3.1. Загальна характеристика відомих інгібіторів MGMT.

Інгібітори можуть бути представлені широким спектром хімічних сполук, які можуть належати до різних класів і груп. Ці сполуки можуть бути синтезовані як штучними методами, шляхом раціонального дизайну та хімічного синтезу, так і виділені з природних джерел. Протягом останніх десятиліть були розроблені й досліджені різні інгібітори MGMT, які демонструють різні рівні ефективності та селективності. Деякі з них успішно застосовуються в клінічній практиці і до сьогодні, тоді як інші були виведені з ужитку через недостатню ефективність, небажані побічні ефекти або появу більш ефективних альтернативних препаратів. Нижче наведено опис найбільш відомих інгібіторів MGMT.

1.3.1.1. O⁶-бензилгуанін та його похідні. Механізм дії O⁶-бензилгуаніну (O⁶-BG) ґрунтується на його здатності взаємодіяти з активним центром ферменту MGMT, імітуючи природний субстрат ферменту — метильований гуанін. Це означає, що O⁶-BG діє як псевдосубстрат для MGMT, тобто зв'язується з ферментом, перешкоджаючи його нормальній функції з відновлення пошкоджених ділянок ДНК. Хімічна структура O⁶-BG нагадує структуру O⁶-метилгуаніну (рис.1.2), що дозволяє йому ефективно взаємодіяти з ферментом, але на відміну від природного субстрату, O⁶-BG володіє значними перевагами як субстрат для MGMT [35, 43].

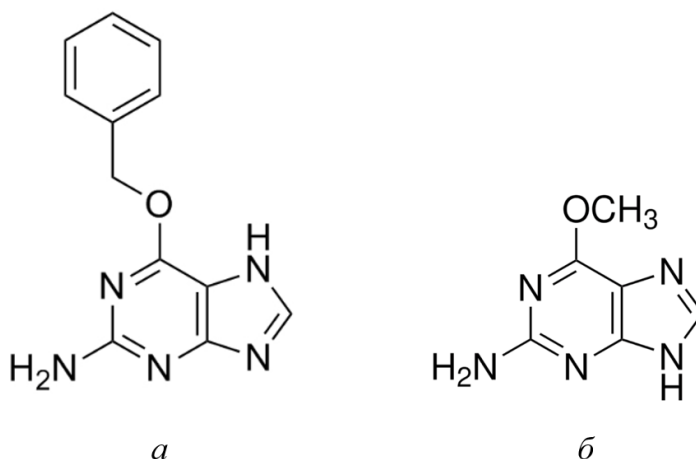


Рис.1.2. Структурна формула O⁶-бензилгуаніну (*a*) та O⁶-метилгуаніну (*б*)

Завдяки високій афінності O⁶-BG до ферменту MGMT, реакція між ними відбувається значно швидше, ніж з природним субстратом. Це означає, що O⁶-BG ефективніше захоплюється ферментом, що компенсує відсутність зв'язування MGMT з ДНК. Крім того, бензильна група в структурі O⁶-BG взаємодіє із залишком проліну (Pro140) у людському білку MGMT, що сприяє правильній орієнтації молекули в активному центрі ферменту. Ця особливість робить O⁶-BG у 2000 разів специфічнішим до MGMT порівняно з природним субстратом [35, 44].

Перші стадії клінічних досліджень з використанням інгібітору O⁶-BG на пацієнтах з гліомами продемонстрували низьку токсичність цього препарату. Було відзначено значне зниження рівня білка MGMT у злоякісних тканинах пацієнтів, що свідчить про потужні інгібувальні властивості цієї сполуки [43, 45]. Однак, під час другої стадії клінічних випробувань було виявлено побічні ефекти при систематичному застосуванні O⁶-BG під час лікування, що вказує на кумулятивний ефект його токсичності. Зокрема, у пацієнтів спостерігалася значна мієлосупресія — пригнічення функції кровотворної системи, разом із

загальними ознаками токсичності, такими як висока температура тіла, нудота, блювання, втома та головні болі. Також спостерігалась алопеція і проблеми з травленням. Імовірною причиною цих негативних ефектів є побічний продукт реакції — O⁶-бензил-8-оксогуанін [46, 47].

З метою зниження токсичності та покращення терапевтичних властивостей інгібітору O⁶-BG, було розроблено ряд похідних сполук, серед яких найбільше визнання отримав інгібітор O⁶-(4-бромотіобензил)гуанін (O⁶-BTG). Цей препарат також відомий під комерційними назвами Lomeguatrib, або PaTrin-2 (рис.1.3).

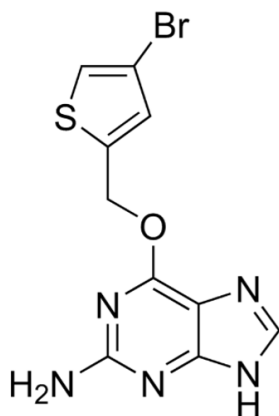


Рис.1.3. Структурна формула O⁶-(4-бромотіобензил)гуаніну (O⁶-BTG)

Механізм дії O⁶-BTG є аналогічним до O⁶-BG, оскільки він також взаємодіє з ферментом MGMT, інгібуючи його активність. Проте O⁶-BTG демонструє значно вищі інгібувальні властивості, що обумовлено його більш високою специфічністю. Крім того, Lomeguatrib зручний для використання в медичній практиці завдяки формі випуску у вигляді таблеток, що полегшує дозування препарату та підвищує комплаєнтність пацієнтів, роблячи лікування більш зручним і доступним для широкого кола пацієнтів [48, 49].

Однак, незважаючи на ці переваги, Lomeguatrib, як і інші аналоги O⁶-BG, продемонстрував на пізніх стадіях клінічних випробувань ряд побічних ефектів, серед яких відзначено токсичність для гематопоетичних клітин, що залишається значним обмеженням у його клінічному застосуванні [50].

1.3.1.2. Глюкозо-кон'юговані інгібітори. Систематичне використання інгібіторів MGMT призводить до підвищення токсичності терапії щодо нормальних тканин організму, зокрема до значного впливу на кровотворну систему. Цей ефект обумовлений недостатньою селективністю інгібіторів, що в свою чергу спричиняє пошкодження не лише пухлинних, але й здорових клітин. Одним із перспективних підходів для подолання цієї проблеми є розробка та використання глюкозо-кон'югованих інгібіторів MGMT, таких як O⁶-BG-Glu та O⁶-BTG-Glu, які здатні вибірково накопичуватися у пухлинних клітинах [51, 52].

Ці інгібітори потрапляють до клітин пухлини за допомогою інсулін-незалежних транспортерів глюкози типу GLUT-1, що надмірно експресуються в пухлинних клітинах. Ця надмірна експресія транспортерів обумовлена посиленням аеробним гліколізом, відомим як ефект Варбурга. Отто Варбург припустив, що інтенсивне споживання глюкози пухлинними клітинами обумовлене потребою у високій кількості енергії та прекурсорів для синтетичних процесів, характерних для неопластичних тканин, що створює сприятливі умови для їхнього зростання та розвитку [52, 53].

Структурно глюкозо-кон'юговані інгібітори складаються з молекули O⁶-BG або O⁶-BTG, зв'язаних з молекулою глюкози у позиції N⁹ гуаніну через алкільні спейсери різної довжини (рис.1.4). Дослідження показали, що для забезпечення ефективності інгібітору необхідно, щоб довжина алкільного

спейсера була щонайменше 6 атомів вуглецю. У випадках, коли ланцюг є довшим (наприклад, 10 атомів вуглецю і більше), це не впливає на активність інгібітора, проте значно знижує його стабільність. Таким чином, оптимальною довжиною лінкерного ланцюга вважається 8 атомів вуглецю [52, 53].

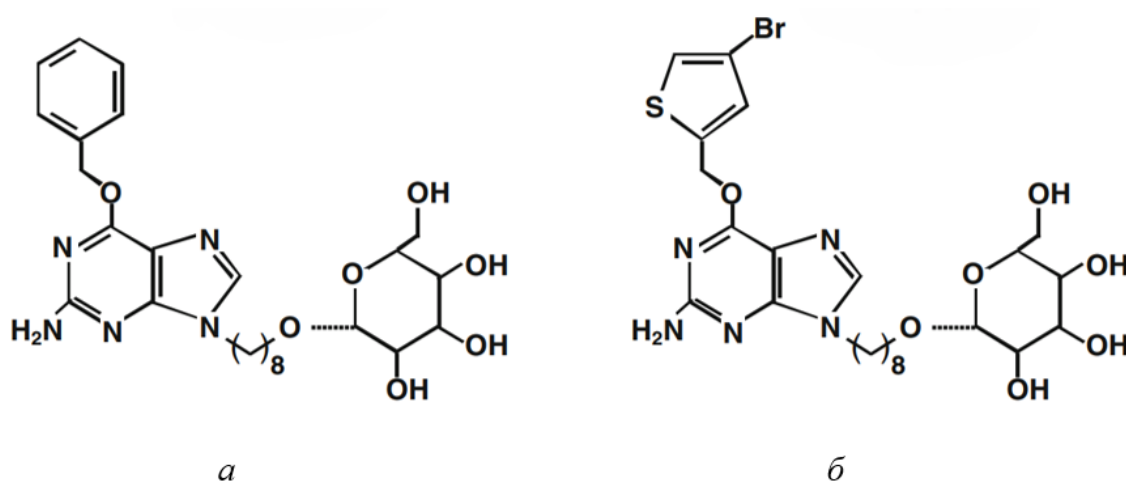


Рис.1.4. Глюкозо-кон'югований інгібітори: а – O⁶-BG-Glu; б – O⁶-BTG-Glu

Результати досліджень на різних клітинних лініях *in vitro* продемонстрували, що ці інгібітори мають обнадійливі інгібіторні властивості [54]. Проте слід зазначити, що їхня здатність інгібувати фермент MGMT виявилася у 3-5 разів менш ефективною порівняно з некон'югованими аналогами. Це, ймовірно, зумовлено активністю ефлюкських насосів, які ефективно виводять інгібітори з клітин у міжклітинний простір, що знижує їхню внутрішньоклітинну концентрацію і, відповідно, ефективність дії [55, 56].

Таким чином, незважаючи на перспективність глюкозо-кон'югованих інгібіторів у таргетній терапії пухлин, існують певні обмеження, пов'язані з їхньою біодоступністю і стабільністю, що потребує подальших досліджень та оптимізації структури цих сполук.

1.3.1.3. ДНК-спрямовані інгібітори. Яскравим представником ДНК-спрямованих інгібіторів є катіонний порфірин 5,10,15,20-тетракис(диізопропілгуанідин)-21H,23H-порфін (DIGPor), який специфічно зв'язується з ДНК, що містить метильований гуанін. Механізм його дії полягає в тому, що DIGPor взаємодіє з ланцюгом ДНК та блокує зв'язування MGMT, тому реакція деметилування не відбувається. Для підсилення інгібувальної активності DIGPor додавали іони цинку Zn^{2+} , що призводило до утворення комплексу Zn-DIGPor [57].

Інгібітор Zn-DIGPor продемонстрував непогані результати у комбінації з TMZ в культурі ракових клітин *in vitro*. Проте, подальша хімічна оптимізація для терапевтичного застосування виявилася складною, що обмежило продовження досліджень у цьому напрямку [57].

1.3.2. Застосування інгібіторів MGMT у комбінованій алкілувальній хіміотерапії пухлин. Терапія, при якій залучають в схему лікування, крім алкілувальних препаратів, також інгібітори ферменту MGMT, має назву комбінована алкілувальна хіміотерапія. Такий підхід значно підвищує ефективність лікування деяких онкологічних захворювань.

Інгібітор O^6 -BG застосовується в комбінації з різними алкілувальними агентами для лікування окремих видів раку. Зокрема, комбінація O^6 -BG та TMZ показали високу ефективність у лікуванні різних видів гліом. Результати першої фази клінічних досліджень комбінації O^6 -BG з TMZ продемонстрували, що при правильно підібраній дозі інгібітору вдається мінімізувати токсичні ефекти, зберігаючи водночас високий терапевтичний потенціал. Крім того, комбінована терапія разом з інфузією модифікованих гематопоетичних клітин забезпечує кращу переносимість лікування, завдяки

захисту кровотворної системи пацієнтів [58-60]. Було також з'ясовано, що для досягнення максимального лікувального ефекту у пацієнтів з TMZ-резистентними пухлинами інгібітор необхідно вводити до схеми терапії регулярно, а не одноразово, як і алкілювальний агент [61]. Під час другої фази клінічних досліджень було встановлено, що різні форми TMZ-резистентних гліом демонструють неоднакову реакцію на введення інгібітора в схему хіміотерапії. Зокрема, додавання O^6 -BG до 1-денного режиму дозування TMZ сприяло відновленню чутливості до TMZ у пацієнтів з анапластичною гліомою, резистентною до цього препарату. Проте, у пацієнтів з мультиформною гліобластою суттєвого відновлення чутливості до TMZ не спостерігалось [62].

Крім того, інгібітор O^6 -BG також використовують у складі комбінованої терапії з BCNU для лікування різних видів лімфом та мієломи. Дослідження показали, що застосування O^6 -BG у таких випадках сприяє значному зниженню рівня ферменту MGMT у ракових клітинах лімфатичної системи, що робить клітини більш чутливими до дії хіміотерапії. Важливо відзначити, що пацієнти загалом добре переносять таку терапію, а зниження дози BCNU у комбінації з O^6 -BG дозволяє зменшити токсичні ефекти, що особливо важливо для пацієнтів зі зниженою переносимістю стандартних доз хіміопрепаратів [63]. Однак, на другій стадії клінічних випробувань було виявлено значну дозозалежну мієлосупресію після тривалого курсу терапії, що підкреслює необхідність ретельного моніторингу стану пацієнтів та коригування дозування під час лікування [64, 65].

Інший інгібітор MGMT, O^6 -BTG, також знайшов своє застосування у складі терапевтичних схем із TMZ для лікування різних видів гліом, а також меланоми. Дослідження підтверджують значний терапевтичний ефект від використання цієї комбінації, однак висока токсичність лікування для

гематопоеетичних клітин потребує корекції доз вже на п'ятий день лікування, що обмежує тривалість і інтенсивність терапії [66, 67]. Це підкреслює важливість подальших досліджень для оптимізації дозових режимів, які б дозволили мінімізувати токсичні побічні ефекти, зберігаючи при цьому ефективність лікування.

Ці результати вказують на перспективність комбінованої алкілувальної хіміотерапії з інгібіторами MGMT, але також наголошують на важливості індивідуалізації підходу до лікування, враховуючи різницю в чутливості різних типів пухлин до такої терапії.

1.4. MGMT як біомаркер у комбінованій хіміотерапії пухлин

Рівень експресії гена MGMT у пухлинних клітинах відіграє вирішальну роль у визначенні оптимальних доз і тривалості введення інгібіторів у схемах алкілувальної хіміотерапії. Дослідження стосовно рівня метилування промотора гена MGMT дозволяє оцінити ступінь його експресії, що є ключовим для персоналізації хіміотерапевтичних протоколів. Зокрема, низький рівень метилування в CpG-острівцях промотору асоціюється з високим рівнем білка MGMT, що знижує ефективність алкілувальних агентів. У таких випадках необхідно коригувати терапію шляхом додавання або збільшення доз MGMT-інгібіторів для досягнення бажаного терапевтичного ефекту [68-71].

Дослідження показують, що лише 45% пацієнтів із гліобластомою мають метильований промотор гена MGMT, що асоціюється з низьким рівнем його експресії, тоді як у 55% пацієнтів спостерігається високий рівень експресії

цього гена. Пацієнти з високим рівнем експресії MGMT показують низьку відповідь на стандартну алкілувальну хіміотерапію, що вимагає застосування комбінованої терапії із залученням інгібіторів MGMT для подолання хіміорезистентності пухлинних клітин [70, 72].

Крім того, було встановлено, що статус метилування промотора гену *MGMT* може змінюватися залежно від віку пацієнтів. У старших пацієнтів (понад 65 років) часто виявляється вищий рівень метилювання, що дозволяє адаптувати схеми лікування, зокрема, шляхом зниження доз хіміотерапевтичних препаратів. Це може зменшити токсичність лікування та покращити його переносимість, що є важливим аспектом у лікуванні пацієнтів старшого віку [73, 74].

1.5. Апоптоз та аутофагія як терапевтичні стратегії в лікуванні раку

Апоптоз та аутофагія є ключовими запрограмованими метаболічними реакціями, які відіграють важливу роль у відповіді ракових клітин на хіміотерапію. Апоптоз є основним механізмом програмованої загибелі клітин у відповідь на різноманітні стимули, тоді як аутофагія функціонує як катаболічний процес, що сприяє деградації пошкоджених органел та білків, тим самим підтримуючи клітинний гомеостаз [75, 76].

Незважаючи на те, що обидва процеси можуть сприяти знищенню пухлинних клітин, аутофагія має подвійний характер. В умовах стресу, таких як гіпоксія, аутофагія може сприяти виживанню ракових клітин, що призводить до хіміорезистентності, ускладнюючи лікування. Підвищена

аутофагія може знижувати ефективність апоптозу, тим самим захищаючи клітини від дії хіміотерапевтичних агентів [75, 77].

В ракових клітинах аутофагія може мати двоякі ефекти щодо прогресування онкологічних захворювань. На ранніх стадіях раку аутофагія може пригнічувати ріст і розвиток пухлин, а також мати антиметастатичний ефект за рахунок зниження інвазії та міграції ракових клітин з первинної пухлини [78, 79]. Однак на пізніх стадіях захворювання аутофагія сприяє прогресуванню раку шляхом підвищення виживаності клітин, а також стимулює міграцію клітин під час метастазування, що призводить до утворення вторинних пухлин [78, 80]. Таким чином, для лікування онкологічних захворювань доцільно пригнічувати або стимулювати аутофагію залежно від стадії раку.

Між аутофагією та апоптозом існує складний взаємозв'язок, і різні сигнальні молекули можуть регулювати ці процеси. Наприклад, активація білків BNIP3 та NIX під час гіпоксії сприяє ініціації аутофагії через рекрутування мітохондрій до аутофагосом, що водночас контролює апоптоз шляхом регуляції рівнів реактивних форм кисню (ROS) і функції мітохондрій [81].

Дослідження показують, що в гліомних клітинах під впливом темозоломід (TMZ) часто відбувається апоптоз, який асоціюється з аутофагією як реакцією клітин на цитотоксичну дію TMZ [82, 83]. Апоптоз і аутофагія можуть взаємодіяти, оскільки мають спільні компоненти, такі як Atg5, Beclin-1, Bcl-2, p53 тощо [76, 84]. Наприклад, білок Atg5 (Autophagy-related 5) відіграє ключову роль в ініціації аутофагії, будучи частиною комплексу, необхідного для формування аутофагосом. Beclin-1 є важливим регулятором аутофагії. Цей білок взаємодіє з іншими білками для утворення комплексу, що ініціює формування аутофагосом, і також може впливати на

апоптоз, взаємодіючи з білком Bcl-2. Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) є антиапоптотичним білком, який запобігає апоптозу, зв'язуючись із проапоптотичними білками та блокуючи їхню дію [85, 86].

Білки Atg5 і Beclin-1, хоча і залучені головним чином до процесу аутофагії, мають тісний зв'язок з апоптозом та можуть впливати на цей процес. Зокрема, під дією певних стресових умов або сигналів Atg5 може розщеплюватися та переміщуватися до мітохондрій, де він взаємодіє з білками сімейства Bcl-2, сприяючи вивільненню проапоптотичних факторів, таких як цитохром C, ініціюючи тим самим каскад апоптозу [87, 88].

Білок p53 функціонує як супресор пухлин і регулятор апоптозу. Він активується у відповідь на пошкодження ДНК і може ініціювати апоптоз, водночас впливаючи на аутофагію залежно від типу стресу в клітині [88-90]. Оскільки ці процеси нерозривно пов'язані, дослідження аутофагії в ракових клітинах може розширити знання щодо лікування онкологічних захворювань.

Розуміння механізмів взаємодії між аутофагією та апоптозом має важливе значення для розробки комбінованих терапій, що блокують цитопротективну аутофагію та стимулюють апоптоз для ефективнішого знищення ракових клітин. Такий підхід може покращити результати лікування та подолати хіміорезистентність, що є однією з основних проблем в онкології.

Отже, аналізуючи наявні літературні дані, можна відзначити значний прогрес у дослідженнях, спрямованих на підвищення ефективності алкілувальної хіміотерапії та зниження її токсичності. Основним напрямком досліджень є вивчення механізмів резистентності ракових клітин до алкілувальних сполук та пошук способів її подолання. Одним із ключових

чинників резистентності є активність і рівень експресії репаративного фермента MGMT.

Значна увага приділяється різним методам пригнічення активності MGMT. Це включає як пригнічення експресії гена, що кодує цей фермент, так і посттрансляційні модифікації білка. Крім того, активно досліджуються способи конкурентного інгібування ферменту, коли використовуються низькомолекулярні сполуки, що можуть зв'язуватися з активним центром MGMT, перешкоджаючи його функціонуванню. Важливо зазначити, що експресія *MGMT* також розглядається як важливий біомаркер для вдосконалення та персоналізації комбінованої алкілувальної хіміотерапії.

Особливу увагу в цих дослідженнях приділено інгібуванню MGMT за допомогою низькомолекулярних інгібіторів, таких як O⁶-BG та його похідних. Їхнє використання в комбінованій хіміотерапії спрямоване на підвищення чутливості ракових клітин до алкілувальних агентів, що потенційно дозволяє знизити дозу хіміотерапевтичних препаратів і, відповідно, зменшити їхню токсичність. Однак, особливе значення мають питання зниження цитотоксичності таких інгібіторів, особливо щодо гематопоетичних клітин, адже пошкодження кровотворної системи є одним із серйозних побічних ефектів алкілувальної терапії.

Для вирішення проблеми токсичності було запропоновано використання більш селективних інгібіторів MGMT, кон'югованих з глюкозою. Такий підхід базується на ідеї селективного транспортування цих сполук до пухлинних клітин, які характеризуються підвищеним споживанням глюкози. Однак, на жаль, результати не виправдали очікувань, і токсичність залишилася значним обмеженням у застосуванні цього методу.

Враховуючи, що проблема інгібування MGMT під час алкілювальної терапії досі залишається нерозв'язаною, пошук нових низькотоксичних і ефективних інгібіторів MGMT є актуальним завданням. Це передбачає не лише синтез нових хімічних сполук, але й дослідження їхньої молекулярної дії, безпечності для пацієнтів, ефективності, впливу на важливі метаболічні процеси в клітині та специфічності щодо ракових клітин. Такі зусилля мають потенціал значно покращити результати лікування онкологічних захворювань, підвищити виживаність пацієнтів та зменшити побічні ефекти від терапії.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Нові інгібітори MGMT

У даному дослідженні було використано нові ненуклеозидні низькомолекулярні інгібітори MGMT, розроблені та синтезовані у відділі біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Колекція з 89 потенційних інгібіторів була систематизована шляхом нумерації для зручності використання. З них було відібрано 5 сполук, що продемонстрували найбільш перспективні результати в попередніх дослідженнях [91, 92]. У даній роботі досліджувалися інгібітори 41 (5-(5-хлоро-2-гідроксибензиліден)-4-тіоксо-тіазолідин-2-он), 41В (5-бензо[1,3]діоксол-5-ілметилден-тіазолідин-2,4-діон), 72 (2-(2,4-дихлорофеніл)-імідазо[1,2-а]піридин-8-іламін), 89 (2-[5-(4-бромофеніл)-піримідин-4-іл]-5-етоксифенол) та 46 (3-аміно-10Н-9-окса-2,4-діазафенантрен-10-ол). Всі сполуки були розчинені в ДМСО та застосовані в концентрації 10 мкМ.

2.2. Клітинні лінії та їх культивування

У роботі використовували декілька стандартних клітинних ліній: HЕр-2 – лінія клітин карциноми гортані людини; Т98G – лінія гліомних клітин, що характеризується високим рівнем експресії MGMT; U251MG – лінія гліомних

клітин, для якої характерний метильований промотор гену *MGMT*, що означає відсутність експресії *MGMT*.

Культивування клітин здійснювали в середовищі DMEM (DMEM Powder (1×) High glucose (4.5 g/L) with L-glutamine, PPA) із додаванням 10% інактивованої ембріональної сироватки великої рогатої худоби (FBS, “Biowest”), 200 ОД/мл бензилпеніциліну та 200 мкг/мл стрептоміцину (ПАО “Київмедпрепарат”) у посуді для культивування клітин при температурі 37°C та у газовій фазі повітря із 5% CO². Під час культивування використовували термостат ТС-80 (Україна), CO² інкубатор IGO-150 «Cell Life» («Jouan», Франція), а для довготривалого зберігання зразків – кельвінатор «MDF-U52-V» («Sanyo», Японія).

2.3. Дослідження цитотоксичності сполук *in vitro* з використанням МТТ-тесту

Для попередньої оцінки цитотоксичності потенційних інгібіторів проводили стандартний МТТ-тест з візуальним контролем за станом клітин під мікроскопом. У 96-лункові мікропланшети вносили по 5000 клітин НЕР-2 на лунку у культурульному середовищі DMEM з 10% FBS. В кожній плашці 1 лунку була для «бланку» - контрольна лунка з культуральним середовищем. Після добової інкубації при 37°C із 5% CO² додавали потенційні інгібітори та стандартний інгібітор O⁶-BG («Sigma-Aldrich», США), розчинені в ДМСО у концентрації 10 мкМ. Інтактний контроль – клітини без обробок. Після 48 годин інкубації в лунки додавали реагент МТТ («Sigma-Aldrich», США) та інкубували протягом 3-4 годин. Потім із лунок планшету видаляли середовище разом із залишками МТТ, а в лунки додавали по 200 мкл ДМСО

для розчинення продукту реакції – формазану, утвореного живими клітинами. Вимірювали оптичну густину за допомогою спектрофотометра MR 700 Microplate Reader («Dynatech», Великобританія) при довжині хвилі 570 нм. Сам МТТ-тест проводили 3 рази.

2.4. Дослідження потенційних інгібіторів MGMT з використанням клоногенного тесту

Клітини Нер-2 культивували в середовищі DMEM з додаванням 20% бичачої сироватки, розсіваючи їх з розрахунку 1000 клітин на чашку Петрі діаметром 10 см. На другий день культивування додавали потенційні інгібітори та O⁶-BG у концентрації 10 мкМ. Контролі залишали інтактними, без обробки інгібіторами.

Для оцінки цитотоксичності інгібіторів залишали по 3 чашки Петрі для кожного варіанту обробки без подальших маніпуляцій. Для дослідження ефективності нових інгібіторів MGMT, зокрема їхньої здатності виснажувати цей фермент у клітинах і сенсibilізувати їх до алкілувального препарату, на третій день середовище замінювали на безсироваткове та додавали N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин (MNNG) у різних концентраціях (0,5, 0,05, 0,005 та 0,0005 мкг/мл), культивуючи клітини протягом однієї години. Кожен варіант обробки виконувався в трьох повторностях. Після цього середовище знову замінювали на DMEM з 20% бичачої сироватки та інгібіторами (10 мкМ). Всі маніпуляції із заміною середовищ також проводилися для контрольних зразків та зразків лише з інгібіторами.

Клітини продовжували культивувати за стандартних умов протягом 8-12 днів. Колонії клітин HEp-2 фарбували метиленовим синім і підраховували ті, що містили більше 75 клітин. Клоногенний тест повторювався тричі для підтвердження результатів.

2.5. Дослідження відібраних інгібіторів MGMT *in vivo* на модельних мишах лінії ICR

2.5.1. Створення експериментальної моделі *in vivo*. Для експериментальної моделі використовували мишей ICR, для яких характерно спонтанне утворення пухлин молочної залози. Тварин утримували в умовах, які забезпечували їм комфорт і мінімізували фізичні та психологічні страждання, дотримуючись інструкцій щодо поводження з лабораторними тваринами. Протокол дослідження затверджено етичним комітетом (протокол № 39 від 18.06.24).

Щоб розробити експериментальну модель *in vivo*, самок мишей ICR помістили разом із самцями та дозволили розмножуватися. Через шість місяців усіх самок мишей оглядали двічі на тиждень. У тих тварин, у яких розвинулися пухлини, вилучали з розведення та згрупували в групи по 3-8 особин. Пухлини на момент виявлення, зазвичай, мають діаметр приблизно 3-4 мм. Розміри пухлини реєстрували кожні 3-4 дні в трьох вимірах за допомогою штангенциркуля. Розмір пухлини при кожному наступному вимірюванні нормалізували до початкових розмірів пухлини для вивчення динаміки росту пухлини.

2.5.2. Експериментальні групи модельних тварин. В експерименті для дослідження впливу інгібіторів були сформовані чотири групи мишей. Кожна група складалася з 6 самок мишей. Отже, група 1 – інтактний контроль (без обробок); група 2 – обробка лише інгібіторами MGMT; група 3 – обробка лише алкілювальним агентом MNNG; група 4 – комбінована обробка інгібіторами та MNNG.

Експериментальна терапія тривала 17 днів. MNNG вводили в концентрації 0,5 мкг/кг маси тіла на день, тоді як інгібітори вводили в концентрації 10 мкМ/кг маси тіла на день. Препарати вводили місцево в молочну залозу або пухлину молочної залози.

2.6. Молекулярно-генетичні методи

2.6.1. Об'єкти для виділення білків. Для молекулярних досліджень впливу потенційних інгібіторів в роботі використовували 3 клітинні лінії: HEp-2, T98G та U251MG, а також зразки пухлинних і здорових тканин молочної залози, виділені з мишей лінії ICR на 9-й день обробок в експерименті, що описаний вище.

Клітинні лінії культивували за стандартними методиками. На другу добу культивування клітини обробляли потенційні інгібітори та O⁶-BG у концентрації 10 мкМ. Інтактні контролю – без обробок. На наступну добу середовище замінювали на безсироваткове та додавали MNNG у різних концентраціях: 0,5 та 50 мкг/мл – для HEp-2; 0,5, 0,05, 0,005 та 0,0005 мкг/мл – для T98G та U251MG. Кожен варіант обробки виконувався в трьох повторностях.

Клітини знімали з поверхні культурального посуду за допомогою трипсину 0,25% та охолодженого PBS 10%. Осаджували клітинний лізат в холодівій центрифугі «Centrifuge 5415R» («Eppendorf», Німеччина).

2.6.2. Екстракція білків. Виділення білків з клітинних лізатів та тваринних тканин проводили за стандартними методиками [93]. До клітин додавали лізуючий розчин (0,05M Tris-Cl pH=8, 0,001M EDTA pH=8, 0,15M NaCl, 1% NP40, 0,002M PMSF, dH₂O, 0,001M DTT), гомогенізували, центрифугували в холодівій центрифугі «Centrifuge 5415R» («Eppendorf», Німеччина) та збирали осад. Отримані зразки гомогенізували ультразвуковим дезінтегратором серії 4710 («Cole-Parmer», США) протягом 10 секунд по 3 рази на льоду. Гомогенат центрифугували 30 хв при +4 °C та 16,2 G. Концентрацію білку вимірювали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 2000 («Thermo Scientific», США) у режимі «Protein A280».

2.6.3. Електрофорез білків в ПААГ. Перед білковим електрофорезом відбувалась підготовка лізатів. До зразків додавали 2× буфер для нанесення в ПААГ, що складався з 500 мМ трис-НС1, pH 6,8; 2% додецилсульфату натрію; 10% дитіотреїтолу; 0,1% бромфенолового синього. Потім зразки інкубували 5-7 хв. на водяній бані 80-95 °C. Далі зразки наносили в гель з розрахунком 200 мГ тотального білкового лізату на лунку. Вносили маркер молекулярної ваги («Thermo Scientific», США).

Білкові зразки розділяли за допомогою вертикального електрофорезу у 3% концентруючому та 12% розділяючому поліакриламідному гелях (ПААГ) у камерах FisherBiotech FB-VE10-1 та системи із камери для електрофорезу та блоттингу Mini-PROTEAN Tetra («Bio-Rad», Велика

Британія) і джерела струму OmniPAC MIDI («Cleaver Scientific», Велика Британія).

2.6.4. Трансфер. Полівінілдіфлюоридну мембрану («Millipore», США) занурювали в метанол на 1 хвилину для активації, потім переміщали в трансферний буфер (25mM Tris, 0,19M Glycine, 20% MeOH, dH₂O) для промивання. Для трансферу білків з ПААГ в мембрану застосовували метод мокрого переносу. Процес трансферу білків відбувався в трансферному буфері в системі Mini-PROTEAN Tetra («Bio-Rad», Велика Британія) при 60V протягом 2 годин.

2.6.5. Вестерн-блот аналіз. Для блокування неспецифічного зв'язування антитіл під час блоттингу мембрану попередньо інкубували в розчині 5% сухого знежиреного молока у TBS. Потім проводили власне блоттинг з первинними антитілами проти білка-інтересу, а саме до MGMT («NovusBiologicals», США; «Santa Cruz Biotechnology», США), β -катеніну («Thermo Fisher Scientific», США), APC («Thermo Fisher Scientific», США), TCF («Thermo Fisher Scientific», США), Parkin52 («Thermo Fisher Scientific», США), LC3B («Thermo Fisher Scientific», США), та каспаз 9 і 3 («Novus Biologicals», США). Інкубацію з моноклональними антитілами проводили 1-3 год при кімнатній температурі або протягом ночі на + 4°C. Далі мембрану промивали від залишків антитіл тричі по 10 хв при постійному помішуванні розчином TBST (25mM Трис-HCl pH=7,4-7,6, 150mM NaCl, 2mM KCl, 0,01 % Tween-20, dH₂O). Потім проводили інкубацію з вторинними видоспецифічними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому («Sigma-Aldrich», США, «Santa Cruz Biotechnology», США; «Thermo Fisher

Scientific», США), після чого знову відмивали мембрану від залишків неспецифічно зв'язаних антитіл в розчині TBST.

У разі повторного використання мембрани для блоттингу проводили очищення за допомогою стріппінг буфера (pH=2,2; 1,5% гліцину, 0,1% SDS; 1% Tween-20). Промивання стріппінг буфером відбувалось двічі по 5-10 хв, далі промивали охолодженим PBS 10% двічі по 10 хв з подальшим промиванням в TBST двічі по 5 хв. Після цього мембрана готова до інкубації в розчині 5 % сухого знежиреного молока у TBS та подальшого повторного блоттингу.

Для детекції сигналу, з перетворенням його на хемілюмінесцентний у вигляді смуг, мембрану інкубували протягом 1 хвилини в розчині для проявлення: pH=8,6; 100мМ Трис-HCl; 1,3мМ люмінол («Fluka», Great Britain) та 0,6 мМ Р-кумарової кислоти («Fluka», Great Britain) та 0,01% H₂O₂. Вимірювання хемілюмінесцентного сигналу проводили на приладі ChemiDoc («Bio-Rad», США) протягом 100-300 сек. Отримані дані нормалізували відносно контролю нанесення білка, який отримували внаслідок або повторної інкубації мембрани з GAPDH, або фарбування мембрани в Coomassie Brilliant Blue R-350 («Sigma-Aldrich», США). Денситометричну оцінку сигналу тотального білку та хемілюмінесцентного сигналу на мембрані підраховували в програмі ImageJ1.53t (National Institutes of Health, США).

2.7. Флуоресцентна спектрометрія та міктрофотографія

2.7.1. Визначення рівня аутофагії за допомогою MDC після обробок досліджуваними сполуками. Клітини гліомних ліній T98G та U251MG сіяли

в 96-лунковий мікротитраційний планшет з розрахунком 4000кл/лунку. Після добового культивування за стандартних умов клітини обробляли новими інгібіторами (10мкМ), стандартним інгібітором O⁶-BG (10мкМ) та ДМСО (контроль розчинника). На другу добу інкубації середовище змінювали на безсироваткове та додавали MNNG у різних концентраціях (0,5, 0,05, 0,005 та 0,0005 мкг/мл) і культивували протягом однієї години. Після цього додавали 10% FBS та культивували ще протягом 2-х годин. Негативним контролем були необроблені клітини. Також була серія клітин оброблені лише MNNG у концентраціях зазначених вище. Позитивним контролем були клітини, інкубовані 12 годин з фактором індукції аутофагії FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine) 20мкМ («Sigma-Aldrich», США).

Після усіх обробок клітини промивали 10% PBS, фарбували монодансилкадаверином (MDC) 50мкМ («Sigma-Aldrich», США) та інкубували 15хв при температурі 37С. Після цього вимірювали флуоресценцію за допомогою Tecan Infinite 200 PRO («Tecan Group Ltd», Швейцарія) при Excitation/Emission: 332/518нм з подальшою візуалізацією флуоресцентним мікроскопом Leica DM2000 LED («Leica Microsystems», Німеччина). Зображення аналізували за допомогою програми Leica Application Suite X (LAS X) («Leica Microsystems», Німеччина). Дані нормалізували до загальної кількості живих клітин, фарбовані Hoechst 333 Dye («Thermo Fisher Scientific», США), при довжинах хвиль Ex/Em: 350/461нм. Результати обраховували в програмі Microsoft Excel2016.

2.7.2. Визначення рівня живих і мертвих клітин після обробок досліджуваними сполуками. Клітини T98G та U251MG культивували та обробляли, як зазначено вище в цьому підрозділі 2.9. Позитивним контролем

були клітини, культивовані 24 години в безсироватковому середовищі DMEM. Інші контролі такі ж, як зазначено вище в даному підрозділі 2.9.

Кількість живих та мертвих клітин після обробок досліджували з використанням LIVE/DEAD Cell Imaging Kit («Thermo Fisher Scientific», США). Клітини фарбували за стандартним протоколом протягом 15хв при температурі 37C. За допомогою Tecan Infinite 200 PRO вимірювали флуоресценцію живих клітин при довжині хвиль Ex/Em: 488/515nm, тоді як флуоресценцію мертвих клітин – при Ex/Em:570/602nm з подальшою візуалізацією мікроскопом Leica DM2000 LED. Зображення аналізували так само за допомогою програми LAS X. Рівень флуоресцентного сигналу мертвих клітин нормалізували до сумарного сигналу загальної кількості (живих і мертвих) клітин.

2.8. Статистичний аналіз

В дослідженні проведено комплексний аналіз даних за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 2016, Origin 8.1 та Image J. Статистичний аналіз включав розрахунок середнього арифметичного значення (M), стандартної похибки (SEM) та стандартних відхилень (SD). Експерименти були повторені 2-4 рази з різною кількістю ідентичних обробок, 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 репрезентативних зображень для презентації.

РОЗДІЛ 3

КОМПЛЕКСНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ НОВИХ ІНГІБІТОРІВ MGMT НА ПУХЛИННІ КЛІТИНИ *IN VITRO*

3.1. Перевірка можливої цитотоксичної дії потенційних інгібіторів MGMT

Відомо, що МТТ-тест використовується для оцінки цитотоксичності речовин, оскільки він визначає кількість метаболічно активних клітин, здатних перетворювати речовину МТТ на формаза. Це означає, що клітина може бути живою, але не мати достатньої метаболічної активності, що знижує її здатність до поділу. Такі клітини прирівнюються до неживих. Крім того, якість клітин оцінюється візуально під мікроскопом. Тому в цьому тесті вимірюють кількість метаболічно активних клітин під впливом досліджуваних сполук, а саме – продукт їхньої діяльності, формаза. Якщо кількість формазу є значно меншою порівняно з контролем, досліджувана речовина вважається цитотоксичною [94].

На основі результатів МТТ-тесту встановлено, що стандартний інгібітор O⁶-BG в концентрації 10 мкМ не проявляє цитотоксичності для клітин НЕР-2, оскільки середня метаболічна активність клітин після інкубації з O⁶-BG склала 98,56%, порівняно з інтактним контролем (100%). Нові інгібітори в концентрації 10 мкМ показали низький рівень цитотоксичності, але зі статистично значущою різницею порівняно з O⁶-BG. Зокрема, метаболічна активність клітин НЕР-2 після добової інкубації знизилась до 93,52% з

інгібітором 89, до 90,27% з інгібітором 41В, до 89,10% з інгібітором 41 і до 82,82% з інгібітором 72. Найнижчий рівень метаболічно активних клітин (64,19%) був зафіксований з потенційним інгібітором 46, що свідчить про його найбільшу цитотоксичність серед досліджуваних сполук (рис.3.1).

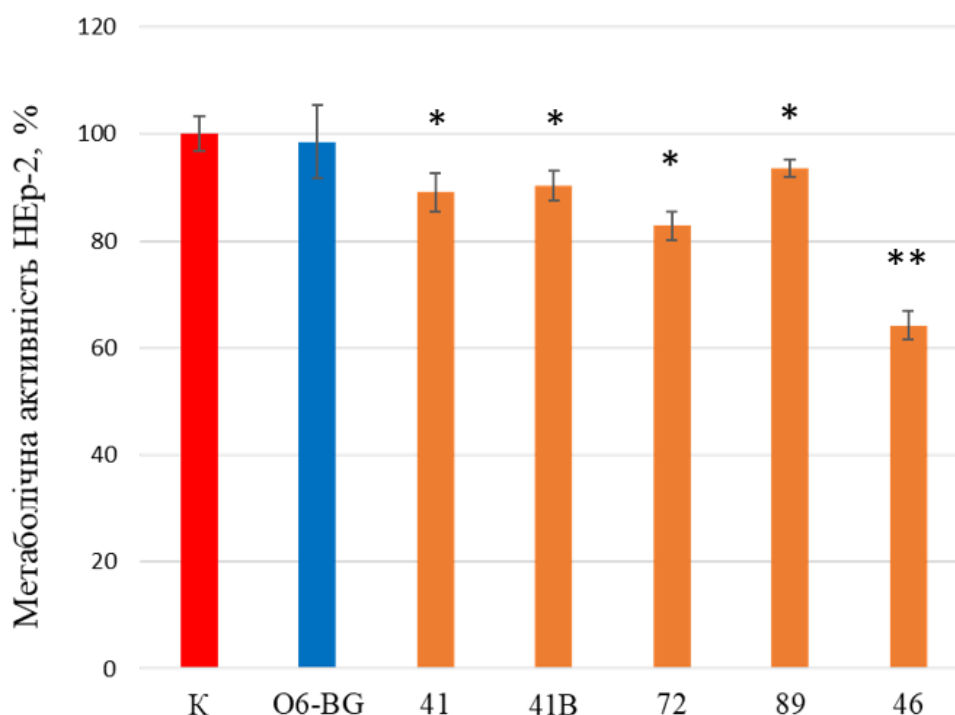


Рис.3.1. Метаболічна активність НЕР-2, згідно результатів МТТ-тесту, після обробки клітин інгібіторами MGMT у концентрації 10 мкМ, де К – інтактний контроль; O⁶-BG – стандартний інгібітор; 41, 41В, 72, 89, 46 – нові інгібітори. Статистично значуща різниця порівняно з O⁶-BG: * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$

Варто зазначити, що в даному дослідженні використовувалася концентрація інгібіторів на рівні 10 мкМ, оскільки попередні дослідження показали, що досліджувані сполуки з колекції потенційних інгібіторів MGMT

відділу біомедичної хімії ІМБГ саме при цій концентрації не виявляли цитотоксичності або їх цитотоксичність була незначною [92].

Окрім МТТ-тесту, для кількісної оцінки цитотоксичності сполук було проведено клоногенний тест. Цей метод дає змогу оцінити кількість живих клітин, здатних утворювати колонії, що вказує на збереження важливих клітинних процесів та молекул після обробки досліджуваними речовинами. Відповідно, він дозволяє визначити рівень їхньої цитотоксичності [95].

Отримані результати показали, що всі досліджувані сполуки мають низький рівень цитотоксичності в клітинах НЕр-2 за концентрації 10 мкМ (рис.3.2).

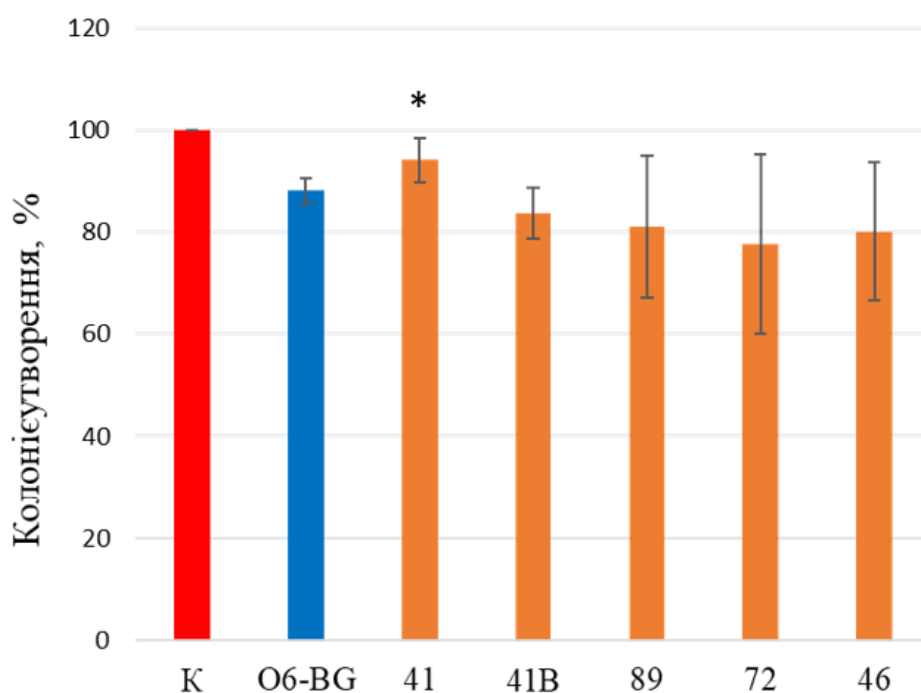


Рис.3.2. Колонієутворення клітин НЕр-2 після обробки інгібіторами MGMT за концентрації 10 мкМ, де К – інтактний контроль; O⁶-BG – стандартний інгібітор; 41, 41B, 72, 89, 46 – нові інгібітори. Статистично значуща різниця порівняно з O⁶-BG – * $p < 0,05$

Слід відзначити, що між O⁶-BG та іншими інгібіторами не було виявлено статистично значущої різниці, за винятком інгібітора 41, який виявився навіть дещо менш цитотоксичним порівняно зі стандартним інгібітором. Зокрема, обробка клітин НEr-2 інгібітором O⁶-BG призвела до утворення 88% колоній порівняно з контролем, тоді як інгібітор 41 забезпечив ще вищий рівень колонієутворення — 94,1% відносно контролю, що свідчить про відсутність значної цитотоксичності цієї сполуки. Водночас його аналог, інгібітор 41B, демонстрував нижчий рівень колонієутворення — 83,7%, що вказує на дещо підвищену цитотоксичність порівняно з 41. Утворення колоній при обробці іншими потенційними інгібіторами варіювалося від 77,7% до 81,1%, що свідчить про те, що сполуки 72, 89 та 46 можуть бути більш цитотоксичними в цій групі досліджуваних сполук. Однак, загалом всі потенційні інгібітори не демонстрували виражених цитотоксичних властивостей при порівнянні зі стандартним інгібітором O⁶-BG у концентрації 10 мкМ.

Результати обох тестів загалом підтверджують один одного. Сполуки 41 і 41B не виявили цитотоксичної дії в клоногенному тесті та не пригнічували метаболічну активність клітин у МТТ-тесті порівняно з O⁶-BG. Інгібітор 89 не відрізнявся від них за впливом на рівень колонієутворення клітин НEr-2 у клоногенному тесті, але виявляв найменшу цитотоксичність за даними МТТ-тесту, оскільки метаболічна активність клітин була найвищою. Інгібітор 72 продемонстрував тенденцію до низької цитотоксичності та слабого пригнічення метаболічної активності клітин. Тоді як інгібітор 46 пригнічував метаболічну активність клітин у МТТ-тесті, хоча не відрізнявся від інших інгібіторів у клоногенному тесті.

На основі цих результатів можна зробити висновок, що нові нуклеозидні інгібітори 41, 41B, 89 і 72 є перспективними для подальших

досліджень, оскільки вони не проявляють високої цитотоксичності в клітинах НЕР-2 порівняно з О⁶-BG при концентрації 10 мкМ.

3.2. Порівняння ефективності дії потенційних інгібіторів MGMT

Під ефективністю інгібіторів MGMT мають на увазі їхню здатність підсилювати цитотоксичний ефект алкілувальних сполук під час хіміотерапії. Оцінку ефективності нових інгібіторів можна здійснити за допомогою клоногенного тесту, оскільки цей метод дозволяє визначити здатність клітин до утворення колоній після обробки досліджуваними сполуками. Ефективні інгібітори у комбінації з алкілувальною сполукою знижують кількість життєздатних клітин. Життєздатними клітинами вважаються ті клітини, які можуть ділитися та утворювати колонії. Якщо цього не відбувається, це означає, що внутрішньоклітинні пошкодження є значними і, можливо, летальними. Таким чином, клоногенний тест є важливим методом для оцінки ефективності інгібіторів.

Для об'єктивної оцінки результатів клоногенного тесту спочатку було проведено окреме дослідження з алкілувальною сполукою MNNG у різних концентраціях, для визначення її самостійного впливу на колонієутворення клітин НЕР-2. Згідно отриманих даних, цитотоксичний ефект MNNG не спостерігається при концентраціях, нижчих за 0,005 мкг/мл, що можна пояснити ефективною дією репаративного ферменту MGMT у клітинах НЕР-2. При концентраціях MNNG 0,05 мкг/мл і більше вже спостерігався певний цитотоксичний ефект (рис. 3.3).

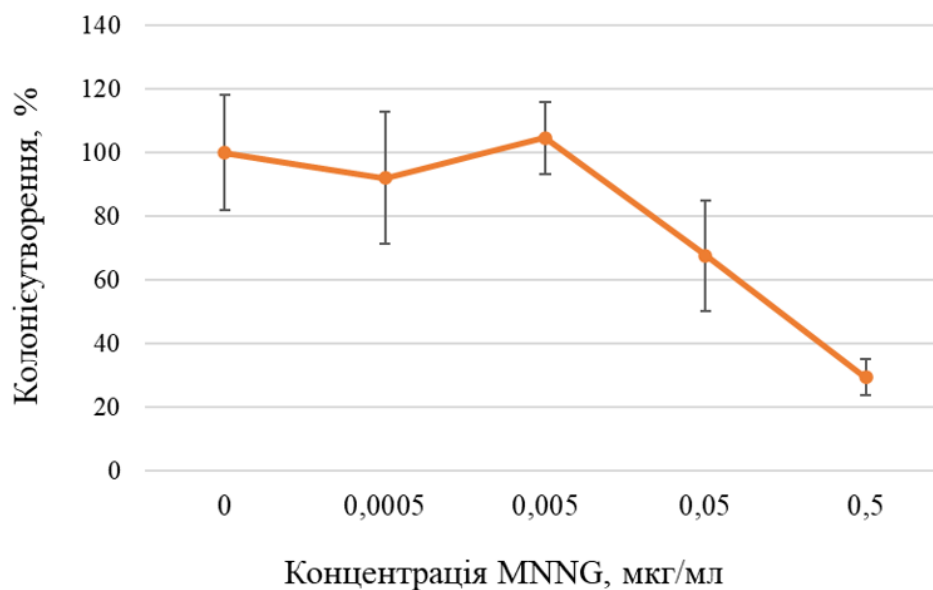


Рис.3.3. Колонієутворення клітин HEp-2 після обробки алкілювальною сполукою MNNG у різних концентраціях

Зі збільшенням концентрації MNNG, очевидно, відбулось виснаження пулу MGMT, який був у клітинах. Тому спостерігали зниження здатності HEp-2 до колонієутворення (рис.3.3).

Далі був проведений клоногенний тест з використанням нових інгібіторів у поєднанні з MNNG. Результати показали, що цитотоксична дія MNNG підсилюється під впливом стандартного інгібітора O⁶-BG та трьох досліджуваних сполук (41, 41B, 89), починаючи з найнижчої концентрації MNNG (0,0005 мкг/мл), при якій спостерігається зниження здатності клітин до колонієутворення (рис.3.4). Це підтверджує їхню ефективність та демонструє, що сполуки 41, 41B, 89 дійсно мають інгібувальну активність. Єдиною сполукою, яка не зменшує рівень утворення клітинних колоній, є сполука 72, що свідчить про її низьку ефективність.

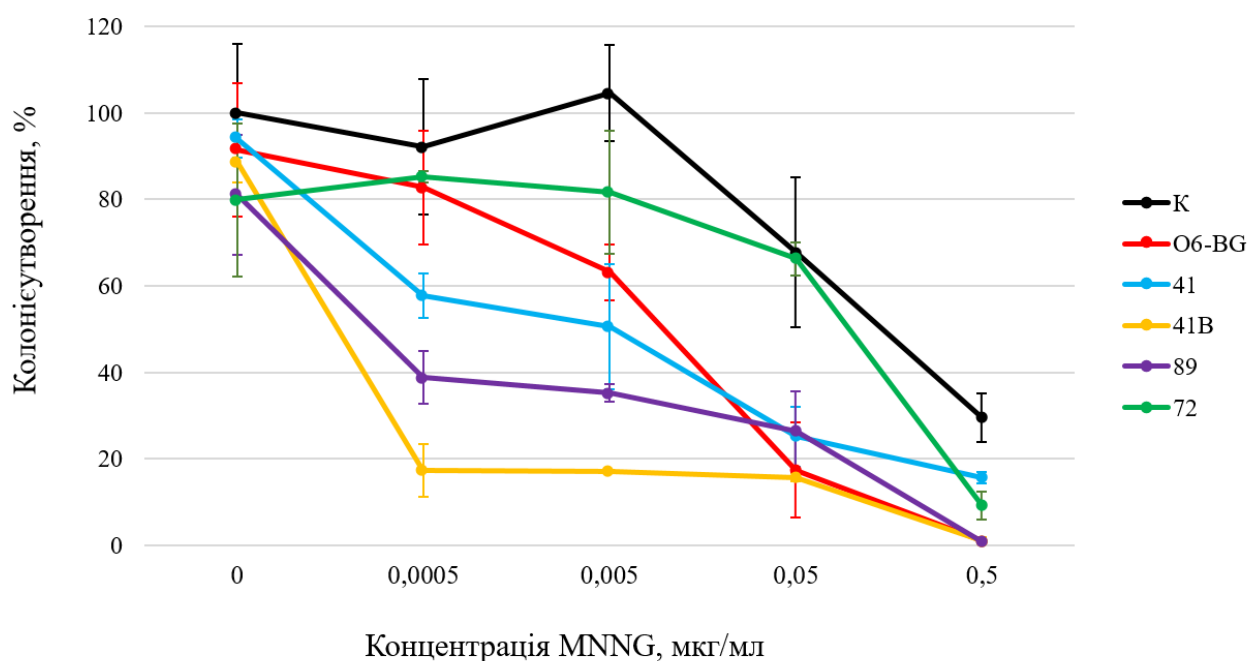


Рис.3.4. Колонієутворення клітин НЕР-2 після обробки стандартним інгібітором O⁶-BG або новими інгібіторами MGMT (41, 41B, 72, 89) у комбінації з MNNG в різних концентраціях. Концентрація інгібіторів – 10 мкМ

При концентрації MNNG 0,0005 мкг/мл стандартний інгібітор O⁶-BG знижує здатність клітин до колонієутворення на 8,7% порівняно з обробкою клітин лише інгібітором O⁶-BG. Цей показник зростає до 28% при підвищенні концентрації MNNG до 0,005 мкг/мл. Інгібітор 41, що демонструє найменшу цитотоксичність серед досліджуваних сполук, виявляється більш ефективним, оскільки знижує утворення клітинних колоній на 36,3% і 43,6% при поєднанні з MNNG у концентраціях 0,0005 мкг/мл та 0,005 мкг/мл, відповідно. Інгібітор 89 показує ще більш виражений ефект, зменшуючи колонієутворення на 42,3% і 45,9% при аналогічних концентраціях MNNG. Важливо зазначити, що цей інгібітор в концентрації 10мкМ сам по собі проявляє незначну

цитотоксичність, однак його цитотоксичність вища порівняно з іншими досліджуваними сполуками, за винятком сполуки 72. Найефективнішим серед досліджуваних інгібіторів виявився 41В, який знижує здатність клітин до колонієутворення на 71,4% та 71,6% при комбінованій дії з алкілюючим агентом у концентраціях 0,0005 мкг/мл та 0,005 мкг/мл, відповідно.

Отже, три з чотирьох досліджуваних інгібіторів MGMT виявились ефективними у клоногенному тесті на клітинах НЕр-2. Інгібітор 41В проявив найбільшу ефективність, а саме здатність суттєво сенсебілізувати клітини до алкілювальної сполуки MNNG за найнижчих її концентрацій (0,0005 мкг/мл).

3.3. Вивчення інгібувальних властивостей досліджуваних сполук

Інгібувальні властивості досліджували на лініях ракових клітин НЕр-2 та Т98G за допомогою Вестерн-блот аналізу. Даний метод виявляє відносну кількість білка-інтересу – MGMT. Як ми знаємо, фермент MGMT є «суїцидальним» білком, тобто його реакція деметилювання є необерненою. Після неї білок відправляється на протеасомну деградацію [12, 96]. Таким чином, за зниженням рівня білка MGMT в клітинах, можна судити про інгібувальні властивості потенційних інгібіторів MGMT – сполук, які конкурують з природним субстратом за фермент.

Крім вимірювання кількості білка MGMT в клітинах після обробок лише інгібіторами, також вимірювали кількість MGMT після комбінованої обробки для оцінки їх сумарного впливу, адже відомо, що алкілювальні сполуки можуть індукувати експресію MGMT в ракових клітинах [97]. Тому для об'єктивної оцінки результатів спочатку був зроблений Вестерн-блот аналіз

білкового лізату з клітин, що були оброблені лише алкілувальною сполукою MNNG. Клітини HEP-2 мають високий рівень білка MGMT після 48-72 годин культивування [98, 99]. Тому всі обробки проводили після декількох днів культивування. Контрольний рівень білка MGMT був визначений в інтактних клітинах також після декількох днів культивування.

Згідно результатів Вестерн-блот аналізу було виявлено, що рівень MGMT зменшується під впливом алкілувальної сполуки MNNG. При концентрації алкілувальної сполуки 0,5 мкг/мл спостерігали незначне зменшення рівня білка MGMT, тоді як зі збільшенням концентрації MNNG до 50 мкг/мл цей ефект був сильнішим (рис.3.5). Імовірно, цей ефект можна пояснити виснаженням репаративного ферменту MGMT під впливом алкілувальної сполуки. Під час алкілувальної хіміотерапії у онкохворих пацієнтів також спостерігали зменшення рівня MGMT в пухлинах. Але, на жаль, при систематичному прийомі алкілувальних препаратів, ракові клітини пізніше починали інтенсивну експресію MGMT. І, як наслідок, виникала хіміорезистентність [33, 100]. Таким чином, ефект зниження рівня MGMT в клітинах HEP-2 після 1-годинної обробки MNNG, який ми спостерігали, ймовірно, є тимчасовим.

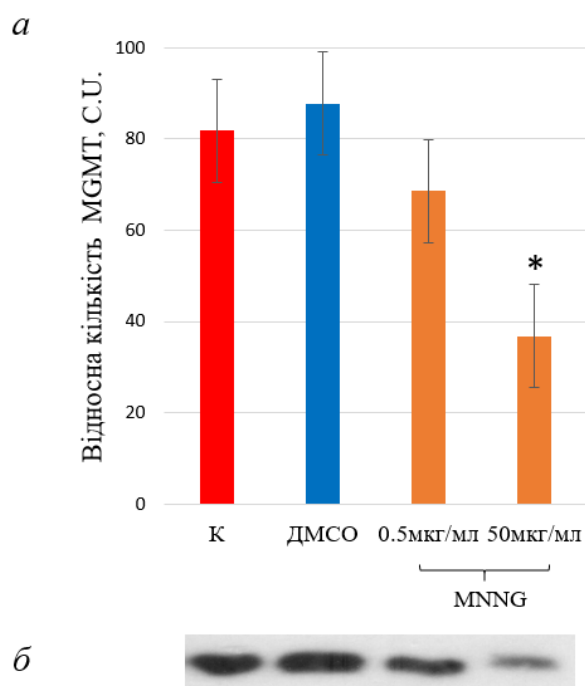


Рис.3.5. Відносна кількість MGMT, згідно результатів Вестерн-блот аналізу, після обробки НЕР-2 алкілувальною сполукою MNNG в різних концентраціях: *а* – діаграма кількості MGMT, нормалізованої відносно сумарної кількості білка, нанесеного на мембрану, *б* – зображення хемілюцентного сигналу MGMT (24 кДа) на мембрані; К – контроль, ДМСО – розчинник, * $p < 0,05$ – статистично значуща різниця порівняно з К

Наступним кроком було дослідження рівня MGMT в клітинах НЕР-2 після обробки їх інгібіторами, а також після комбінованої обробки інгібіторів і MNNG. Підтверджено, що стандартний інгібітор O^6 -BG має значну інгібувальну здатність та суттєво зменшує рівень MGMT в ракових клітинах (Рис.3.4, Рис.3.5). Вплив розчинника ДМСО – не значущий. Інгібітори 41 та 41В суттєво зменшують рівень білка MGMT, порівняно з контролем, хоча не так сильно, як O^6 -BG. Цікаво, що інгібітор 41В має дещо більшу інгібувальну активність, ніж 41 інгібітор, хоча вони є аналогами (рис.3.6).

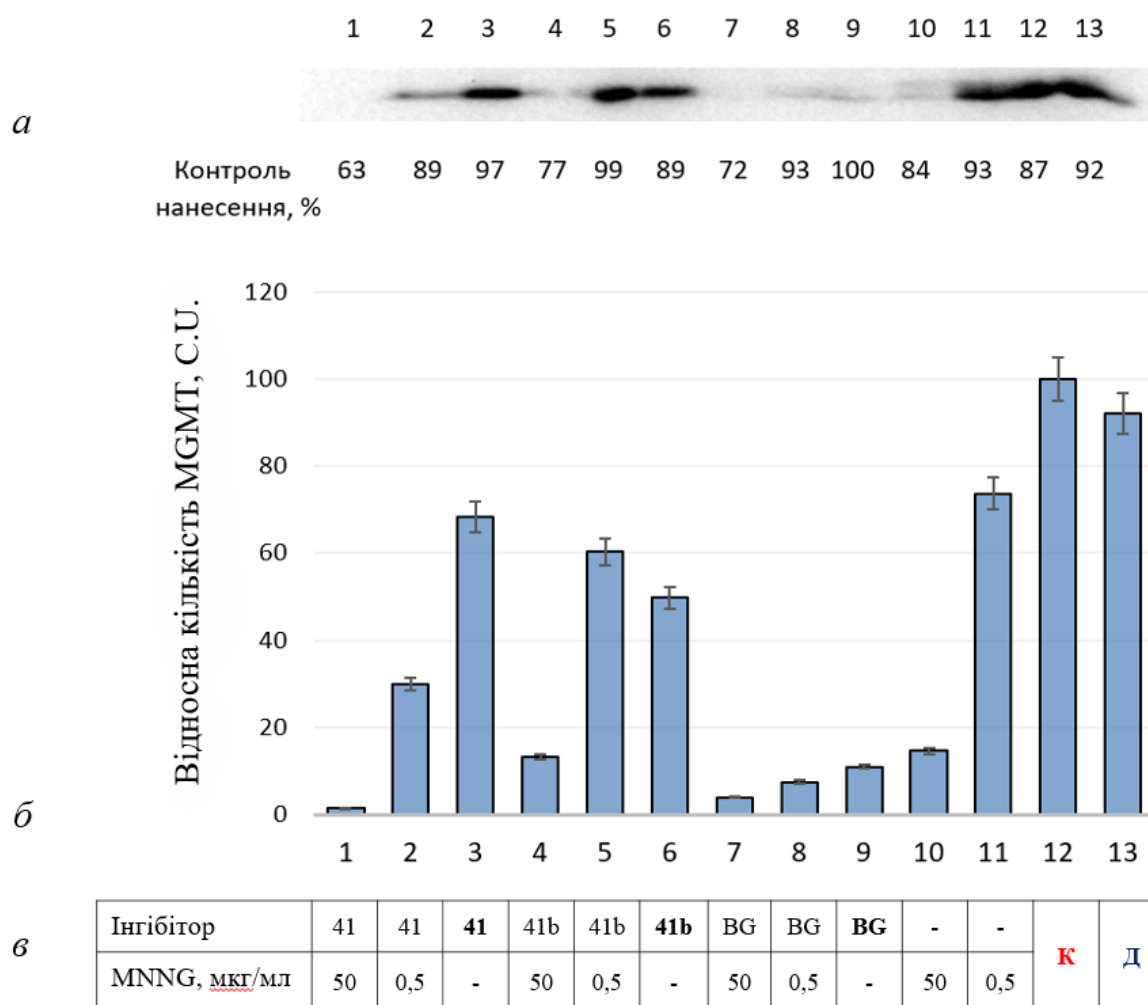


Рис.3.6. Відносна кількість білка MGMT у клітинах Нер-2 після обробки досліджуваними сполуками, де *a* – зображення хемілюсцентного сигналу MGMT (24 кДа) на мембрані із вказаним контролем нанесення білка; *б* – діаграма кількості MGMT, нормалізованої відносно контролю нанесення білка; *в* – схема обробок клітин Нер-2, де 41, 41В – нові інгібітори MGMT (10мкМ); BG – стандартний інгібітор (10мкМ); К – інтактний контроль; Д – розчинник ДМСО; MNNG – алкілувальна сполука (50 та 0,5 мкг/мл)

Інгібітори 72 та 89 також продемонстрували значні інгібувальні властивості, адже рівень білка MGMT знизився після обробки ними в клітинах майже в 2 рази, порівняно з контролем (рис.3.7).

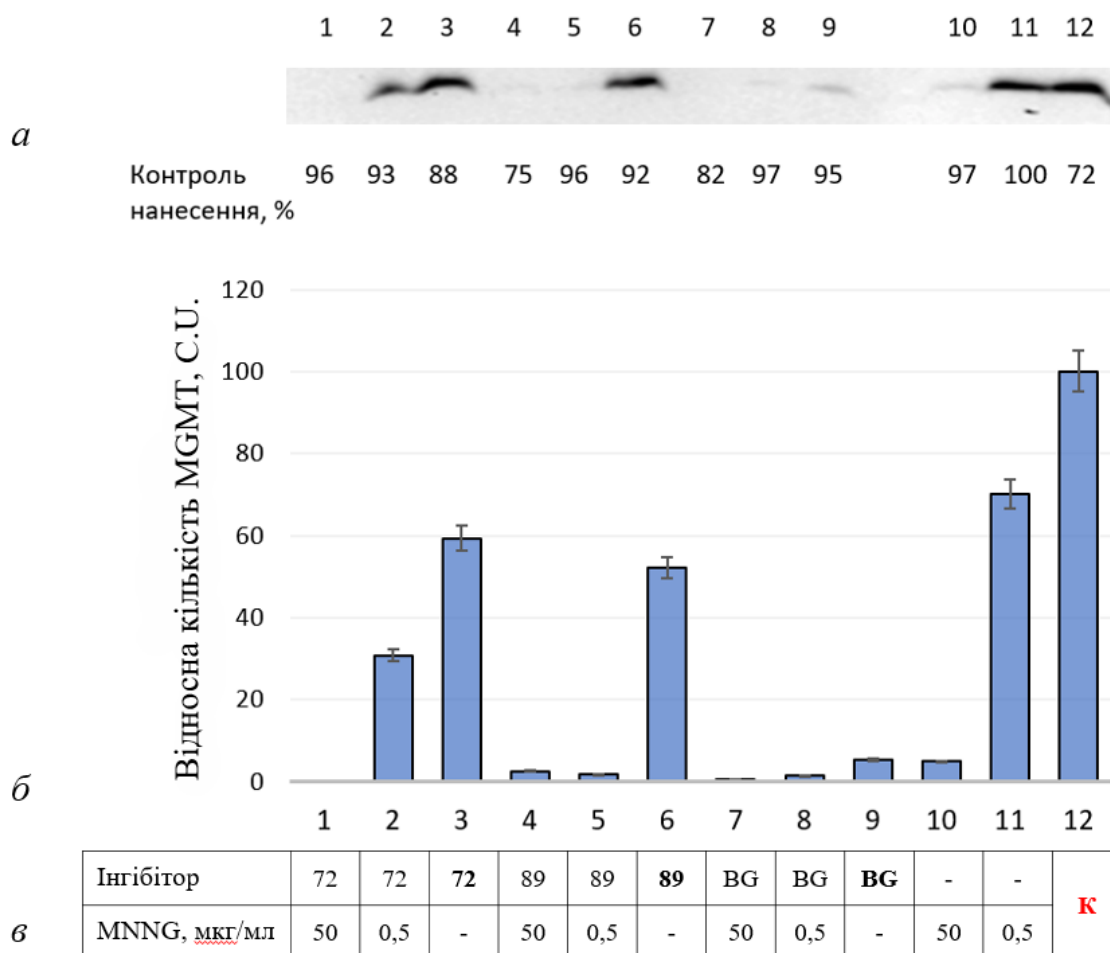


Рис.3.7. Відносна кількість білка MGMT у клітинах НЕР-2 після обробки досліджуваними сполуками, де *а* – зображення хемілюцентного сигналу MGMT (24 кДа) на мембрані із вказаним контролем нанесення білка; *б* – діаграма кількості MGMT, нормалізованої відносно контролю нанесення білка; *в* – схема обробок клітин НЕР-2, де 72, 89 – нові інгібітори MGMT (10мкМ); BG – стандартний інгібітор (10мкМ); К – інтактний контроль; MNNG – алкілувальна сполука (50 та 0,5 мкг/мл)

Таким чином, усі чотири досліджувані інгібітори продемонстрували інгібувальні властивості, зменшуючи рівень MGMT у клітинах в 1,5-2 рази. Найбільше зниження MGMT у клітинах HEP-2 було зафіксовано після обробки інгібітором 41В. Оскільки метод Вестерн-блоттингу є напівкількісним, ми не можемо з впевненістю стверджувати, що інгібітор 41В є найпотужнішим серед досліджених, проте, саме цей інгібітор стабільно демонстрував подібні результати у всіх повторних експериментах.

Також був досліджений комбінований вплив нових інгібіторів та алкілувальної сполуки MNNG на рівень MGMT в клітинах HEP-2. Було встановлено, що комбінована обробка посилює ефект зниження рівня MGMT, подібно до ефекту стандартного інгібітора O⁶-BG. Проте комбінований ефект кожного інгібітора та MNNG варіюється (рис. 3.4, рис. 3.5). Спільною ознакою у всіх випадках є значне зниження рівня MGMT при поєднанні інгібітора з алкілувальною сполукою у високих дозах (50 мкг/мл). Під час одночасного впливу інгібіторів і MNNG спостерігається синергічний ефект: інгібітори блокують здатність MGMT «ремонтувати» пошкодження ДНК, спричинені MNNG, тоді як MNNG спричиняє масивні пошкодження, які потребують участі репаративного ферменту MGMT. Внаслідок цього рівень активного MGMT значно знижується, оскільки білок стає неактивним через інгібітори або виснажується в процесі репарації.

Інгібувальні властивості також досліджували на гліомній клітинній лінії T98G, яка характеризується високим рівнем експресії MGMT після декількох днів культивування [101]. Окрім сили інгібування нових інгібіторів, досліджувалася також тривалість їхньої дії, для чого проводили обробки клітин однією дозою сполук з різною тривалістю інкубації: 24, 48 та 72 години.

За результатами дослідження виявлено, що досліджувані інгібітори 41 та 41В знижують рівень білка MGMT, відносно інтактного контролю. Новий інгібітор 41В продемонстрував сильніші інгібувальні властивості, порівняно з 41 інгібітором. Цікаво, що після 24-годинної обробки обидві сполуки продемонстрували виражений інгібувальний ефект (рис.3.8.*а*), після 48 годин обробки ефект значно зменшився (рис.3.8.*б*), а після 72-годинної обробки рівень MGMT був майже таким же, як у контрольних зразків (рис.3.8.*в*).

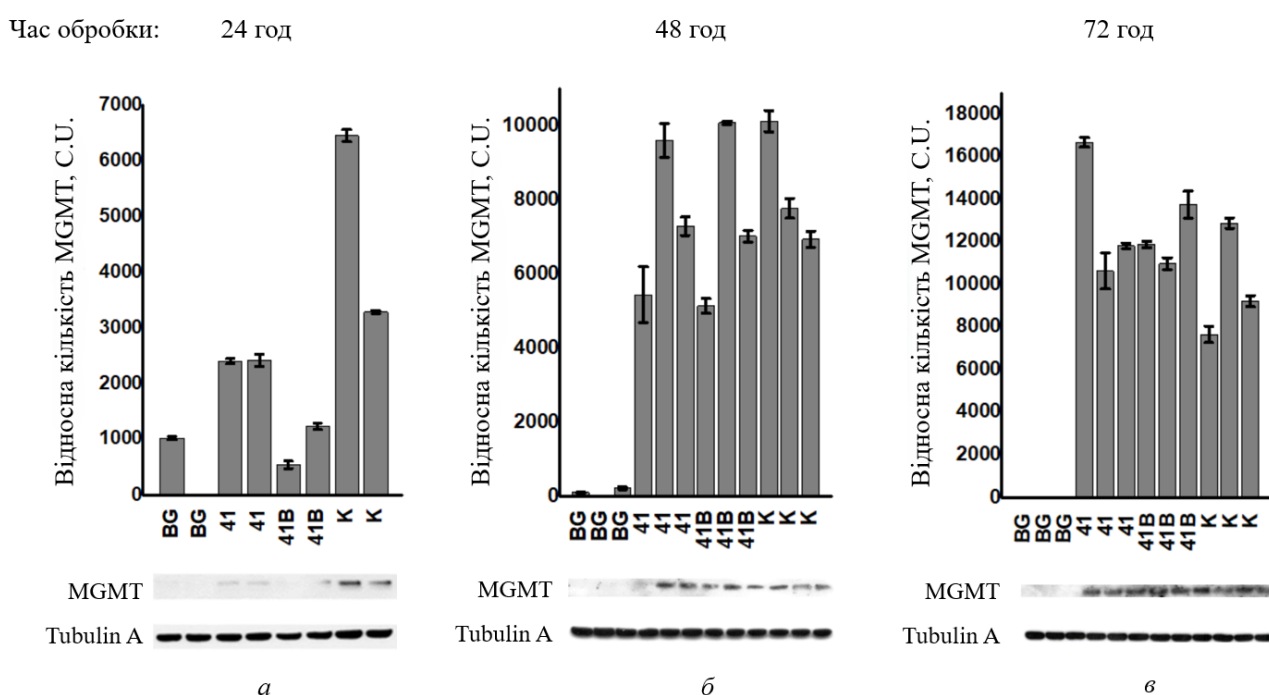


Рис.3.8. Кількість білка MGMT в клітинах T98G після обробок новими інгібіторами (41 та 41В) та стандартним інгібітором O^6 -BG з різним періодом обробки: *а* – 24 години інкубації, *б* – 48 годин та *в* – 72 години. У верхній частині рисунку відображена діаграма кількості MGMT, нормалізованої відносно контролю нанесення; у нижній частині рисунку – зображення хемілюцентного сигналу MGMT (24 кДа) та Tubulin A (55 кДа), де останній використаний у якості контролю нанесення білка. Декілька стовпчиків на кожную обробку – окремо повторені експерименти

Варто відзначити, що інгібувальний ефект стандартного інгібітора O⁶-BG був надзвичайно сильним і тривалим, що підтверджується дуже низьким рівнем MGMT навіть через 72 години після обробки. Така тривала деплеція MGMT свідчить про стійке інгібування механізмів репарації ДНК, що узгоджується з даними літератури, які вказують на те, що O⁶-BG ефективно підвищує чутливість пухлинних клітин до алкілувальних агентів завдяки тривалому пригніченню MGMT [102].

Таким чином, узагальнюючи результати досліджень інгібувальних властивостей сполук на двох різних лініях ракових клітин, можна зробити висновок, що досліджувані сполуки дійсно є інгібіторами MGMT, оскільки після їхньої обробки в обох лініях спостерігалось зниження рівня білка MGMT у порівнянні з контролем. Крім того, було виявлено синергічний ефект комбінованої дії інгібіторів та алкілувальної сполуки MNNG на зниження рівня MGMT у клітинах HEr-2. Також встановлено, що нові інгібітори найкраще проявляють свої властивості протягом першої доби, після чого їхня інгібувальна здатність значно знижується, на відміну від стандартного інгібітора O⁶-BG. Імовірно, це пов'язано з відмінностями у механізмах дії сполук.

3.4. Дослідження впливу нових інгібіторів на пухлинні клітини людини з різним рівнем експресії гену *MGMT*

У даному дослідженні було використано дві лінії гліомних клітин: T98G та U251MG, які відрізняються рівнем експресії *MGMT*. Лінія клітин T98G демонструє високий рівень експресії *MGMT*, що відповідає статусу дикого типу цього гена (*MGMT-wt*). Натомість клітинна лінія U251MG

характеризується метильованим промотором гена *MGMT*, що призводить до відсутності експресії цього гена [101, 103, 104]. Завданням даного дослідження було вивчити різницю в реакціях ракових клітин з різним рівнем експресії *MGMT* на нові інгібітори, а також на комбіновану дію інгібіторів та алкілувальних сполук.

3.4.1. Вплив нових інгібіторів на аутофагію в пухлинних клітинах.

Рівень аутофагії вивчали за допомогою методів флуоресцентної спектрометрії та мікрофотографії, використовуючи аутофлуоресцентний барвник MDC. Цей барвник характеризується високою специфічністю та швидким накопиченням в аутофагосомах клітин, де він ковалентно зв'язується з ліпідами мембран везикул, що дозволяє ідентифікувати та оцінити рівень аутофагії [105, 106].

Для об'єктивної оцінки отриманих результатів було спочатку вивчено вплив алкілувальної сполуки MNNG на аутофагію в гліомних клітинах. Згідно з результатами флуоресцентної спектрометрії, MNNG значно підвищує рівень аутофагії в клітинах U251MG навіть при найнижчих застосованих концентраціях у порівнянні з інтактним контролем (рис.3.9.а). Це явище можна пояснити відсутністю захисних механізмів проти алкільних пошкоджень у цих клітинах, зокрема дефіцитом репаративного білка *MGMT*. Збільшення кількості пошкоджень ДНК під впливом MNNG, своєю чергою, індукує підвищення рівня аутофагії як адаптивної реакції клітини на деструктивні процеси, спрямованої на відновлення внутрішньоклітинного гомеостазу [76, 107].

На відміну від клітин U251MG, в клітинах лінії T98G підвищення рівня аутофагії спостерігалось лише при найвищій концентрації MNNG, застосованій у цьому експерименті – 0,5 мкг/мл (рис.3.9.б). Це вказує на

активну роботу репаративного білка MGMT, який протидіє цитотоксичній дії MNNG, хоча при збільшенні концентрації алкілувальної сполуки відбувається виснаження цього ферменту.

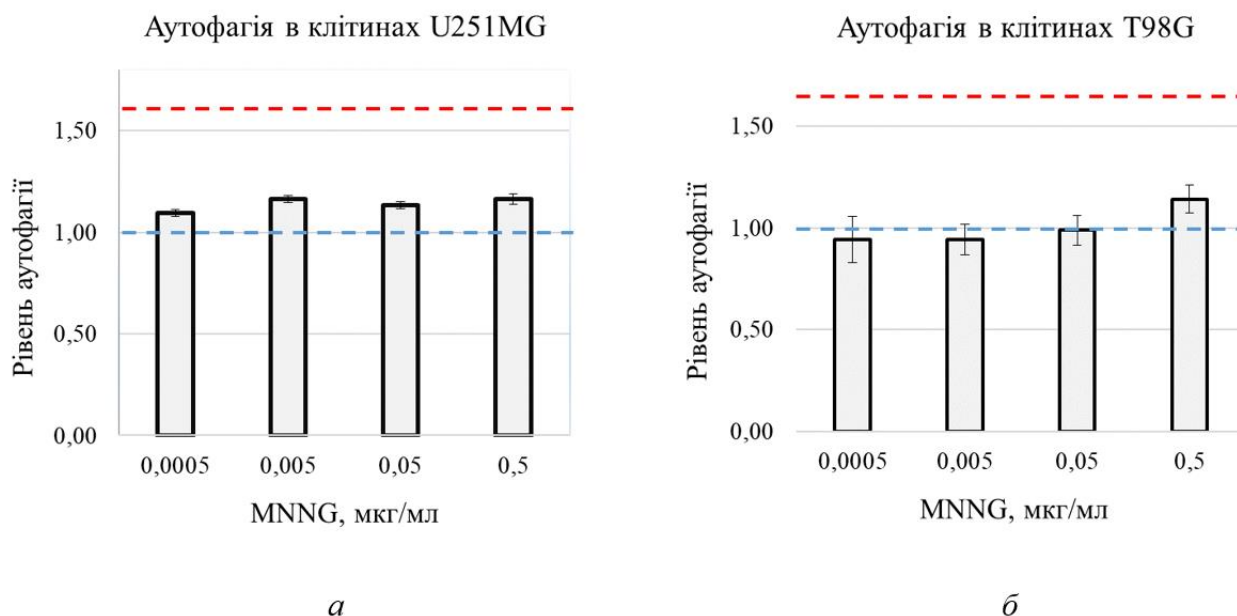


Рис.3.9. Рівень аутофагії після обробок алкілувальною сполукою MNNG в різних концентрація в клітинах U251MG (*а*) та T98G (*б*), де синя пунктирна лінія – негативний контроль (інтактні клітини), а червона пунктирна лінія – позитивний контроль (клітини, оброблені FCCP)

Згідно з результатами флуоресцентної спектрометрії, нові інгібітори, а також стандартний інгібітор O⁶-BG не спричиняють підвищення аутофагії в обох клітинних лініях (рис.3.10). Це може бути пояснено їхньою загальною нетоксичністю при концентрації 10 мкМ, що використовувалася в даному дослідженні.

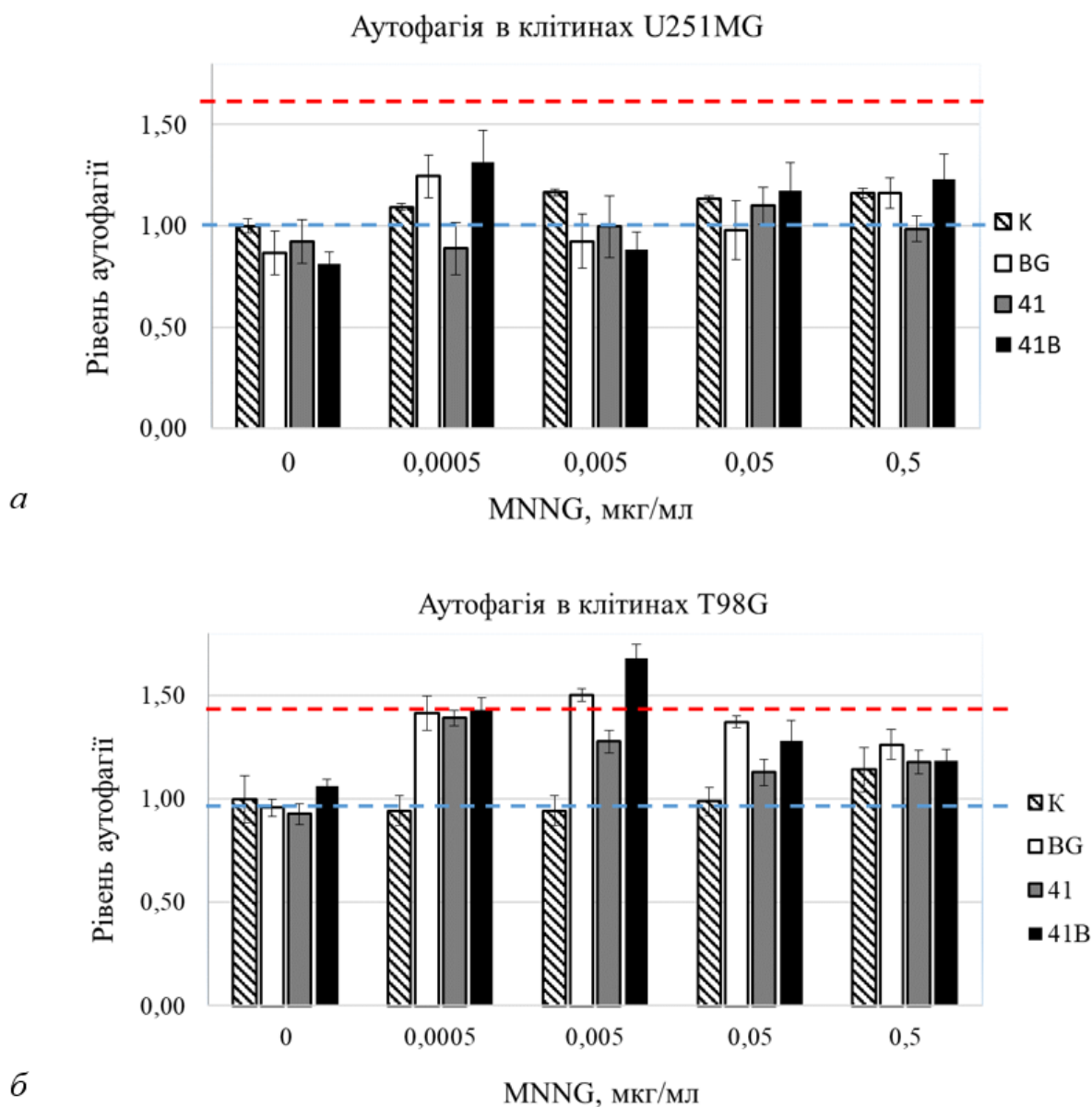


Рис.3.10. Рівень аутофагії в клітинах U251MG (а) та T98G (б) після обробок стандарним інгібітором O⁶-BG, новими інгібіторами 41 та 41B, а також контроль (К) у комбінації з алкілувальною сполукою MNNG у різних концентраціях, а також без MNNG, згідно результатам флуоресцентної спектрофотометрії. Синя пунктирна лінія – негативний контроль (інтактні клітини), а червона пунктирна лінія – позитивний контроль (клітини, оброблені FCCP)

У поєднанні з алкілювальною сполукою MNNG нові інгібітори, як і стандартний інгібітор O⁶-BG, підвищують рівень аутофагії в клітинах. Примітно, що значне збільшення аутофагії спостерігається в клітинах лінії T98G, тоді як у клітинах лінії U251MG рівень аутофагії зріс незначно (рис.3.10). Очікувалося, що рівень аутофагії в останній лінії буде вищим, оскільки в цих клітинах відсутній MGMT, який запобігає цитотоксичній дії алкілювальної сполуки. Проте, в клітинах, які були оброблені лише MNNG, як зазначалося вище, це припущення підтвердилося: у клітинах T98G рівень аутофагії не змінився, порівняно з контролем, тоді як у клітинах U251MG аутофагія зростала. Імовірно, інгібітори впливають на інші компоненти клітинних метаболічних шляхів.

Дані спектрофотометрії загалом співпадають з даними флуоресцентної мікроскопії. Клітини T98G мають набагато більше аутофагосом, ніж клітини лінії U251MG, після комбінованої обробки стандартним або новими інгібіторами і MNNG. В той час як самі інгібітори майже не спричиняють підвищення аутофагії в обох лінях клітин (рис.3.11).

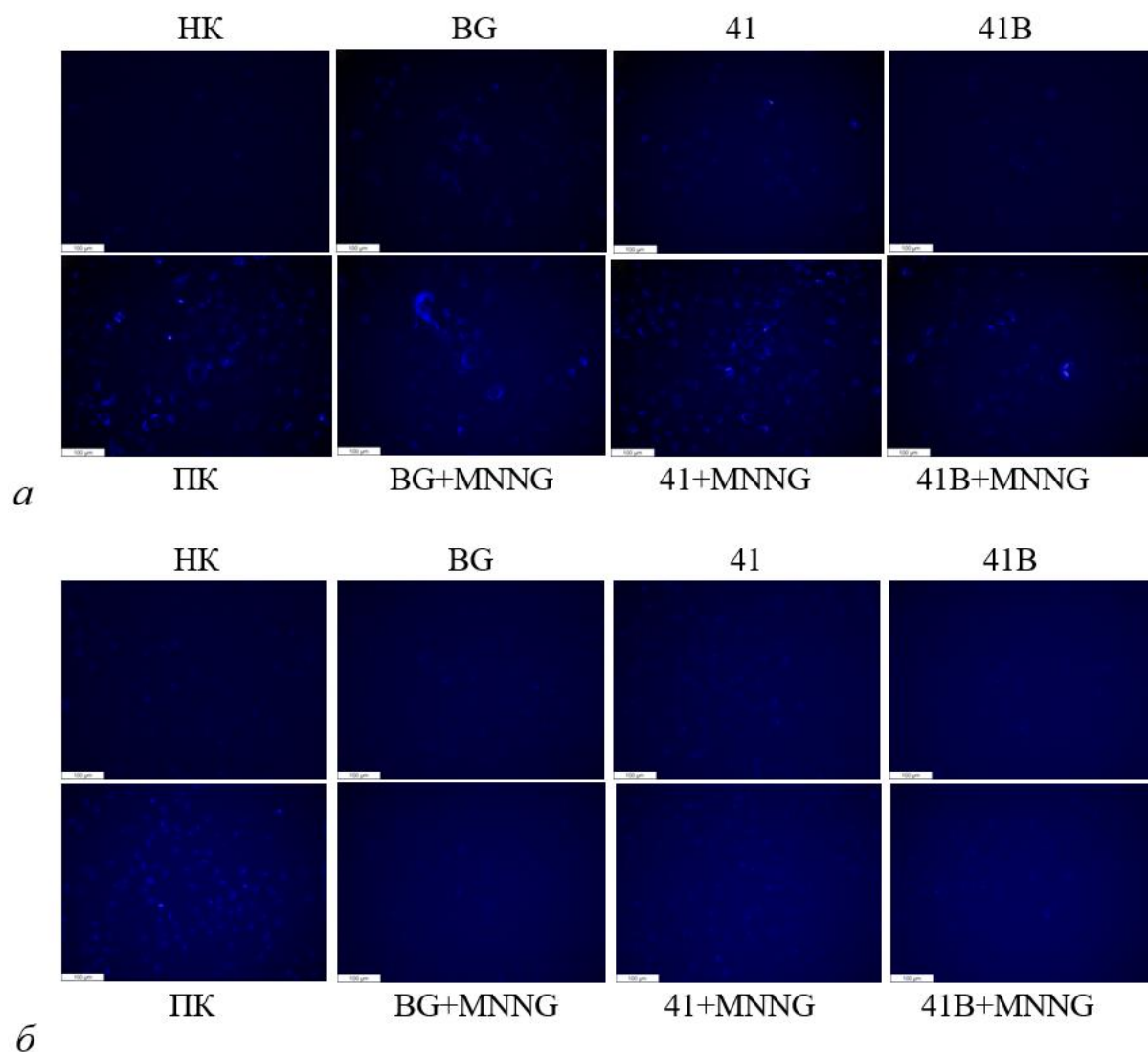


Рис.3.11. Мікрофотографії аутофагосом (сині) в клітинах T98G (а) та U251MG (б), де НК – негативний контроль (інтактний); ПК – позитивний контроль (клітини, оброблені FCCP); BG, 41, 41B – клітини, оброблені інгібіторами O^6 -BG, 41 та 41B, відповідно; BG/41/41B+MNNG – клітини, оброблені інгібіторами O^6 -BG, 41 та 41B, відповідно, у комбінації з алкілувальною сполукою MNNG у концентрації 0,005мкг/мл

3.4.2. Вплив нових інгібіторів на летальність пухлинних клітин.
Загибель ракових клітин внаслідок хіміотерапії – основна ознака ефективності

хіміотерапевтичних препаратів. Тож, оцінка впливу нових інгібіторів у комбінації з алкілувальною сполукою на летальність ракових клітин є надзвичайно важливою задачею.

Рівень летальності клітин досліджували за допомогою методів флуоресцентної спектрометрії та мікрофотографії, використовуючи комерційний набір для фарбування живих і мертвих клітин LIVE/DEAD® Cell Imaging Kit. Живі клітини ідентифікували завдяки наявності внутрішньоклітинної естеразної активності, що встановлюється шляхом ензиматичного перетворення кальцеїну АМ у флуоресцентний кальцеїн, який утримується в живих клітинах і має інтенсивне зелене забарвлення. Червоний компонент набору, гомодимер етидію-1, проникає лише у клітини з пошкодженими мембранами, що характерно для мертвих клітин, викликаючи яскраву червону флуоресценцію при зв'язуванні з ДНК. Фонові рівні флуоресценції є мінімальними, оскільки барвники практично не флуоресціюють до взаємодії з клітинами [108].

На основі даних флуоресцентної спектрометрії встановлено, що клітини лінії T98G виявляють більшу чутливість до цитотоксичної дії алкілувальної сполуки в поєднанні з інгібіторами, ніж клітини лінії U251MG. Водночас самі інгібітори майже не підвищують рівень летальності у порівнянні з контролем в обох клітинних лініях (рис.3.12). Варто зазначити, що обробка новими інгібіторами 41 та 41В призвела до дещо нижчого рівня летальності порівняно з O⁶-BG, що підтверджує нижчу цитотоксичність нових інгібіторів у порівнянні зі стандартним інгібітором.

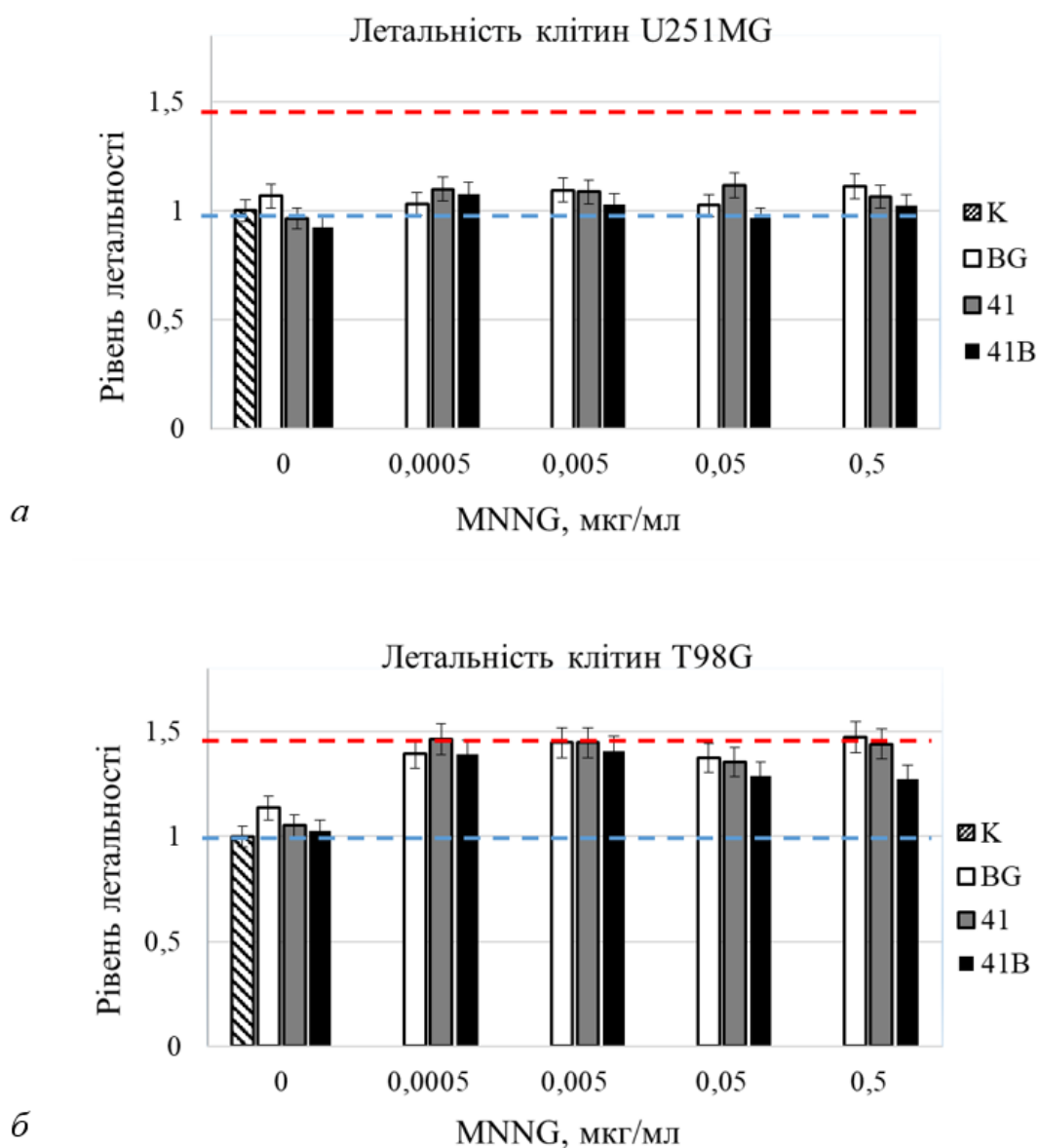


Рис.3.12. Рівень летальності клітин U251MG (а) та T98G (б) після обробок стандарним інгібітором O^6 -BG, новими інгібіторами 41 та 41В у комбінації з алкілувальною сполукою MNNG у різних концентраціях, а також без MNNG, згідно результатам флуоресцентної спектрофотометрії. Контроль (К) – інтактні клітини. Синя пунктирна лінія – негативний контроль (інтактні клітини), а червона пунктирна лінія – позитивний контроль (клітини, культивовані в безсироватковому середовищі).

Дані спектрометрії загалом співпадають з даними флуоресцентної мікроскопії. Серед клітин лінії T98G спостерігали в полі зору значно більше мертвих клітин після комбінованої обробки, ніж серед клітин U251MG. Обробки самими ж інгібіторами не спричиняли значної смертності (рис.3.13).

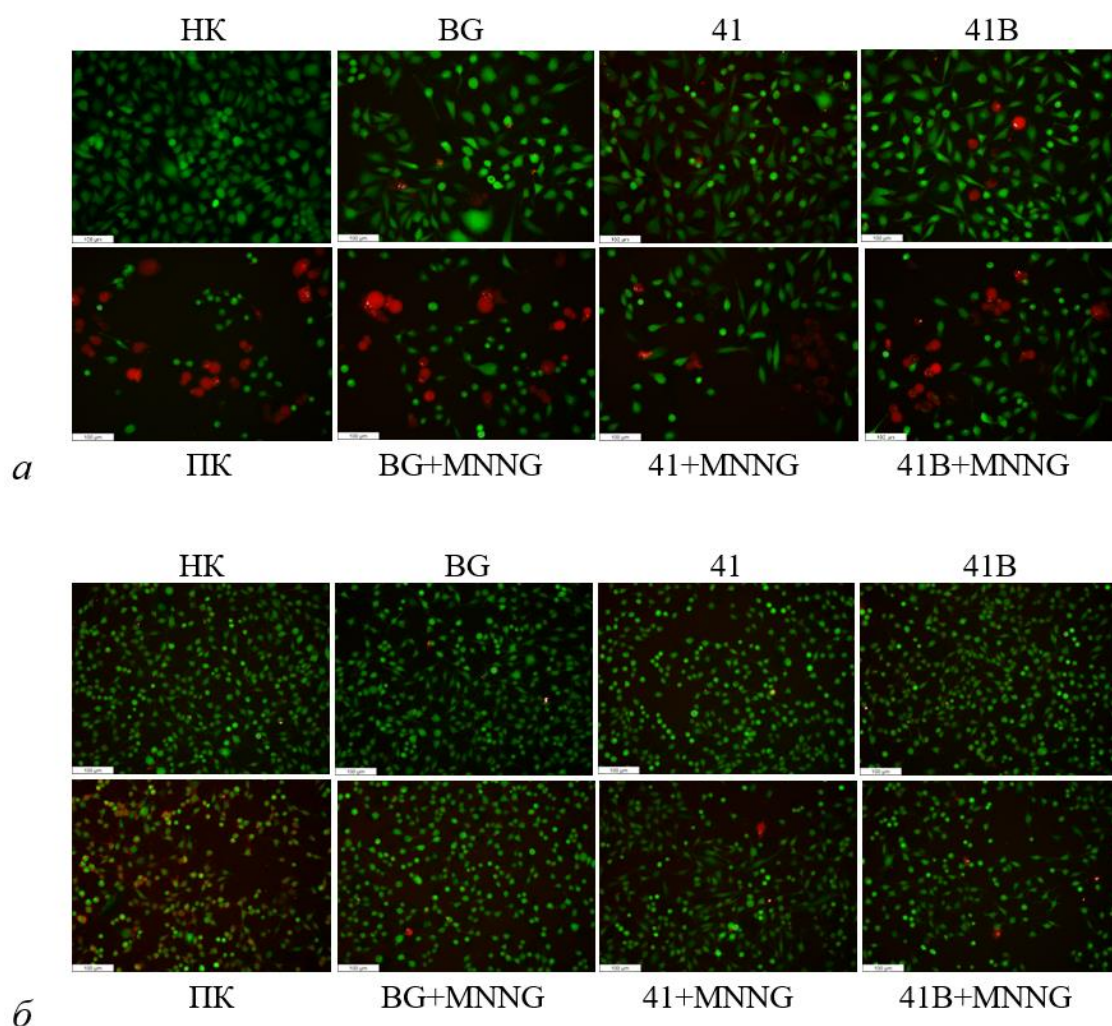


Рис.3.13. Мікрофотографії живих (зелені) та мертвих (червоні) клітин лінії T98G (а) та U251MG (б), де НК – негативний контроль (інтактний); ПК – позитивний контроль (клітини, культивовані в безсироватковому середовищі); BG, 41, 41B – клітини, оброблені інгібіторами O^6 -BG, 41 та 41B, відповідно; BG/41/41B+MNNG – клітини, оброблені інгібіторами O^6 -BG, 41 та 41B, відповідно, у комбінації з алкілувальною сполукою MNNG у концентрації 0,005мкг/мл

Згідно з літературними даними, аутофагія є результатом деструктивних процесів у клітині [76, 80]. Таким чином, аутофагію можна розглядати як один з показників цитотоксичності сполук, що потрапляють у клітину. На основі досліджень аутофагії встановлено, що нові інгібітори 41 та 41В не виявляють цитотоксичності за концентрації 10 мкМ у гліомних клітинах обох ліній. Проте, інгібування MGMT цими інгібіторами підвищує цитотоксичну дію алкілувальної сполуки MNNG, що є важливим у контексті алкілувальної хіміотерапії.

Результати дослідження аутофагії узгоджуються з даними щодо летальності гліомних клітин після обробки досліджуваними сполуками. Зіставлення даних свідчить про те, що клітини, оброблені лише інгібіторами, не демонстрували значного рівня аутофагії і мали низький рівень летальності, що підтверджує низьку цитотоксичність цих сполук і вказує на їх безпечність для клітин.

Водночас, інгібітори посилювали цитотоксичний ефект MNNG, але лише в клітинах лінії T98G з високим рівнем експресії MGMT. У цих клітинах після комбінованої обробки спостерігався високий рівень аутофагії, який супроводжувався підвищеною летальністю, тобто стрімко зростала кількість мертвих клітин. Це свідчить про високу ефективність нових інгібіторів, які настільки посилювали цитотоксичну дію алкілувальної сполуки, що захисні механізми клітини не могли впоратися, і клітини гинули. Ймовірно, після спроби реабілітації через аутофагію клітини переходили до апоптозу [109]. Встановлено, що численні компоненти аутофагії необхідні для того, щоб апоптотичні фактори могли індукувати загибель клітин [110, 111]. Таким чином, аутофагія може бути важливою ланкою для індукції певних сигнальних шляхів для активації апоптозу в гліомних клітинах.

Інгібітори проявляли ефективність у комбінації з MNNG в гліомних клітинах з високим рівнем експресії MGMT, оскільки в цій ситуації цей репаративний фермент є основним механізмом захисту від алкілувальних пошкоджень. Саме тому при знешкодженні білків MGMT, була подолана алкілувальна резистентність клітин, що призвело до підвищення рівня летальності.

Відсутність подібного ефекту в клітинах лінії U251MG може бути пояснена активацією альтернативних механізмів захисту від пошкоджень, спричинених алкілувальними агентами, серед яких важливу роль відіграє ізоцитратдегідрогеназа 1 (IDH1). Цей фермент є ключовим учасником клітинного метаболізму, зокрема циклу трикарбонових кислот або циклу Кребса. Мутації гена IDH1, зокрема мутація R132H, яка часто зустрічається у гліомах, корелюють із розвитком резистентності до різних форм терапії, зокрема до алкілувальних агентів, таких як TMZ та похідні нітрозосечовин [112]. Однією з основних особливостей гліом з мутацією IDH1 є часте гіперметилування промотора MGMT, що призводить до зниження експресії цього білка та, відповідно, до підвищення чутливості до алкілувальних агентів. Проте цей ефект може бути нейтралізований альтернативними механізмами, пов'язаними з метаболічними змінами. Зокрема, дослідження показують, що такі гени, як ERCC1, XPA, APEX1 і XRCC1, залучені до репарації ДНК, можуть відігравати значну роль у формуванні стійкості до алкілувальних сполук, навіть за умов гіперметилування гену *MGMT* [113-115].

Отже, нові інгібітори в концентрації 10 мкМ не впливають на виживаність гліомних клітин та рівень аутофагії в клітинах, проте роблять їх більш чутливими до алкілувальних сполук. Це свідчить про те, що досліджувані сполуки можуть мати терапевтичний ефект під час комбінованої

алкілувальної хіміотерапії хворих з гліомами, які мають високий рівень *MGMT*.

Результати, представлені у розділі, опубліковані в наступних наукових працях:

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>
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>
3. **K. S. Zhuvaka**, A. P. Iatsyshyna, Z. M. Nidoeva, G. P. Volynets, T. P. Ruban, L. L. Macewicz, S. M. Yarmoluk, L. L. Lukash. Investigation of effectiveness of *MGMT* potential inhibitors in human cell culture. XV IMBG all-Ukrainian Conference of Young Scientists with international participation. *Biopolym. Cell.* 2021; 37(3):185-244. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A56>
4. **K. S. Zhuvaka**, L. L. Macewicz, O. O. Piven, G. P. Volynets, T. P. Ruban, S. M. Yarmoluk, L. L. Lukash. Impact of new *MGMT* inhibitors on autophagy in glioma cells in vitro at combined action with alkylating agent N-methyl-N'nitro-Nnitrosoguanidine. Conference of young scientists of the Institute of

Molecular Biology and Genetics — 2023. The conference is dedicated to young scientists who defend Ukraine and those who gave their lives for our Motherland. Biopolym. Cell. 2023; 39(1):60-73. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A89>

5. **K. S. Zhuvaka**, O. O. Piven, L. L. Macewicz, G. P. Volynets, T. P. Ruban, S. M. Yarmoluk, L. L. Lukash. Comparison of new non-nucleoside MGMT inhibitors' effectiveness in HEP-2 and T98G cancer cells. The Conference of Young Scientists within the framework of XVIII International Conference «Factors in Experimental Evolution of Organisms», dedicated to the 50th anniversary of the foundation of the Institute of Molecular Biology and Genetics of the NASU. Biopolym. Cell. 2023; 39(4):311-322. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000AA8>

6. **K. S. Zhuvaka**, L. L. Macewicz, O. O. Piven, G. P. Volynets, T. P. Ruban, S. M. Yarmoluk, L. L. Lukash. Novel non-nucleoside MGMT inhibitors: potential in combined alkylating chemotherapy. BioGENext Conference: Shaping the future of medicine through biomedical research and development. Biopolym. Cell. 2024; 40(3):242. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000ADC>

РОЗДІЛ 4

ТЕРАПЕВТИЧНИЙ ЕФЕКТ НОВИХ ІНГІБІТОРІВ MGMT НА МОДЕЛІ *IN VIVO*

4.1. Створення експериментальної моделі на основі мишей лінії ICR

Миші лінії ICR зі спонтанними пухлинами молочної залози широко використовуються у науково-дослідницьких експериментах у різних галузях біомедичних наук, застосовуючи різноманітні методологічні підходи, такі як моделювання захворювань, токсикологічні та фармакологічні дослідження лікарських засобів, а також імунологічні та генетичні дослідження. Завдяки цим методологічним підходам, миші ICR виступають універсальними моделями для проведення досліджень у різних сферах біомедицини [116].

В даній роботі експериментальна модель була створена з використанням саме цієї лінії мишей. Було досліджено динаміку росту пухлини у необроблених тварин, де розмір пухлини при кожному наступному вимірюванні нормалізували відносно початкових значень. Виявлено, що пухлини зростали відносно повільно протягом першого тижня після їх виявлення, з подальшим переходом у фазу експоненційного росту на 2-3-му тижні. Після цього спостерігалось метастатичне поширення з одночасним зниженням темпів росту основної пухлини (рис.4.1). У зв'язку зі зростанням метастазів і початком некротичних процесів у пухлинах, тварин на цьому етапі піддали евтаназії з етичних міркувань. Крім того, утримання тварин та

всі маніпуляції з ними відбувались згідно етичних міжнародних стандартів щодо поводження з лабораторними тваринами [117-119].

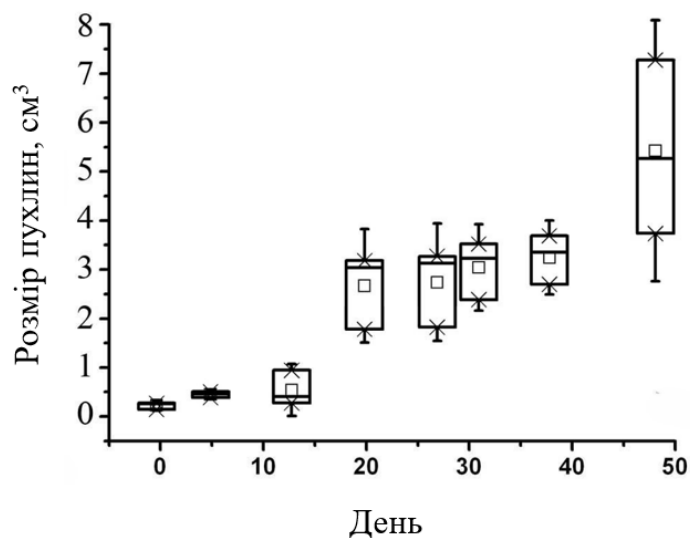


Рис.4.1. Динаміка росту пухлин молочної залози мишей ICR протягом 50 днів, де прямокутники позначають інтерквартильний діапазон (IQR); горизонтальні лінії всередині – медіана; квадрати – середнє значення; стовпчики – стандартне відхилення (SD); $n = 10$

Розміри пухлин у інтактної контрольної групи та групи мишей, що отримували лікування алкілувальною сполукою MNNG, були порівняні на 9-й день експерименту (рис.4.2). Ін'єкції MNNG у концентрації 0,5 мкг/кг маси тіла вводилися місцево, безпосередньо в пухлину, щоденно. Виявлено, що у контрольній групі спостерігався широкий діапазон розмірів пухлин, деякі з яких збільшилися понад 1200% від початкового розміру. Медіана в цій групі була значно вищою, що свідчить про тенденцію інтактних пухлин до значного зростання. Водночас у терапевтичній групі спостерігався значно вужчий діапазон розмірів пухлин, причому більшість пухлин залишалися меншими за

400% від початкового розміру. Медіана розміру пухлин у терапевтичній групі була значно нижчою, ніж у контрольній.

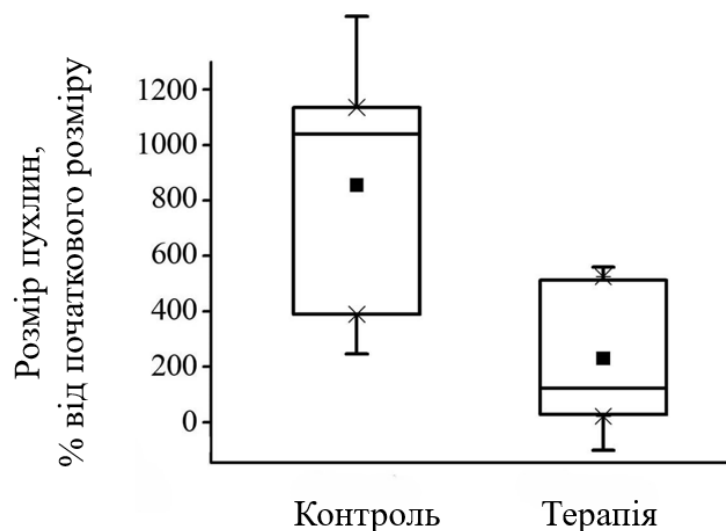


Рис.4.2. Порівняння розмірів пухлин молочної залози контрольної (інтактної) та терапевтичної (лікування алкілувальною сполукою MNNG, 0,5 мкг/кг маси тіла щоденно) груп на 9 добу експерименту; прямокутники позначають інтерквартильний діапазон (IQR); горизонтальні лінії всередині – медіана; чорні квадрати – середнє значення; стовпчики – стандартне відхилення (SD); $p < 0,005$ – статистично значуща різниця між контрольною та терапевтичною групами; $n = 6$

Отримані результати свідчать про значний вплив хіміотерапії на інгібування росту пухлин. У відсутності лікування спостерігається неконтрольоване зростання пухлин, як продемонстровано на прикладі контрольної групи. Водночас, під впливом хіміотерапії, зростання пухлин значно обмежене, що підкреслює ефективність терапії MNNG у стримуванні прогресування пухлини.

Таким чином, наша модель є відповідною для дослідження терапевтичних ефектів нових інгібіторів MGMT, які можуть застосовуватись в комбінованій алкілувальній хіміотерапії. Через суттєве уповільнення росту пухлин у групі з терапією MNNG, необроблену контрольну групу було виключено з подальших досліджень динаміки пухлин. Це рішення було зумовлене обмеженням тривалості експерименту, спричиненим необхідністю ранньої евтаназії необроблених тварин.

4.2. Порівняння ефективності терапевтичної дії нових інгібіторів MGMT на моделі алкілувальної терапії пухлин молочної залози

У цьому дослідженні були використані нові інгібітори 41, 41В та 89 для оцінки їхньої ефективності в моделі *in vivo*. Самостійне введення інгібіторів тваринам не продемонструвало жодного впливу, в тому числі не було зафіксовано змін в динаміці пухлин, порівняно з інтактним контролем. Це свідчить про загальну нетоксичність та безпечність нових інгібіторів при їх самостійному застосуванні для лабораторних мишей.

Згідно з результатами комбінованої терапії, всі три досліджувані інгібітори продемонстрували здатність підвищувати ефективність терапії MNNG. Серед них найвищу ефективність показав інгібітор 89. У 5 із 6 тварин в цій експериментальній групі спостерігалось значне зменшення розміру пухлини вже 6-й день експерименту. Початкові розміри пухлин у цих тварин становили приблизно 4-6 мм в діаметрі. Проте, у випадках, коли початковий розмір пухлини перевищував 9 мм в діаметрі, ефективність терапії була менш вираженою. Інгібітор 41В мав найменший ефект, хоча також мав помітний вплив: у групі тварин, що отримувала комбіновану терапію з цим інгібітором,

швидкість росту пухлини значно сповільнилася порівняно з групою, яка отримувала лише MNNG. Проте, зменшення розмірів пухлин, як у випадку з інгібітором 89, не спостерігалось. Інгібітор 41 продемонстрував середню ефективність серед досліджуваних сполук, оскільки, крім сповільнення росту пухлин, в окремих випадках також було зафіксовано їх незначне зменшення (рис.4.3.а).

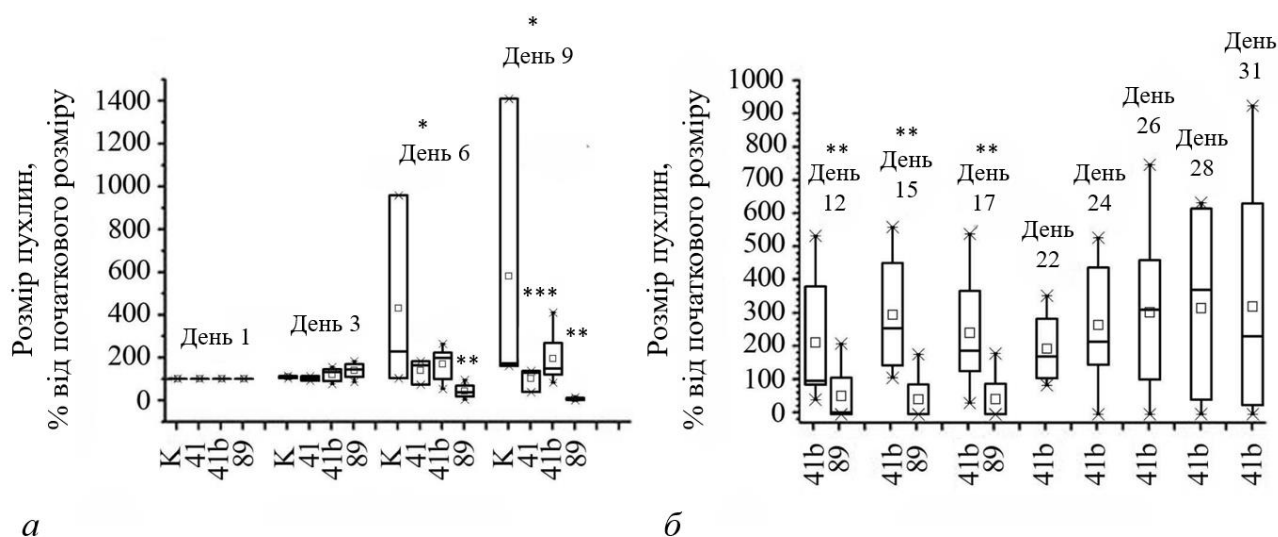


Рис.4.3. Динаміка росту пухлин молочної залози під дією комбінованої алкілувальної терапії кожні кілька днів у ранньому (а) та більш тривалому (б) періодах, де К – контроль (терапія лише MNNG, 0,5 мкг/кг маси тіла щоденно); 41, 41b, 89 – терапія MNNG та інгібіторів 41, 41В та 89 (10мкМ/кг маси тіла щоденно); прямокутники позначають інтерквартильний діапазон (IQR); горизонтальні лінії всередині – медіана; квадратики – середнє значення; стовпчики – стандартне відхилення (SD); * $p < 0,005$ – статистично значуща різниця між групою К та групами комбінованої терапії; ** $p < 0,005$ – статистично значуща різниця між групами 41В та групами 89; *** $p < 0,05$ – статистично значуща різниця між групою 41 та групою 41В; $n = 6$

Після дев'ятого дня експерименту було проведено евтаназію тварин контрольної групи, оскільки у деяких з них спостерігалось утворення надто великих пухлин з ознаками масивного некрозу тканин. У групах, які отримували комбіновану терапію з використанням інгібіторів 89 та 41В, було продовжено подальше лікування та спостереження за динамікою росту пухлин. На 17 день експерименту у дослідженні залишилися лише тварини, що отримували терапію з інгібітором 41В, оскільки у тварин, які отримували інгібітор 89, було досягнуто стійкої ремісії (рис.4.3.б). У групі, що отримувала інгібітор 41В, у більшості тварин спостерігалось уповільнення росту пухлин, а в окремих випадках зафіксовано незначний регрес пухлин, а саме за умов, коли їх початковий розмір був відносно невеликим (3-5 мм в діаметрі).

Слід підкреслити, що дегенерація пухлин під впливом комбінованої терапії із застосуванням сполуки 41В постійно супроводжувалася значним некрозом навколишніх тканин, що призводило до утворення ран. На відміну від цього, при використанні інгібіторів 41 та 89, процес не супроводжувався зовнішніми проявами некрозу.

Крім того, у тварин, які отримували лікування інгібітором 41, було відзначено майже дворазове збільшення розмірів селезінки у порівнянні з контролем, а також зміну забарвлення цього органу з характерного темно-вишневого на брудно-коричневий колір, що супроводжувалося зниженням щільності тканини. Крім того, виявлялися численні, хоча й незначні за розміром, сполучнотканинні спайки між селезінкою та прилеглими ділянками кишківника. Ці побічні ефекти вказують на можливий вплив інгібітора 41 на імунну систему або метаболічні процеси, що регулюють функції селезінки, що може пояснювати зміни у її морфології. Подібні зміни можуть свідчити про розвиток реакції гіперплазії або ж іншого патологічного процесу, який потребує подальшого дослідження для виявлення механізмів їх виникнення та

можливих наслідків для загального стану організму [120, 121]. Ці дані підкреслюють необхідність уважного моніторингу органів-мішеней під час застосування комбінованих терапій та врахування можливих побічних ефектів для оптимізації лікувальних стратегій.

Отже, усі три інгібітори продемонстрували здатність знижувати темпи росту пухлин під час алкілувальної хіміотерапії на мишиній моделі. Найбільший терапевтичний ефект проявив інгібітор 89.

4.3. Вивчення впливу нових інгібіторів на рівень білка MGMT в пухлинах молочної залози

Дослідження впливу нових інгібіторів на рівень білка MGMT в злоякісних тканинах під час комбінованої терапії було проведено з використанням Вестерн-блот аналізу. У виділених зразках після інкубації з антитілами проти MGMT на мембранах було виявлено два сигнали, що відповідали білкам MGMT (24 кДа) та MARP (50 кДа). Хоча основною метою даного дослідження було виявлення білка MGMT, білок MARP було ідентифіковано ненавмисно. Він також детектується антитілами проти MGMT і має приблизну молекулярну масу 48 кДа. MARP належить до родини гомологів MGMT – ATL (алкілтрансферазоподібних білків), які мають подібну функцію [32, 99].

У контрольних зразках тканин рівень білка MGMT був низьким або не виявлявся, однак після терапії MNNG цей показник зазвичай підвищувався. Під впливом MNNG спостерігалось зростання експресії MGMT після 9-денної терапії цією алкілувальною сполукою (рис.4.4).

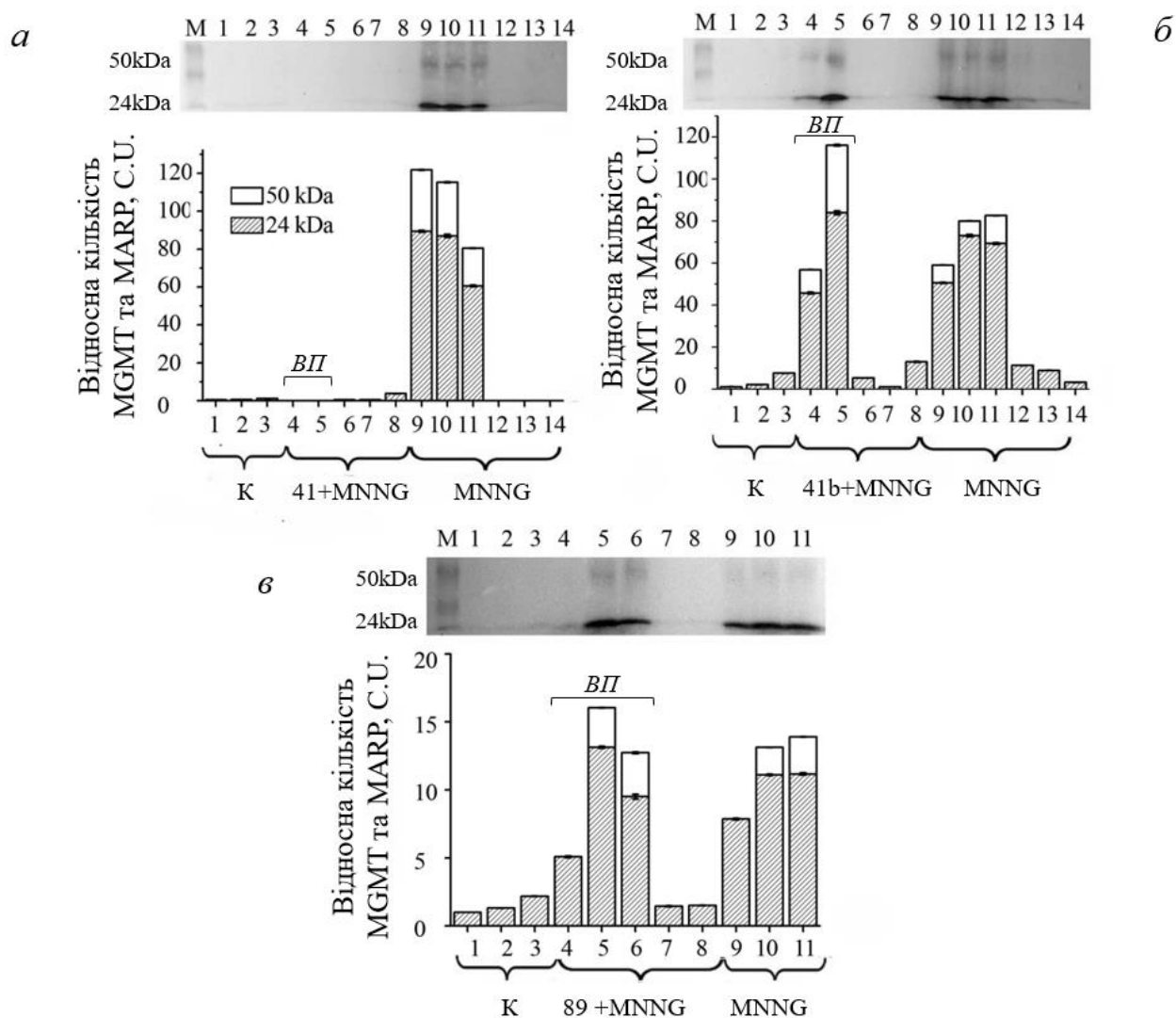


Рис.4.4. Відносна кількість білків MGMT та MARP в пухлинах молочної залози при комбінованій терапії MNNG (щоденне введення 0,5 мкг/кг маси тіла) та інгібіторів 41 (а), 41В (б) і 89 (в) (щоденне введення 10 мкМ/кг маси тіла) на 9 добу експерименту, де К – контроль (інтактні пухлини); 41/41b/89+MNNG – комбінована терапія; MNNG – терапія лише MNNG; верхня панель рисунку – зображення хемілюцентного сигналу MGMT при 24 кДа та MARP при 50 кДа; нижня панель – діаграма кількості MGMT та MARP, нормалізованої відносно контролю нанесення; ВП – великі пухлини; стовпчики – стандартне відхилення (SD)

Слід зазначити, що це очікувано, оскільки MNNG є алкілувальним агентом, при систематичному використанні якого відбувається активація захисних механізмів клітини, зокрема експресія MGMT, для забезпечення виживання клітин в умовах хіміотерапії. Так виникає хіміорезистентність [33, 100].

У пухлинах після комбінованої терапії було виявлено, що рівень MGMT був низьким або не виявлявся у всіх досліджених зразках за умов застосування інгібітора 41 (рис.4.4.а). Тоді як під впливом інгібіторів 41В (рис.4.4.б) та 89 (рис.4.4.в) – лише у зразках від тварин, лікування яких було розпочато на ранній стадії росту пухлини, але не у тих, які перебували на передметастатичній стадії (великі пухлини).

Результати дослідження означають, що нові інгібітори ефективні під час комбінованої терапії саме за рахунок своєї безпосередньої дії – інгібування ферменту MGMT в ракових клітинах, а не за рахунок впливу на інші ефекторні білки. Важливо відзначити, що інгібітор 41 демонстрував здатність знижувати рівень MGMT навіть у пухлинах великого розміру, на відміну від інгібіторів 41В та 89. Це може свідчити про те, що інгібітор 41 може проявляти свою активність при меншому дозуванні, оскільки його інгібувальна ефективність у співвідношенні з розміром пухлини є вищою порівняно з інгібіторами 41В та 89, які показали ефективне пригнічення MGMT лише в пухлинах відносно меншого розміру.

Отже, всі 3 інгібітори продемонстрували здатність знижувати рівень MGMT у пухлинах в умовах комбінованої терапії. Найбільш ефективним у цьому дослідженні виявився інгібітор 41, оскільки він значно знижував рівень ферменту як у пухлинах початково меншого розміру, так і у пухлинах більшого розміру у мишей лінії ICR.

4.4. Дослідження ймовірних механізмів регресії пухлин під впливом комбінованої хіміотерапії

У даній роботі було проведено пілотне дослідження та попередній аналіз потенційних протипухлинних механізмів дії інгібітора 41 під час комбінованої терапії. Основну увагу було зосереджено на дослідженні експресії генів, що кодують ключові білки, які беруть участь у процесах апоптозу, аутофагії та сигнальних шляхах β -катеніну. Зокрема, було оцінено рівні експресії β -катеніну, APC, TCF4, Parkin52, LC3B, а також каспаз 9 (ініціюючої) та 3 (каталітичної) (табл.4.1).

Таблиця 4.1.

Білки, експресію яких досліджували

Білок	Процес, до якого залучений, функція
β -катенін	β -катенін/ Wnt-сигнальний шлях, проліферація і диференціація
APC	Антагоніст Wnt-сигнального шляху, апоптоз, міграція та адгезія клітин
TCF4	Транскрипційний фактор Wnt-сигнального шляху
Каспаза 9	Апоптоз (ініціація процесу)
Каспаза 3	Апоптоз (розщеплення білків)
Parkin 52	Убіквітинування, антиапоптична активність, мітофагія
LC3B	Аутофагія

Ці білки відіграють важливу роль у регулюванні клітинних процесів, що залучені до розвитку та прогресії пухлин. Наприклад, β -катенін є центральним компонентом Wnt-сигнального шляху, який регулює клітинну проліферацію та диференціацію [122]. APC виступає як антагоніст цього шляху та є важливим фактором у підтримці клітинного гомеостазу. TCF4 діє як транскрипційний фактор у цьому ж сигнальному шляху [123].

Каспази 9 та 3 є критичними компонентами апоптозу: каспаза 9 відповідає за ініціацію цього процесу, тоді як каспаза 3 виконує розщеплення білків, що призводить до клітинної загибелі [124, 125]. Parkin52, відомий своєю антиапоптичною активністю, також відіграє важливу роль у процесі мітофагії [126], тоді як LC3B є одним із ключових білків, що залучені до аутофагії [85, 86, 127].

Таким чином, дослідження експресії цих білків дозволяє глибше зрозуміти механізми дії інгібітора 41 та його можливий вплив на клітинні процеси, що перешкоджають розвитку пухлини.

Незважаючи на значну індивідуальну варіабельність експресії цих регуляторних білків, не було виявлено значних відмінностей між обробленими та необробленими зразками тканин молочної залози, як злоякісними, так і здоровими, за винятком каспази 3, яка є ключовим каталітичним білком апоптозу. Цей білок експресується в організмі в неактивній формі (прокаспаза 3). Під впливом сигнальних молекул ініціююча каспаза 9 розщеплює прокаспазу 3 на дві субодиниці, які потім утворюють активний фермент каспазу 3 [125, 128]. Методом Вестерн-блоттингу в досліджуваних зразках тканин було виявлено різні форми каспаз 3.

В інтактних пухлинах, як і в оброблених алкілувальною сполукою MNNG пухлинах, каспаза 3 виявлялася лише в неактивній формі, яка має молекулярну

вагу 31 кДа. Проте, після комбінованої терапії в деяких зразках були виявлені активні форми каспази 3 з молекулярною вагою 12 і 17 кДа (рис.4.5.а,б).

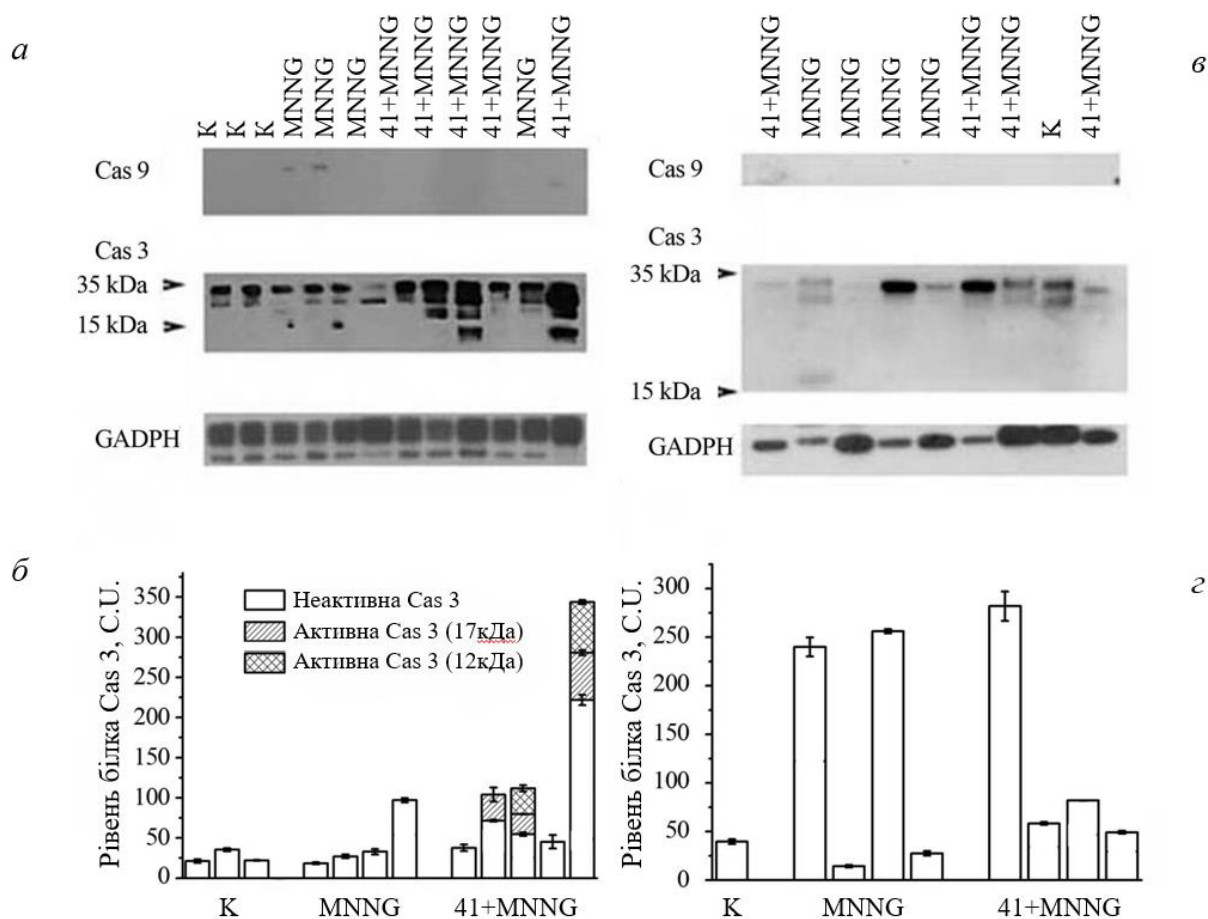


Рис.4.5. Рівні білків каспази 3 (Cas 3) і каспази 9 (Cas 9) у злоякісних (а, б) і здорових (в, г) тканинах молочної залози на 9-й день дослідження, де К – інтактні тканини, MNNG – терапія лише алкілувальною сполукою MNNG (0,5 мкг/кг маси тіла щоденно), 41+MNNG – комбінована терапія (10 мкМ/кг і 0,5 мкг/кг маси тіла щоденно, відповідно); на рисунках (а) і (в) зображення хемілюцентного сигналу Cas 9 при 46 кДа, неактивна форма Cas 3 при 35 кДа, активні форми Cas 3 при 12 та 17 кДа (близько 15 кДа) та GAPDH як контроль нанесення при 36 кДа; на рисунках (б) і (г) – діаграма відносної кількості активної і неактивних форм каспаз 3, нормалізованої відносно контролю нанесення; стовпчики – стандартне відхилення (SD)

В здорових тканинах ані терапія MNNG, ані комбінована терапія не призвели до утворення активних форм каспази 3 (рис.4.5.в,г).

Каспаза 3 є ключовим ферментом, який відіграє важливу роль у процесі апоптозу. Вона функціонує як каталітична каспаза, розщеплюючи специфічні білкові субстрати в клітині, що спричиняє руйнування клітинних структур і, зрештою, призводить до клітинної смерті. Цей фермент є одним із основних ефекторних білків апоптозу, тому його виявлення свідчить про активацію апоптичного шляху деградації пухлин [129, 130].

Зазначимо, що під дією MNNG, хоча й не спостерігалось утворення активних форм каспази 3, було зафіксовано збільшення експресії прокаспази 3 в злоякісних і здорових тканинах порівняно з інтактними пухлинами та інтактними молочними залозами. Наявність прокаспаз не обов'язково свідчить про преапоптичний стан клітини, оскільки їх активність залежить від подальшого протеолітичного розщеплення, що запускає апоптоз. Висока експресія прокаспази 3 може вказувати на готовність клітини до апоптозу, проте, для підтвердження преапоптичного стану необхідно враховувати наявність інших маркерів апоптозу та їх активність [131, 132]. Важливо також підкреслити, що активні форми каспази 3 повністю відсутні в зразках тканини здорової молочної залози після комбінованої терапії, що може свідчити про відносну безпеку лікування для нормальних клітин.

Отже, ймовірним механізмом регресії пухлин під впливом комбінованої терапії MNNG з новими інгібіторами є апоптоз, що підтверджується виявленням активних форм каспази-3 у зразках злоякісних тканин після лікування. Відсутність активних форм каспази-3 у здорових тканинах свідчить про відносну безпеку комбінованої терапії для нормальних клітин.

Результати, представлені у розділі, опубліковані в наступних наукових працях:

1. 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>
2. **K. S. Zhuvaka**, L. L. Macewicz, T. P. Ruban, G. P. Volynets, S. M. Yarmoluk, L. L. Lukash. The therapeutic effect of new non-nucleoside MGMT inhibitors during combined alkylating chemotherapy in vivo. The materials of the XVIII Ukrainian Conference of Young Scientists of IMBG of NAS of Ukraine. *Biopolym. Cell.* 2024; 40(2):153-168. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000AB8>
3. **K. S. Zhuvaka**, L. L. Macewicz, O. O. Piven, G. P. Volynets, T. P. Ruban, S. M. Yarmoluk, L. L. Lukash. Novel non-nucleoside MGMT inhibitors: potential in combined alkylating chemotherapy. BioGENext Conference: Shaping the future of medicine through biomedical research and development. *Biopolym. Cell.* 2024; 40(3):242. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000ADC>

РОЗДІЛ 5

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Репаративний фермент MGMT відіграє ключову роль у механізмі прямої репарації метильованих гуанінів у ДНК, що запобігає виникненню мутацій та апоптозу клітин. MGMT специфічно видаляє пошкодження ДНК, спричинене метилюванням гуаніну у позиції O⁶, шляхом перенесення метильної групи з ДНК на себе. Ця реакція є одноразовою та необоротною, після чого фермент інактивується, піддається убіквітинуванню і направляється на протеасомну деградацію. Через такий механізм дії MGMT називають «суїцидальним» ферментом [3, 11, 133].

MGMT має важливе значення у контексті протипухлинної терапії. У багатьох типах раку підвищена активність MGMT асоціюється з резистентністю до алкілувальних агентів, що знижує ефективність терапії. Високий рівень експресії MGMT сприяє видаленню пошкоджень ДНК, спричинених хімотерапевтичними агентами, знижуючи тим самим їх цитотоксичний ефект. Отже, пригнічення активності MGMT може підвищити чутливість ракових клітин до хімотерапії [3, 35, 38].

В даній роботі проведено детальне дослідження низки нових ненуклеозидних інгібіторів MGMT в різних модельних системах, зокрема на моделях *in vitro* з використанням пухлинних клітин людини різних ліній HEP-2, T98G та U251MG, а також на моделі *in vivo* з використанням лабораторних мишей лінії ICR.

Слід надавати відомості стосовно отримання колекції потенційних інгібіторів MGMT ненуклеозидної природи. Колекція нових потенційних інгібіторів була створена у відділі біомедичної хімії Інституту молекулярної біології та генетики НАН України. Процес створення інгібіторів базувався на застосуванні напівгнучкого молекулярного докінгу. Кристалічна структура MGMT (PDB ID: 1EH6) була отримана з бази даних Brookhaven Protein Data Bank та використана для докінгу з активним сайтом ферменту близько 100 000 лігандів. З них було відібрано 83 000 сполук, які відповідали правилам Ліпінського і містили лише атоми C, N, O, S та галогенів. Далі з кристалічної структури були видалені молекули води та зайві ліганди, а також побудовані рецепторні карти. Найперспективніші сполуки з високими прогнозованими інгібувальними властивостями були відібрані для синтезу. Так було створено колекцію з 89 потенційних інгібіторів MGMT [91, 92].

Опираючись на результати багаторічного дослідження, зробленого в попередні роки в лабораторії клінічних досліджень Ліппарда Центру досліджень раку при медичному факультеті Єльського університету США та у відділі генетики людини ІМБГ НАН України, із колекції (89 низькомолекулярних сполук) поступово відбирались перспективні потенційні інгібітори. В Єльському університеті було протестовано нові низькомолекулярні сполуки за допомогою флуоресцентного MGMT-методу. Цей метод детекції інгібувальної активності в бесклітинній системі був розроблений Доктором Філіпом Пенкесом. Він включає 6 етапів: 1) приготування субстрату, а саме - хлороетильованої ДНК з пошкодженнями; 2) обробка рекомбінантного MGMT кожним потенційним інгібітором окремо; 3) утворення суміші субстрату ДНК з комплексом рекомбінантний MGMT+потенційний інгібітор; 4) проведення режиму нагрівання; 5) вимірювання флуоресценції, що надається барвником H33258, в результаті чого комплекс набуває яркої флуоресценції; 6) проведення розрахунків. Якщо

дієвий інгібітор інактивує рекомбінантний MGMT, то весь комплекс має флуоресценцію після нагрівання, в той же час у випадку неактивності інгібітору репаративний ензим MGMT здійснює репарацію хлороетильованої ДНКі флуоресценція послаблюється після нагрівання. В результаті відібрали більше двох десятків потенційних інгібіторів [91, 92].

Паралельно дослідження потенційних інгібіторів проводили в Інституті молекулярної біології та генетики НАН України, де застосовували інший підхід – попередній відбір нетоксичних з вибірковою високотоксичних потенційних інгібіторів за результатами культуральних тестів. Так було проведено тестування цитотоксичності на клітинах лінії НЕР-2 для 89 сполук [91]. В результаті 12 сполук показали низьку цитотоксичність, подібну до стандартного інгібітору O^6 -BG (рис.5.1).

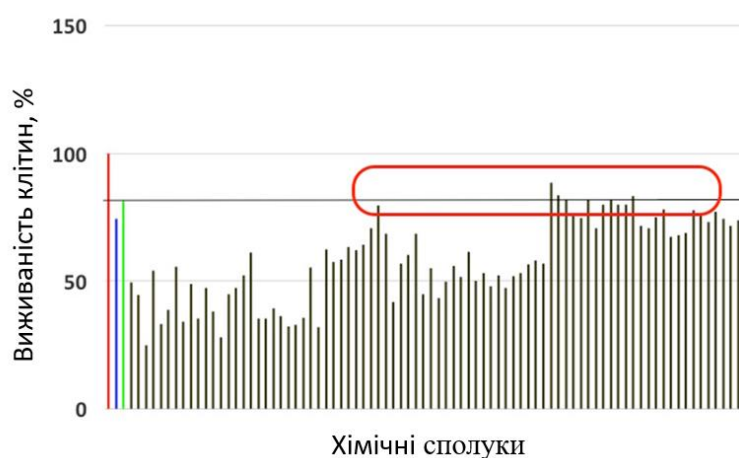


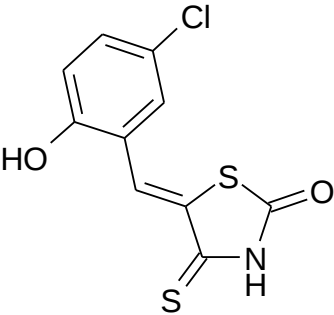
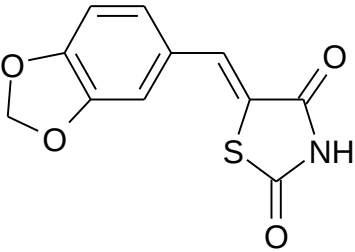
Рис.5.1. Цитотоксичність досліджуваних 89 хімічних сполук, згідно результатів культуральних тестів, де вісь абсцис – сполуки в порядковій послідовності (від 1 до 89) у концентрації 100мкМ, а вісь ординат – % виживаності клітин НЕР-2. Перші 3 лінії на вісі абсцис означають: 1 (червона) – інтактний контроль, 2 (синя) – статистично допустиме відхилення цитотоксичності відносно O^6 -BG, 3 (зелена) – O^6 -BG. Виділена червоним зона – окреслені потенційні інгібітори, подібні за цитотоксичністю до O^6 -BG

Крім основної колекції сполук, також були створені деякі аналоги потенційних інгібіторів, які демонстрували найкращі результати, з метою подолання деяких фізико-хімічних недоліків, наприклад, таких як колір.

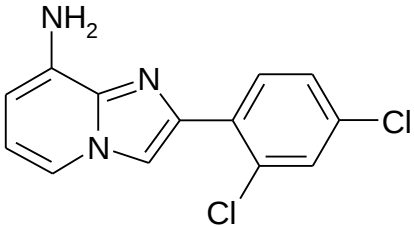
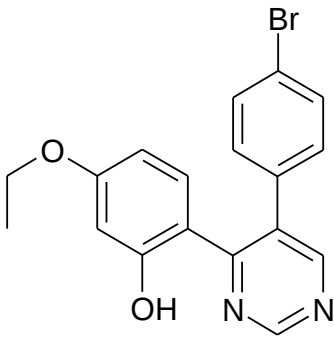
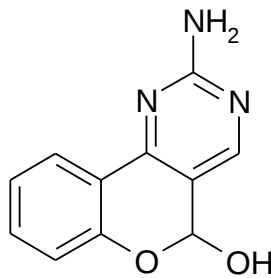
Узагальнюючи результати досліджень, проведених у попередні роки двома лабораторіями в Україні та США, для досліджень, представлених у цій роботі, було відібрано 5 сполук, які за цитотоксичністю та інгібувальною активністю були аналогічними або перевершували O⁶-BG (табл.5.1).

Таблиця 5.1.

Потенційні інгібітори MGMT

Номер сполуки	Структурна формула	Хімічна назва
41		5-(5-Хлоро-2-гідрокси-бензиліден)-4-тіоксо-тіазолідин-2-он
41b		5-Бензо[1,3]діоксол-5-ілметилен-тіазолідин-2,4-діон

Продовження табл.5.1

72		2-(2,4-Дихлоро-феніл)- імідазо[1,2-а]піридин-8- іамін
89		2-[5-(4-Бromo-феніл)- піримідин-4-іл]-5-етокси- фенол
46		3-Аміно-10Н-9-окса-2,4- діаза-фенантрен-10-ол

На першому етапі проведення даного дослідження було оцінено цитотоксичність нових інгібіторів на клітинах НЕр-2 з використанням МТТ та клоногенного тестів. МТТ-тест дозволяє визначити метаболічну активність клітин під дією досліджуваних сполук, тоді як клоногенний метод – кількісно оцінити здатність клітин до проліферації і колонієутворення після обробки. Сукупні результати цих тестів дають змогу зробити висновки про цитотоксичність нових інгібіторів *in vitro*. Стандартний інгібітор O⁶-BG не проявляв значної цитотоксичності при концентрації 10 мкМ, порівняно з інтактним контролем, що також підтверджується літературними даними [134]. Встановлено, що всі досліджувані сполуки не демонструють значної

цитотоксичності порівняно з O⁶-BG у концентрації 10 мкМ. Винятком став інгібітор 46, який виявив незначну цитотоксичність за результатами МТТ-тесту, що стало підставою для його виключення з подальших експериментів.

На другому етапі ефективність досліджуваних сполук як специфічних інгібіторів MGMT оцінювали за допомогою клоногенного тесту на клітинах пухлинної лінії HEP-2. Встановлено, що інгібітори 41, 41B та 89 підсилюють цитотоксичний ефект алкілувальної сполуки MNNG, навіть при її низьких концентраціях (до 0,005 мкг/мл). Найвищу активність продемонстрував інгібітор 41B. За результатами вестерн-блот аналізу, найбільше зниження рівня MGMT у клітинах HEP-2 спостерігалось після їхньої обробки інгібітором 41B у комбінації з метилувальним агентом. Отже, інгібітор 41B проявив найвищі інгібувальні властивості серед досліджуваних сполук та є найефективнішим в пухлинних клітинах людини лінії HEP-2. Виявлена кореляція між ефективністю інгібітора в клоногенному тесті та зниженням рівня MGMT у ракових клітинах відповідає літературним даним щодо стандартного інгібітора O⁶-BG. Наприклад, у дослідженнях на лініях клітин гліоми встановлено, що комбінація O⁶-BG з TMZ призводить до значного підвищення цитотоксичності алкілувальної сполуки, а також зниження рівня білка MGMT у клітинах [62, 135, 136].

На цьому ж етапі дослідження було проведено аналіз інгібувальних властивостей сполук *in vitro* стосовно репаративного ензиму MGMT. Вестерн-блот аналіз дозволив оцінити відносний вміст білка MGMT в клітинах після обробки досліджуваними сполуками, що дало додаткову інформацію про інгібувальні властивості цих сполук. Як було зазначено раніше, фермент MGMT є «суїцидальним» білком, тобто зі зменшенням даного ферменту в клітині, можна судити про силу інгібувальних властивостей [133]. Досліджувані сполуки дійсно продемонстрували здатність інгібувати MGMT,

оскільки після їхнього застосування в обох клітинних лініях спостерігалось зниження рівня білка MGMT порівняно з контролем. Крім того, було виявлено синергічний ефект при комбінованому застосуванні інгібіторів та алкілувальної сполуки MNNG, що призвело до значного зниження рівня MGMT у клітинах Нер-2. У досліджах на клітинах гліомної лінії T98G було встановлено, що нові інгібітори виявляють максимальну інгібувальну активність протягом першої доби, після чого вона значно знижується, на відміну від стандартного інгібітора O⁶-BG, який діє протягом трьох діб.

Таким чином, нові інгібітори 41, 41B, 89 та 72 проявляють інгібувальні властивості, знижуючи рівень білка майже вдвічі порівняно з інтактним контролем, однак вони діють більш м'яко порівняно зі стандартним інгібітором. Крім того, нові інгібітори мають коротший термін дії (одна доба), ніж O⁶-BG. Ймовірно, це пов'язано з відмінністю їхньої хімічної природи, оскільки ці інгібітори є ненуклеозидними та можуть мати інший механізм дії на фермент. Крім того, важливо, що досліджувані сполуки проявили низьку цитотоксичність в попередніх тестах. На відміну від нуклеозидних інгібіторів, таких як O⁶-BG та його похідні, ці сполуки не інтегруються в ДНК, що потенційно зменшує нецільові ефекти та токсичність [136]. Передбачається, що ці інгібітори виявляють меншу цитотоксичність щодо гемопоетичних клітин порівняно з їхніми нуклеозидними аналогами, що потребує подальшого вивчення.

На третьому етапі дослідження було проведено аналіз впливу нових інгібіторів MGMT на аутофагію та життєздатність клітин, які характеризувалися різним рівнем експресії гену MGMT. Для дослідження були використані клітини гліомних ліній T98G та U251MG. Лінія T98G відзначається високим рівнем експресії MGMT, що зумовлює її підвищену стійкість до алкілувальних агентів у процесі хіміотерапії [101, 137]. У свою

чергу, клітини лінії U251MG мають низький рівень експресії MGMT або експресія взагалі не виявляється, що підвищує їхню чутливість до таких препаратів [103, 138]. У нашому дослідженні ці спостереження були підтверджені: алкілувальний агент MNNG спричиняв посилення аутофагії в клітинах U251MG, тоді як у клітинах T98G цей процес спостерігався лише при застосуванні максимальної концентрації MNNG (0,5 мкг/мл). Відомо, що рівень експресії MGMT значною мірою визначає ефективність алкілувальних препаратів у хіміотерапії. Отже, дослідження впливу нових інгібіторів на клітини з різним статусом MGMT під час комбінованої терапії є надзвичайно важливим завданням. Крім того, розуміння механізмів аутофагії в цих клітинних лініях може сприяти розробці більш ефективних терапевтичних стратегій [81, 139].

Згідно результатів флуоресцентної спектрофотометрії та мікроскопії було встановлено, що нові інгібітори, які досліджували в даному експерименті (41 та 41B), при самотійному застосуванні не впливали на рівень аутофагії в клітинах обох ліній, порівняно з інтактним контролем. Це свідчить на користь їхньої низької токсичності, адже, аутофагія, як відомо, є реакцією на внутрішньоклітинні пошкодження, а також є ознакою деструктивних процесів у клітині [75, 77, 85]. Нові інгібітори також не змінювали співвідношення живих і мертвих клітин, порівняно з інтактним контролем, що підтверджує їхню безпечність.

Проте комбінована обробка суттєво змінила картину. У клітинах лінії T98G було зафіксовано значне підвищення рівня аутофагії, що супроводжувалося зростанням рівня летальності клітин, на відміну від клітин U251MG. Ці результати виявилися несподіваними, оскільки очікувалась протилежна реакція. Імовірно, захист клітин T98G від алкілувальних пошкоджень було порушено через інгібування репаративного ферменту

MGMT, що призвело до підвищеної аутофагії і летальності. У той же час клітини лінії U251MG, ймовірно, мають інші механізми захисту, які активізуються під час комбінованого лікування, та можуть бути незалежними від MGMT.

На завершальному етапі дослідження було проведено оцінку терапевтичного впливу нових інгібіторів на моделі *in vivo*. На цьому етапі використовували інгібітори 41, 41B та 89, які продемонстрували найкращі властивості на попередніх стадіях дослідження. Спочатку нами була створена *in vivo* модель на лабораторних мишах лінії ICR зі спонтанними пухлинами молочної залози. Було проведено вимірювання динаміки росту інтактних пухлин молочної залози мишей, а також зафіксовано сповільнення темпів росту пухлин під дією алкілувальної сполуки MNNG, що підтверджує придатність нашої моделі для дослідження впливу нових інгібіторів на ефективність алкілувальної терапії в модельній системі.

В цьому дослідженні показано, що під впливом усіх трьох інгібіторів спостерігалось сповільнення росту пухлин, а в деяких випадках навіть повна регресія під час комбінованої терапії. Найвищу частоту регресії пухлин (5 з 6 випадків) було зафіксовано під дією інгібітора 89. Інгібітор 41B продемонстрував найменший ефект, тоді як інгібітор 41 мав середній, проте ці результати також можна вважати позитивними, оскільки в окремих випадках відзначалася регресія пухлин. За даними вестерн-блот аналізу, інгібітор 41 сприяв стійкому зниженню рівня MGMT у всіх зразках під час комбінованої терапії з MNNG, тоді як інгібітори 89 і 41B ефективно знижували рівень MGMT лише в пухлинах невеликого розміру. Варто також зазначити побічні ефекти, зафіксовані під час комбінованої терапії, зокрема, некроз прилеглих тканин при застосуванні інгібітора 41B та зміни морфології селезінки при

застосуванні інгібітора 41. Таким чином, в даному дослідженні інгібітор 89 продемонстрував найкращий терапевтичний ефект.

За літературними даними аналогічні дослідження проводились зі стандартним інгібітором O⁶-BG. В експерименті, де O⁶-BG використовувався в поєднанні з BCNU, відсоток регресії пухлин був нижчим у порівнянні з терапією лише алкілувальним агентом BCNU. У деяких повтореннях експерименту комбінація призводила до майже 50% регресії, що означає зменшення розміру пухлин у половини пацієнтів при лікуванні комбінованою терапією [140]. Порівнюючи отримані нами результати *in vivo* з літературними даними [62, 64, 65, 140] , можна зробити висновок, що досліджувані інгібітори, особливо інгібітор 89, демонструють вищу ефективність, що робить їх перспективними кандидатами для подальших досліджень у клінічних випробуваннях.

Додатково на заключному етапі було проведено пілотне дослідження ймовірних механізмів регресії пухлин під дією комбінованої терапії з використанням інгібітору 41. Було встановлено, що регресія пухлин відбувається апототичним шляхом, оскільки в зразках злоякісних тканин після комбінованої обробки були виявлені активні форми каспази 3. Це підтверджує, що інгібування MGMT під час алкілувальної хіміотерапії, ймовірно, ініціює апоптоз в пухлинних клітинах [141-143].

У ході багатоступеневого дослідження нові інгібітори MGMT продемонстрували певну варіабельність властивостей в різних експериментах. Деякі інгібітори були виключені з подальшого аналізу через виявлення менш сприятливих характеристик. Зокрема, в даній роботі потенційний інгібітор 46 було вилучено після першого етапу дослідження через порівняно підвищену, хоча й невелику цитотоксичність, порівняно зі стандартним інгібітором O⁶-

BG. А потенційний Інгібітор 72 був відсіяний після другого етапу через відсутність інгібувальної активності у клоногенному тесті (табл. 5.2)

Таблиця 5.2

Оцінка властивостей нових інгібіторів MGMT в експериментах даного дослідження

Інгібітор	In vitro					In vivo	
	Низька цитотоксичність	Інгібувальні властивості	Ефективність	Аутофагія+ летальність	Регресія пухлин	Інгібування MGMT в пухлині	
	МТТ- тест	Клоногенний тест	Вестерн- блот	Клоногенний тест	Флуор. спектрос. і мікроскоп.	Вимір. Динаміки росту	Вестерн- блот
41	+	++	+	+	+	+	++
41B	+	+	++	++	+	+	+
72	+	+	+	-	не тестували	не тестували	не тестували
89	+	+	+	+	не тестували	++	+
46	-	+	не тестували	не тестували	не тестували	не тестували	не тестували

++ найкращий результат, + хороший результат, - поганий/гірший за інші результати

Інгібітори 41 та 41В протягом всього дослідження найчастіше демонстрували найкращі результати в різних експериментальних умовах. Однак на завершальному етапі досліджень на моделі *in vivo*, що має ключове значення для оцінки впливу нових інгібіторів на організм, інгібітор 89 проявив найбільшу терапевтичну ефективність порівняно з іншими досліджуваними інгібіторами. Крім того, під впливом інгібітора 89 під час комбінованої терапії на модельних мишах не було виявлено суттєвих негативних ефектів, на відміну від інгібіторів 41 та 41В.

Отримані результати відкривають нові перспективи в розробці ефективних стратегій лікування онкологічних захворювань, зокрема шляхом подолання хіміорезистентності, що пов'язана з підвищеною активністю MGMT у пухлинних клітинах. Розробка та впровадження нових ненуклеозидних інгібіторів MGMT, таких як інгібітори 41, 41В та 89, мають значний потенціал для покращення терапевтичних результатів у пацієнтів з різними типами раку, для лікування яких алкілувальні агенти є стандартом хіміотерапії.

Нові ненуклеозидні інгібітори MGMT продемонстрували низьку цитотоксичність, що є важливим фактором для зниження ризику побічних ефектів, характерних для нуклеозидних інгібіторів, особливо в умовах тривалої терапії. Виявлена здатність цих інгібіторів підсилювати цитотоксичний ефект алкілувальних агентів при комбінованій терапії з низькими дозами хіміопрепаратів може дозволити зменшити дозування токсичних агентів, що, своєю чергою, знижує негативний вплив на здорові клітини та органи пацієнтів.

З огляду на різний рівень експресії MGMT у пухлинних тканинах, застосування інгібіторів MGMT може сприяти розробці персоналізованих терапевтичних схем, що дає змогу адаптувати лікування до індивідуальних

характеристик пухлини кожного пацієнта, підвищуючи тим самим ефективність терапії та покращуючи прогноз. Отримані результати також слугують важливою основою для подальших досліджень, спрямованих на глибше розуміння механізмів дії нових інгібіторів MGMT, вивчення їхньої взаємодії з іншими хіміотерапевтичними агентами, а також аналіз їхнього впливу на ключові клітинні процеси, такі як апоптоз та аутофагія.

ВИСНОВКИ

Основним здобутком дисертації є виявлення та дослідження нових ненуклеозидних інгібіторів репаративного ферменту MGMT. За сумарними результатами досліджень зроблено висновок, що одним із найважливіших механізмів впливу нових інгібіторів на ефективність хіміотерапії алкілувальною сполукою MNNG є інгібування білка MGMT та зниження його кількості в пухлинних клітинах. Як наслідок, ймовірно, це призводить до незворотних пошкоджень геному клітин ссавців і до запуску процесів аутофагії та/або апоптозу. Отримані дані можуть мати значення для подальшої оптимізації схем алкілувальної хіміотерапії онкозахворювань.

1. З використанням культуральних методів встановлено, що декілька потенційних ненуклеозидних інгібіторів MGMT у концентрації 10 мкМ не проявляють значної цитотоксичності 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 (0,5, 0,05, 0,005 та 0,0005 мкг/мл) на відміну від дії O⁶-BG спільно з MNNG, де виражений 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 нами 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 мишей 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.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abbotts, R., Golato, T., & Wilson, D. M. (2018). Role of DNA Repair in Carcinogenesis and Cancer Therapeutics. Reference Module in Biomedical Sciences. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.65170-x>
2. Christmann, M., Verbeek, B., Roos, W. P., & Kaina, B. (2011). O6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: Enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1816(2), 179–190.
3. Pegg, A. E. (2011). Multifaceted Roles of Alkyltransferase and Related Proteins in DNA Repair, DNA Damage, Resistance to Chemotherapy, and Research Tools. *Chem. Res. Toxicol.*, 24, 618–639.
4. Peng, Y., & Pei, H. (2021). DNA alkylation lesion repair: outcomes and implications in cancer chemotherapy. *J Zhejiang Univ Sci B*, 22(1), 47-62.
5. Jiricny, J. (2006). The multifaceted mismatch-repair system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(5), 335-346.
6. Li, G. M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*, 18(1), 85-98.
7. Kunkel, T. A., & Erie, D. A. (2005). DNA mismatch repair. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 681-710.
8. Fang, Q. (2024). The Versatile Attributes of MGMT: Its Repair Mechanism, Crosstalk with Other DNA Repair Pathways, and Its Role in Cancer. *Cancers*, 16(2), 331.
9. Timinskas, A., Butkus, V., & Janulaitis, A. (1995). Sequence motifs characteristic for DNA [cytosine-N4] and DNA [adenine-N6]

- methyltransferases. Classification of all DNA methyltransferases. *Gene*, 157(1–2), 3–11.
10. Sharma, S., Kaur, G., Kaur, R., & Kaur, R. (2009). Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment, and prognosis. *Anticancer Research*, 29(10), 3759–3768.
 11. Kuo, C.-C., Liu, J.-F., Shiah, H.-S., Ma, L.-C., & Chang, J.-Y. (2007). Tamoxifen accelerates proteasomal degradation of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer cells. *International Journal of Cancer*, 121(10), 2293–2300.
 12. Murawska, Gosia & Vogel, Caspar & Jan, Max & Lu, Xinyan & Schild, Matthias & Slabicki, Mikolaj & Zou, Charles & Zhanybekova, Saule & Manojkumar, Manisha & Petzold, Georg & Kaiser, Peter & Thomä, Nicolas & Ebert, Benjamin & Gillingham, Dennis. (2022). Repurposing the Damage Repair Protein Methyl Guanine Methyl Transferase as a Ligand Inducible Fusion Degron. *ACS Chemical Biology*, 17(1), 24–31.
 13. Gupta, M.K., Kushwah, A.S., Singh, R., & Sharma, S. (2023). Genetic and epigenetic alterations in MGMT gene and correlation with concomitant chemoradiotherapy (CRT) in cervical cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 149(1), 15159–15170.
 14. Isowa, G., Ishizaki, K., Sadamoto, T., Tanaka, K., Yamaoka, Y., Ozawa, K., & Ikenaga, M. (1991). O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in human liver tumors. *Carcinogenesis*, 12(7), 1313–1317.
 15. Citron, M., Decker, R., Chen, S., Schneider, S., Graver, M., Kleynerman, L., Kahn, L.B., White, A., Schoenhaus, M., & Yarosh, D. (1991). O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human normal and tumor tissue from brain, lung, and ovary. *Cancer Research*, 51(15), 4131–4134.
 16. Zhang, L., Zeng, J., Zeng, Z., Wang, F., Wang, D., Chen, C., Li, C., An, X., Xu, R., Huang, P., Ba, Y., & Li, Y. (2016). MGMT in colorectal cancer: a

- promising component of personalized treatment. *Tumour Biol.*, 37(8), 11443-56.
17. Ralhan, R., & Kaur, J. (2007). Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 17(9), 1061–1075.
 18. Colvin, M. (2003). Alkylating Agents. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine* (6th ed.). BC Decker, Hamilton (ON).
 19. Chiorcea-Paquim, A. M., & Oliveira-Brett, A. M. (2023). Electrochemistry of chemotherapeutic alkylating agents and their interaction with DNA. *J Pharm Biomed Anal*, 222, 115036.
 20. Chen, Y., Jia, Y., Song, W., & Zhang, L. (2018). Therapeutic Potential of Nitrogen Mustard Based Hybrid Molecules. *Front Pharmacol*, 9, 1453.
 21. Nicolle, A., Proctor, S. J., & Summerfield, G. P. (2004). High dose chlorambucil in the treatment of lymphoid malignancies. *Leuk. Lymphoma*, 45, 271–275.
 22. Hughes, E., Scurr, M., Campbell, E., Jones, E., Godkin, A., & Gallimore, A. (2018). T-cell modulation by cyclophosphamide for tumour therapy. *Immunology*, 154, 62–68.
 23. Uhm, J. H., & Yung, W. K. A. (1999). Neurologic complications of cancer therapy. *Current Treatment Options in Neurology*, 1(5), 428–437.
 24. Fazeny-Dörner, B., Veitl, M., Wenzel, C., Piribauer, M., Rössler, K., Dieckmann, K., Ungersböck, K., & Marosi, C. (2003). Second-line chemotherapy with dacarbazine and fotemustine in nitrosourea-pretreated patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Anti-cancer drugs*, 14(6), 437–442.
 25. Jackson, J. S., & Harris, L. J. (2024). Nitrosoureas Toxicity. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

26. Jungk, C., Chatziaslanidou, D., Ahmadi, R., Capper, D., Lorenzo Bermejo, J., Exner, J., von Deimling, A., Herold-Mende, C., & Unterberg, A. (2016). Chemotherapy with BCNU in recurrent glioma: Analysis of clinical outcome and side effects in chemotherapy-naïve patients. *BMC Cancer*, 16(1), 81.
27. Swiderski, Ł., Łaźny, R., Sienkiewicz, M., Kalinowska, M., Świsłocka, R., Acar, A. O., Golonko, A., Matejczyk, M., & Lewandowski, W. (2021). Synthesis, Spectroscopic, and Theoretical Study of Copper and Cobalt Complexes with Dacarbazine. *Materials*, 14(12), 3274.
28. Zhang, J., Stevens, M. F., & Bradshaw, T. D. (2012). Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol*, 5(1), 102-114.
29. Bae, S. H., Park, M. J., Lee, M. M., Kim, T. M., Lee, S. H., Cho, S. Y., Kim, Y. H., Kim, Y. J., Park, C. K., & Kim, C. Y. (2014). Toxicity profile of temozolomide in the treatment of 300 malignant glioma patients in Korea. *J Korean Med Sci*, 29(7), 980-984.
30. Chan, R. I. M., San, R. H., & Stich, H. F. (1986). Mechanism of inhibition of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mutagenesis by phenolic compounds. *Cancer Letters*, 31, 27-34.
31. Yang, P., Yang, H., Zhou, H., Li, Q., Wei, S., Wang, Q., Yan, Y., Liu, Y., & Pan, H. (2022). Weipiling decoction alleviates N-methyl-N-nitro-N'-nitrosoguanidine-induced gastric precancerous lesions via NF-κB signalling pathway inhibition. *Chinese Medicine*, 17, 104.
32. Latypov, V. F., Tubbs, J. L., Watson, A. J., Marriott, A. S., McGown, G., Thorncroft, M., Wilkinson, O. J., Senthong, P., Butt, A., Arvai, A. S., Millington, C. L., Povey, A. C., Williams, D. M., Santibanez-Koref, M. F., Tainer, J. A., & Margison, G. P. (2012). At11 regulates choice between global genome and transcription-coupled repair of O(6)-alkylguanines. *Mol Cell*, 47(1), 50-60.

33. Zheng, H. C. (2017). The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget*, 8(35), 59950-59964.
34. Yu, W., Zhang, L., Wei, Q., & Shao, A. (2020). O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT): Challenges and New Opportunities in Glioma Chemotherapy. *Front Oncol*, 9, 1547.
35. Kaina, B., Margison, G. P., & Christmann, M. (2010). Targeting O6-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(21), 3663–3681.
36. Verbeek, B., Southgate, T. D., Gilham, D. E., & Margison, G. P. (2008). O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy. *British Medical Bulletin*, 85(1), 17–33.
37. Ortiz, R., Perazzoli, G., Cabeza, L., Jiménez-Luna, C., Luque, R., Prados, J., & Melguizo, C. (2021). Temozolomide: An updated overview of resistance mechanisms, nanotechnology advances and clinical applications. *Current Neuropharmacology*, 19(4), 513-537.
38. Gibson, D., Vo, A. H., Lambing, H., Ravi, A., Rodriguez, E., Chang, S., Oberheim Bush, N., Taylor, J., Clarke, J., Solomon, D., Scheffler, A., Witte, J., Okada, H., Berger, M., Chehab, F., & Butowski, N. A. (2024). A systematic review of high impact CpG sites and regions for MGMT methylation in glioblastoma. *BMC Neurology*, 24(1), 103.
39. Haque, W., Teh, C., Butler, E. B., & Pugh, S. L. (2022). Prognostic and predictive impact of MGMT promoter methylation status in high-risk grade II glioma. *Journal of Neuro-Oncology*, 157(1), 137–146.
40. Kuo, C.-C., Liu, J.-F., & Chang, J.-Y. (2006). DNA repair enzyme, O6-methylguanine DNA methyltransferase, modulates cytotoxicity of camptothecin-derived topoisomerase I inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther*, 316(2), 946-954.

41. Srivenugopal, K. S., Mullapudi, R. S., Shou, J., Hazra, T. K., & Ali-Osman, F. (2000). Protein Phosphorylation Is a Regulatory Mechanism for O6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase in Human Brain Tumor Cells. *Cancer Res*, 60, 282-287.
42. Beausoleil, S. A., Jedrychowski, M., Schwartz, D., Elias, J. E., Villén, J., Li, J., Cohn, M. A., Cantley, L. C., & Gygi, S. P. (2004). Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(33), 12130–12135.
43. Schilsky, R. L., Dolan, M. E., Bertucci, D., Ewesuedo, R. B., Vogelzang, N. J., Mani, S., Wilson, L. R., & Ratain, M. J. (2000). Phase I clinical and pharmacological study of O6-benzylguanine followed by carmustine in patients with advanced cancer. *Clinical Cancer Research*, 6(8), 3025–3031.
44. Daniels, D. S., Mol, C. D., Arvai, A. S., Kanugula, S., Pegg, A. E., & Tainer, J. A. (2000). Active and alkylated human AGT structures: a novel zinc site, inhibitor and extrahelical binding. *The EMBO Journal*, 19(7), 1719-1730.
45. Friedman, H. S., Pluda, J., Quinn, J. A., Ewesuedo, R. B., Long, L., Friedman, A. H., Zhao, X. F., Oakes, W. J., Houghton, P. J., McLendon, R. E., Provenzale, J. M., Stewart, E. S., Colvin, O. M., & Haglund, M. M. (2000). Phase I Trial of Carmustine Plus O6-Benzylguanine for Patients With Recurrent or Progressive Malignant Glioma. *Journal of Clinical Oncology*, 18(21), 3522-3528.
46. Gajewski, T. F., Sosman, J., Peterson, A. C., Gerson, S., & Dolan, M. E. (2004). Phase II trial of O6-benzylguanine (O6-BG) and BCNU in patients with advanced melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 22(14), 7524.
47. Neville, K., Blaney, S., Bernstein, M., Thompson, P., Adams, D., Aleksic, A., & Berg, S. (2004). Pharmacokinetics of O6-benzylguanine in Pediatric Patients with Central Nervous System Tumors: A Pediatric Oncology Group Study. *Clinical Cancer Research*, 10(15), 5072–5075.

48. Watson, A. J., Sabharwal, A., Thorncroft, M., McGown, G., Kerr, R., Bojanic, S., Soonawalla, Z., King, A., Miller, A., Waller, S., Leung, H., Margison, G. P., & Middleton, M. R. (2010). Tumor O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase inactivation by oral lomeguatrib. *Clinical Cancer Research*, 16(2), 743–749.
49. Ranson, M., Middleton, M. R., Bridgewater, J., Lee, S. M., Dawson, M., Jowle, D., & Sabharwal, A. (2006). Lomeguatrib, a potent inhibitor of O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase: Phase I safety, pharmacodynamic, and pharmacokinetic trial and evaluation in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 12(5), 1577–1584.
50. Furgason, J. M., & Bahassi, E. M. (2013). Targeting DNA repair mechanisms in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 137(3), 298-308.
51. Muhlhausen, U., Schmitt, J., Schmitt, S., & Kaina, B. (2006). Synthesis of ¹³¹I-labeled glucose-conjugated inhibitors of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and comparison with nonconjugated inhibitors as potential tools for in vivo MGMT imaging. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(1), 263-272.
52. Calvaresi, E. C., & Hergenrother, P. J. (2013). Glucose conjugation for the specific targeting and treatment of cancer. *Chem Sci*, 4(6), 2319–2333.
53. Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2017). The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 36(3), 529-544.
54. Kaina, B., Mühlhausen, U., Piée-Stoffels, A., Christmann, M., Garcia Boy, R., Rösch, F., & Schirmacher, R. (2004). Inhibition of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by glucose-conjugated inhibitors: Comparison with nonconjugated inhibitors and effect on fotemustine and temozolomide-

- induced cell death. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311(2), 585-593.
55. Tomaszowski, K. H., Schirmacher, R., & Kaina, B. (2015). Multidrug efflux pumps attenuate the effect of MGMT inhibitors. *Molecular Pharmaceutics*, 12(11), 3924–3934.
 56. Tomaszowski, K. H., Hellmann, N., Ponath, V., Takatsu, H., Shin, H. W., & Kaina, B. (2017). Uptake of glucose-conjugated MGMT inhibitors in cancer cells: Role of flippases and type IV P-type ATPases. *Scientific Reports*, 7, 13925.
 57. Marsoner, T., Schmidt, O. P., & Triemer, T., & Luedtke, N. W. (2017). DNA-targeted inhibition of MGMT. *ChemBioChem*, 18(10), 894-898.
 58. Quinn, J. A., Desjardins, A., Weingart, J., Brem, H., & Geyer, J. R. (2005). Phase I trial of temozolomide plus O6-benzylguanine for patients with recurrent or progressive malignant glioma. *Journal of Clinical Oncology*, 23(30), 7178-7187.
 59. Warren, K. E., Aikin, A. A., Libucha, M., Widemann, B. C., Fox, E., Packer, R. J., Balis, F. M., & Cohen, K. J. (2005). Phase I study of O6-benzylguanine and temozolomide administered daily for 5 days to pediatric patients with solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 23(34), 7646-7653.
 60. Sloan, A. E., Reese, J., Rogers, L. R., Lo, S. S., & Geyer, J. R. (2012). O6-benzylguanine (BG) and temozolomide (TMZ) therapy of glioblastoma multiforme (GBM) with infusion of autologous lentiviral transduced P140KMGMT+ hematopoietic progenitors to protect hematopoiesis: A phase I study. *Journal of Clinical Oncology*, 30(15), TPS1616.
 61. Quinn, J. A., Jiang, S. X., Reardon, D. A., Desjardins, A., Vredenburgh, J. J., Rich, J. N., Gururangan, S., Friedman, A. H., Bigner, D. D., Sampson, J. H., & McLendon, R. E. (2009). Phase I trial of temozolomide plus O6-

- benzylguanine 5-day regimen with recurrent malignant glioma. *Neuro-Oncology*, 11(5), 556–561.
62. Quinn, J. A., Jiang, S. X., Reardon, D. A., Desjardins, A., Vredenburgh, J. J., Rich, J. N., Gururangan, S., Friedman, A. H., Bigner, D. D., Sampson, J. H., & McLendon, R. E. (2009). Phase II trial of temozolomide plus O6-benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma. *Journal of Clinical Oncology*, 27(8), 1262-1267.
 63. Apisarnthanarax, N., Wood, G. S., Stevens, S. R., Carlson, J. A., Chan, A., Szabo, S. K., Gilliam, A. C., Gerson, S. L., & Cooper, K. D. (2012). Phase I clinical trial of O6-benzylguanine and topical carmustine in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma, mycosis fungoides type. *Archives of Dermatology*, 148(5), 613-620.
 64. Gajewski, T. F., Sosman, J., Gerson, S. G., & Middleton, M. R. (2005). Phase II trial of the O6-alkylguanine DNA alkyltransferase inhibitor O6-benzylguanine and 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in advanced melanoma. *Clinical Cancer Research*, 11(21), 7861–7865.
 65. Batts, E. D., Maisel, C., Kane, D., & Gerson, S. L. (2007). O6-benzylguanine and BCNU in multiple myeloma: A phase II trial. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 60(3), 415–421.
 66. Kirstein, A., Schilling, D., Combs, S. E., & Schmid, T. E. (2021). Lomeguatrib Increases the Radiosensitivity of MGMT Unmethylated Human Glioblastoma Multiforme Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6781.
 67. Kefford, R., Thomas, N. P., Corrie, P. G., Palmer, C., Abdi, E., Kotasek, D., Beith, J., Ranson, M., Mortimer, P., Watson, A. J., Margison, G. P., & Middleton, M. R. (2009). A phase I study of extended dosing with lomeguatrib with temozolomide in patients with advanced melanoma. *British Journal of Cancer*, 100(8), 1245–1249.

68. Mansouri, A., Hachem, L. D., Mansouri, S., Nassiri, F., Laperriere, N. J., Xia, D., Lindeman, N. I., Wen, P. Y., Chakravarti, A., Mehta, M. P., Hegi, M. E., Stupp, R., Aldape, K. D., & Zadeh, G. (2019). MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro-Oncology*, 21(2), 167–178.
69. Butler, M., Pongor, L., Su, Y.-T., Xi, L., Raffeld, M., Quezado, M., Trepel, J., Aldape, K., Pommier, Y., & Wu, J. (2020). MGMT Status as a Clinical Biomarker in Glioblastoma. *Trends in Cancer*, 6(5), 380-391.
70. Kinslow, C. J., Rae, A. I., Taparra, K., Kumar, P., Siegelin, M. D., Grinband, J., & Gill, B. J. A. (2023). Association of MGMT promoter methylation with survival in low-grade and anaplastic gliomas after alkylating chemotherapy. *JAMA Oncology*, 9(7), 919-927.
71. Zappe, K., Pühringer, K., Pflug, S., Berger, D., Böhm, A., Spiegl-Kreinecker, S., & Cichna-Markl, M. (2023). Association between MGMT enhancer methylation and MGMT promoter methylation, MGMT protein expression, and overall survival in glioblastoma. *Cells*, 12(12), 1639.
72. Pandith, A. A., Qasim, I., Zahoor, W., Shah, P., Bhat, A. R., Sanadhya, D., Shah, Z. A., & Naikoo, N. A. (2018). Concordant association validates MGMT methylation and protein expression as favorable prognostic factors in glioma patients on alkylating chemotherapy (Temozolomide). *Scientific Reports*, 8(1), 6704.
73. Ali, A., Bamashmos, A. S., Barnett, A., Li, H., Wang, J., & Gerson, S. L. (2019). MGMT status through the ages, literally. *Journal of Clinical Oncology*, 37, e13550.
74. Mur, P., Rodríguez de Lope, Á., Díaz-Crespo, F. J., Hernández-Iglesias, T., Alonso, M. E., López-Cuesta, Á., Godino, J., García-Montero, J. C., Blanco, I., Hernández-San Miguel, E., Bujanda, L., Derdak, S., Barroso, A., Benítez,

- J., Espín, E., Valle, L., Esteller, M., & Urioste, M. (2015). Impact on prognosis of the regional distribution of MGMT methylation with respect to the CpG island methylator phenotype and age in glioma patients. *Journal of Neuro-Oncology*, 122(3), 441–450.
- 75.Das, S., Shukla, N., Singh, S. S., Kushwaha, S., & Shrivastava, R. (2021). Mechanism of interaction between autophagy and apoptosis in cancer. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 26 (9-10), 512–533.
- 76.Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.U., Kimchi, A. (2009). Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ*, 16, 966–975.
- 77.Yun, C.W., Lee, S.H. (2018). The roles of autophagy in cancer. *Int J Mol Science*, 19, 3466-3483.
- 78.Kenific, C.M., Thorburn, A., Debnath, J. (2010). Autophagy and metastasis: Another double-edged sword. *Curr. Opin. Cell Biology*, 22, 241–245.
- 79.Hamurcu, Z., Delibasi, N., Gecene, S., Sener, E.F., Donmez-Altuntas, H., Ozkul, Y., Canatan, H., Ozpolat, B. (2018). Targeting LC3 and Beclin-1 autophagy genes suppresses proliferation, survival, migration and invasion by inhibition of Cyclin-D1 and uPAR/Integrin beta1/Src signaling in triple negative breast cancer cells. *J. Cancer Res. Clinical Oncology*, 144, 415–430.
- 80.Vanharanta, S., Massague, J. (2013). Origins of metastatic traits. *Cancer Cell*, 24, 410–421.
- 81.Liu, J., Wu, Y., Meng, S., Wang, J., & Gerson, S. L. (2024). Selective autophagy in cancer: mechanisms, therapeutic implications, and future perspectives. *Molecular Cancer*, 23, 22.
- 82.Kanzawa, T., Germano, I. M., Komata, T., Ito, H., & Kondo, Y. (2004). Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death and Differentiation*, 11(4), 448–457.

83. Knizhnik, A. V., Roos, W. P., Nikolova, T., Quiros, S., Tomaszowski, K.-H., Christmann, M., & Kaina, B. (2013). Survival and death strategies in glioma cells: Autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. *PLoS ONE*, 8(1), e55665.
84. Su, M., Mei, Y., & Sinha, S. (2013). Role of the crosstalk between autophagy and apoptosis in cancer. *Journal of Oncology*, 2013, 1–14.
85. Mizushima, N., & Levine, B. (2020). Autophagy in human diseases. *The New England Journal of Medicine*, 383(16), 1564-1576.
86. Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Blomgren, K., & Kroemer, G. (2016). Autophagy in acute brain injury. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(8), 467-484.
87. Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., & Kroemer, G. (2014). Self-consumption: The interplay of autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(2), 81-94.
88. Green, D. R., & Llamby, F. (2015). Cell death signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(12), a006080.
89. Levine, A. J. (2020). p53: 50 years after its discovery. *Cell*, 181(1), 22-31.
90. Harris, S. L., & Levine, A. J. (2005). The p53 pathway: Positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24(17), 2899-2908.
91. Volynets, G. P., Ruban, T. P., Yatsyshina, A. P., Matsevich, L. L., Bdzhola, V. G., Yarmolyuk, S. M., & Lukash, L. L. (2018). RF Patent 127059. <https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=2.492.48>.
92. Volynets, G. P., Yatsyshina, A. P., Ruban, T. P., Matsevich, L. L., Nidoyeva, Z. M., Balanda, A. O., Bdzhola, V. G., Yarmolyuk, S. M., & Lukash, L. L. (2020). Ukraine Patent 122373. <https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=271905>.

93. Ahmed, H. (2004). Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization (1st ed.). Chapter 1: Extraction of protein. CRC Press, London, England. <https://doi.org/10.1201/9780203507438>
94. Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12827.
95. Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315–2319.
96. Bai, P., Fan, T., Sun, G., Wang, X., Zhao, L., & Zhong, R. (2023). The dual role of DNA repair protein MGMT in cancer prevention and treatment. *DNA Repair*, 123, 103449.
97. Gerson, S. (2004). MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, 4, 296–307.
98. Kotsarenko, K. V., Lylo, V. V., Macewicz, L. L., Dasyukevich, O. I., Poltoratskaya, L. V., & Burkovskaya, T. E. (2013). Changes in the MGMT Gene Expression under the Influence of Exogenous Cytokines in Human Cells In Vitro. *Cytology and Genetics*, 47(4), 202-209. <https://doi.org/10.3103/S0095452713040087>
99. Kotsarenko, K., Lylo, V., Ruban, T., Macewicz, L., & Lukash, L. (2018). Effects of Some Growth Factors and Cytokines on the Expression of the Repair Enzyme MGMT and Protein MARP in Human Cells In Vitro. *Biochemical Genetics*. doi:10.1007/s10528-018-9854-9
100. Huitema, A. D., Smits, K. D., Mathôt, R. A., Schellens, J. H., Rodenhuis, S., & Beijnen, J. H. (2000). The clinical pharmacology of alkylating agents in high-dose chemotherapy. *Anti-cancer drugs*, 11(7), 515–533.

101. Smalley, S., Chalmers, A.J. & Morley, S.J. (2014). mTOR inhibition and levels of the DNA repair protein MGMT in T98G glioblastoma cells. *Molecular Cancer*, 13, 144.
102. Friedman, H. S., Keir, S., Pegg, A. E., Houghton, P. J., Colvin, O. M., Moschel, R. C., Bigner, D. D., & Dolan, M. E. (2002). O6-Benzylguanine-mediated enhancement of chemotherapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(11), 943–948.
103. Rubner, Y., Muth, C., Strnad, A., Derer, A., Sieber, R., Buslei, R., Frey, B., Fietkau, R., & Gaipl, U. S. (2014). Fractionated radiotherapy is the main stimulus for the induction of cell death and of Hsp70 release of p53 mutated glioblastoma cell lines. *Radiation Oncology*, 9(1), 89.
104. Hyeon, K.K., Soo, Y.S., Jin, H.K., Hak, J.K., Eui, K.C., Seung-Ki, K., Il, H. K. (2019). Disulfiram, a Re-positioned Aldehyde Dehydrogenase Inhibitor, Enhances Radiosensitivity of Human Glioblastoma Cells In Vitro *Cancer Research of Treatment*, 51(2), 696-705.
105. Biederbick, A., Kern, H. F., & Elsässer, H. P. (1995). Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *European journal of cell biology*, 66(1), 3–14.
106. Vázquez, C. L., & Colombo, M. I. (2009). Assays to assess autophagy induction and fusion of autophagic vacuoles with a degradative compartment, using monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA. *Methods in enzymology*, 452, 85–95.
107. Sui, X., Chen, R., Wang, Z., Huang, Z., Kong, N., Zhang, M., Han, W., Lou, F., Yang, J., Zhang, Q., Wang, X., He, C., & Pan, H. (2013). Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell death & disease*, 4(10), e838.
108. Thompson, T.A. (1999). Viability Assays for Cells In Vitro: The Ethidium/Calcein Assay and the Immunofluorescence Combination Assay.

- In: Harry, J., Tilson, H.A. (eds) Neurodegeneration Methods and Protocols. Methods in Molecular Medicine, vol 22. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-612-X:145>
109. Xi, H., Wang, S., Wang, B., Hong, X., Liu, X., Li, M., Shen, R., & Dong, Q. (2022). The role of interaction between autophagy and apoptosis in tumorigenesis (Review). *Oncology Reports*, 48, 208.
 110. Kessel, D. H., Price, M., & Reiners, J. J., Jr. (2012). ATG7 deficiency suppresses apoptosis and cell death induced by lysosomal photodamage. *Autophagy*, 8(9), 1333–1341.
 111. Lin, T. Y., Chan, H. H., Chen, S. H., Sarvagalla, S., Chen, P. S., Coumar, M. S., Cheng, S. M., Chang, Y. C., Lin, C. H., Leung, E., & Cheung, C. H. A. (2020). BIRC5/Survivin is a novel ATG12-ATG5 conjugate interactor and an autophagy-induced DNA damage suppressor in human cancer and mouse embryonic fibroblast cells. *Autophagy*, 16(7), 1296–1313.
 112. Sareen, H., Ma, Y., Becker, T. M., Roberts, T. L., de Souza, P., & Powter, B. (2022). Molecular Biomarkers in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International journal of molecular sciences*, 23(16), 8835.
 113. Switzeny, O. J., Christmann, M., Renovanz, M., & Kaina, B. (2016). MGMT promoter methylation determined by HRM in comparison to MSP and pyrosequencing for predicting high-grade glioma response. *Clinical Epigenetics*, 8(1), 49.
 114. Chien, C. H., Hsueh, W. T., Chuang, J. Y., & Tsai, K. J. (2021). Dissecting the mechanism of temozolomide resistance and its association with the regulatory roles of intracellular reactive oxygen species in glioblastoma. *Journal of Biomedical Science*, 28(1), 18.

115. Shi, D. D., Anand, S., Abdullah, K. G., & Kessler, J. A. (2023). DNA damage in IDH-mutant gliomas: mechanisms and clinical implications. *Journal of Neuro-Oncology*, 162(3), 515–523.
116. Kim, J. E., Nam, J. H., Cho, J. Y., Kim, K. S., & Hwang, D. Y. (2017). Annual tendency of research papers used ICR mice as experimental animals in biomedical research fields. *Laboratory animal research*, 33(2), 171–178.
117. Association for the Study of Animal Behaviour (ASAB) "Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching". *Animal Behaviour* 61: 271-275.
118. University of Minnesota. (n.d.). Ethics and animal use in research. Research, Ethics & Compliance - IACUC Training & Education. Retrieved August 4, 2024, from <https://research.umn.edu/units/iacuc/training-education/ethics-animal-use-research>
119. University of Connecticut. (n.d.). Code of ethics for the care and use of animals. Office of the Vice President for Research. Retrieved August 4, 2024, from <https://ovpr.uchc.edu/services/rics/animal/iacuc/ethics-2/>
120. Lori, A., Perrotta, M., Lembo, G., & Carnevale, D. (2017). The spleen: A hub connecting nervous and immune systems in cardiovascular and metabolic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1216.
121. Gibson, N.W. (1989). Alkylating agents: Mechanisms and modulation. In: Muggia, F.M. (eds) *Cancer Chemotherapy: Concepts, Clinical Investigations and Therapeutic Advances*. Cancer Treatment and Research, vol 42. Springer, Boston, MA.
122. Clevers, H. (2006). Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell*, 127(3), 469-480.
123. Fodde, R., & Smits, R. (2002). APC Signal Transduction: Classic and Novel Roles in Tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1471(2), 377-411.

124. Li, J., & Yuan, J. (2008). Caspases in Apoptosis and Beyond. *Oncogene*, 27(48), 6194-6206.
125. McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), a008656.
126. Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F., & Youle, R. J. (2008). Parkin is Recruited Selectively to Impaired Mitochondria and Promotes Their Autophagy. *The Journal of Cell Biology*, 183(5), 795-803.
127. Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal*, 19(21), 5720-5728.
128. Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., & Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death and Differentiation*, 22(4), 526–539.
129. Riedl, S. J., & Salvesen, G. S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(5), 405–413.
130. Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., De Guevara, R. L., Cepero, E., & Boise, L. H. (2013). Caspase-9, caspase-3, and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biology*, 14, Article 32.
131. Boudreau, M. W., Peh, J., & Hergenrother, P. J. (2019). Procaspase-3 Overexpression in Cancer: A Paradoxical Observation with Therapeutic Potential. *ACS chemical biology*, 14(11), 2335–2348.
132. Schlein, L. J., Fadl-Alla, B., Pondenis, H. C., Lezmi, S., Eberhart, C. G., LeBlanc, A. K., Fan, T. M. (2019). Immunohistochemical Characterization of Procaspase-3 Overexpression as a Druggable Target With

- PAC-1, a Procaspase-3 Activator, in Canine and Human Brain Cancers. *Frontiers in Oncology*, 9.
133. Li, X., Yang, C., Luo, N., Yang, Y., Guo, Y., Chen, P., & Cun, B. (2022). Ubiquitination and degradation of MGMT by TRIM72 increases the sensitivity of uveal melanoma cells to Dacarbazine treatment. *Cancer Biomarkers*, 34(2), 275-284.
 134. Maki, Y., Murakami, J., Asaumi, J., Tsujigiwa, H., Nagatsuka, H., Koikeguchi, S., Fukui, K., Kawai, N., Yanagi, Y., Kuroda, M., Tanaka, N., Matsubara, N., & Kishi, K. (2005). Role of O6-methylguanine–DNA methyltransferase and effect of O6-benzylguanine on the anti-tumor activity of cis-diaminedichloroplatinum(II) in oral cancer cell lines. *Oral Oncology*, 41(10), 984–993.
 135. Pan, Y., Liu, G., Zhou, F., Su, B., & Li, Y. (2017). DNA methylation profiles in cancer diagnosis and therapeutics. *Clinical and experimental medicine*, 18(1), 1-14.
 136. Cai, Y., Wu, M. H., Xu-Welliver, M., Pegg, A. E., Ludeman, S. M., & Dolan, M. E. (2000). Effect of O6-Benzylguanine on alkylating agent-induced toxicity and mutagenicity in Chinese hamster ovary cells expressing wild-type and mutant O6-alkylguanine-DNA alkyltransferases. *Cancer Research*, 60(19), 5464–5469.
 137. Bobola, M. S., Silber, J. R., Ellenbogen, R. G., Geyer, J. R., Blank, A., Goff, D., & Groudine, M. (2017). O6-Methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: Current trends and future directions. *Journal of Neuro-Oncology*, 134(3), 541–551.
 138. Hermisson, M., Klumpp, A., Wick, W., Wischhusen, J., Nagel, G., Roos, W., Kaina, B., Dichgans, J., & Weller, M. (2003). O6-Methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) in human glioma cells: Modulation by

- alkylating agents and methylation status. *Journal of Neurochemistry*, 85(1), 51–60.
139. Amaravadi, R. K., Kimmelman, A. C., & White, E. (2019). Targeting autophagy in cancer: Recent advances and future directions. *Cancer Discovery*, 9(9), 1167–1181.
 140. Friedman, H. S., Keir, S., Pegg, A. E., Houghton, P. J., Colvin, O. M., Moschel, R. C., Bigner, D. D., & Dolan, M. E. (2002). O6-benzylguanine-mediated enhancement of chemotherapy. *Molecular cancer therapeutics*, 1(11), 943–948.
 141. Konduri, S. D., Ticku, J., Bobustuc, G. C., Sutphin, R. M., Colon, J., Isley, B., Bhakat, K. K., Srivenugopal, K. S., & Baker, C. H. (2009). Blockade of MGMT expression by O6 benzyl guanine leads to inhibition of pancreatic cancer growth and induction of apoptosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(19), 6087–6095.
 142. Hindle, A., Koneru, B., Makena, M. R., Lopez-Barcons, L., Chen, W. H., Nguyen, T. H., & Reynolds, C. P. (2021). The O6-methylguanine-DNA methyltransferase inhibitor O6-benzylguanine enhanced activity of temozolomide + irinotecan against models of high-risk neuroblastoma. *Anti-cancer drugs*, 32(3), 233–247.
 143. Trevisan, F. A., Rodrigues, A. R., Lizarte Neto, F. S., Peria, F. M., Cirino, M. L. A., Tirapelli, D. P. D. C., & Carlotti Júnior, C. G. (2020). Apoptosis related microRNAs and MGMT in glioblastoma cell lines submitted to treatments with ionizing radiation and temozolomide. *Reports of practical oncology and radiotherapy: journal of Great Poland Cancer Center in Poznan and Polish Society of Radiation Oncology*, 25(5), 714–719.

ДОДАТОК А

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

Статті у наукових фахових виданнях:

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>
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>
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>

Тези наукових доповідей на конференціях:

4. **K. S. Zhuvaka**, A. P. Iatsyshyna, Z. M. Nidoeva, G. P. Volynets, T. P. Ruban, L. L. Macewicz, S. M. Yarmoluk, L. L. Lukash. Investigation of effectiveness of MGMT potential inhibitors in human cell culture. XV IMBG all-Ukrainian Conference of Young Scientists with international participation. *Biopolym. Cell*. 2021; 37(3):185-244. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A56> - очна участь.

5. **K. S. Zhuvaka**, L. L. Macewicz, O. O. Piven, G. P. Volynets, T. P. Ruban, S. M. Yarmoluk, L. L. Lukash. Impact of new MGMT inhibitors on autophagy in glioma cells in vitro at combined action with alkylating agent N-methyl-N'nitro-Nnitrosoguanidine. Conference of young scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics — 2023. The conference is dedicated to young scientists who defend Ukraine and those who gave their lives for our Motherland. Biopolym. Cell. 2023; 39(1):60-73. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A89> - очна участь.

6. **K. S. Zhuvaka**, O. O. Piven, L. L. Macewicz, G. P. Volynets, T. P. Ruban, S. M. Yarmoluk, L. L. Lukash. Comparison of new non-nucleoside MGMT inhibitors' effectiveness in HEp-2 and T98G cancer cells. The Conference of Young Scientists within the framework of XVIII International Conference «Factors in Experimental Evolution of Organisms», dedicated to the 50th anniversary of the foundation of the Institute of Molecular Biology and Genetics of the NASU. Biopolym. Cell. 2023; 39(4):311-322. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000AA8> - очна участь.

7. **K. S. Zhuvaka**, L. L. Macewicz, T. P. Ruban, G. P. Volynets, S. M. Yarmoluk, L. L. Lukash. The therapeutic effect of new non-nucleoside MGMT inhibitors during combined alkylating chemotherapy in vivo. The materials of the XVIII Ukrainian Conference of Young Scientists of IMBG of NAS of Ukraine. Biopolym. Cell. 2024; 40(2):153-168. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000AB8> - очна участь.

8. **K. S. Zhuvaka**, L. L. Macewicz, O. O. Piven, G. P. Volynets, T. P. Ruban, S. M. Yarmoluk, L. L. Lukash. Novel non-nucleoside MGMT inhibitors: potential in combined alkylating chemotherapy. BioGENext Conference: Shaping the future of medicine through biomedical research and development. Biopolym. Cell. 2024; 40(3):242. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000ADC> - очна участь.