

РЕЦЕНЗІЯ

офіційного рецензента – доктора хімічних наук, завідувача відділу
синтетичних біорегуляторів Інституту молекулярної біології і генетики
НАН України Дубея Ігоря Ярославовича

на дисертацію Жуваки Катерини Сергіївни
*«Дослідження нових ненуклеозидних інгібіторів MGMT при алкілувальній
хіміотерапії пухлинних клітин в модельних системах»*,

подану до захисту у разову спеціалізовану вчену раду в Інституті
молекулярної біології і генетики НАН України
на здобуття наукового ступеня доктора філософії
у галузі знань 09 – «Біологія» за спеціальністю 091 – «Біологія»

Актуальність теми дисертації

Дисертаційна робота К.С. Жуваки присвячена пошуку й дослідженню різних аспектів біологічної активності та механізму дії нових ненуклеозидних інгібіторів важливого фермента O⁶-метилгуанін-ДНК-метилтрансферази (MGMT) як потенційних протипухлинних засобів у комбінованій алкілувальній терапії.

Вибір теми дослідження добре обґрунтований, а її актуальність не викликає сумнівів. В цілому, вивчення інгібіторів ферментів є одним із пріоритетних напрямків медико-біологічних досліджень, що має як фундаментальне наукове, так і практичне значення. Об'єкт досліджень даної роботи – інгібітори фермента MGMT – безумовно важливий з обох цих поглядів. Загальновідомо, наскільки гострою та серйозною як в Україні, так і у світі в цілому є проблема онкологічних захворювань. До основних викликів онкології належать передусім недостатня специфічність (і, отже, значна токсичність) хіміотерапевтичних засобів і розвиток резистентності пухлин до ліків, зокрема, алкілувальних препаратів. Одним із ключових факторів резистентності пухлин у цьому випадку є активність і рівень експресії репаративного фермента MGMT, який суттєво знижує ефективність алкілувальних засобів шляхом видалення продуктів алкілювання ДНК. Тому оптимальним шляхом терапії є поєднання алкілувальних препаратів з інгібіторами MGMT. Відомі інгібітори, такі як O⁶-бензилгуанін та його похідні, виявляють значні побічні ефекти, особливо при тривалому застосуванні. Глікокон'югати інгібіторів, у свою чергу, більш пухлино-специфічні, та надто швидко виводяться з пухлинних клітин.

Все це робить пошук і всебічне дослідження нових інгібіторів MGMT, передусім відносно маловивчених сполук ненуклеозидної природи, важливим і актуальним завданням.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Робота виконана у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Вона відповідає основному плану НДР відділу та виконувалась у рамках бюджетної теми «Вплив нових інгібіторів репаративного

ензиму MGMT на ефективність алкілувальної терапії пухлин в модельних системах» (2019-2023 рр., № держреєстрації 0119U100158).

Загальна структура дисертації

Дисертація викладена на 143 сторінках і складається з анотації, вступу, 5 розділів, висновків і списку використаної літератури, що включає 143 посилання, а також додатку (список публікацій автора за темою дисертації). Робота містить 23 рисунки і 4 таблиці.

Аналіз основного змісту роботи

Перший розділ дисертації – літературний огляд, присвячений MGMT інгібіторам. Спочатку розглянуто структуру та функції фермента, механізм його дії та терапевтичну важливість. Представлено дані щодо хіміотерапії пухлин з використанням алкілувальних препаратів. Розглянуто інгібітори MGMT різних класів та з різними механізмами дії. Значну увагу присвячено їх застосуванню в комбінованій терапії пухлин. У вадливому підрозділі 1.5 розглянуто аутофагію та апоптоз як загальні стратегії в лікуванні раку. Огляд літератури актуальний, добре організований і справляє позитивне враження та свідчить про хороше володіння автором темою свого дослідження.

В наступних розділах представлено результати власних досліджень автора.

У **другому розділі** «Матеріали і методи» описано основні експериментальні підходи, що використовувались у дослідженнях. Наведено детальні протоколи різних варіантів аналізу цитотоксичності сполук у тест-системах, методики дослідження інгібіторів *in vivo*, молекулярно-біологічні та молекулярно-генетичні методи. В цьому ж розділі описано флуоресцентні методи досліджень, у т.ч. флуоресцентну мікроскопію, а також використані в роботі методи статистичної обробки експериментальних даних.

Третій розділ роботи присвячений комплексному дослідженню впливу інгібіторів MGMT на пухлинні клітини в системах *in vitro* (*in cellulo*). Проведено аналіз цитотоксичності серії відібраних при первинному скринінгу інгібіторів та порівняння їх ефективності. Детально вивчено рівень інгібувальної активності досліджуваних сполук. Зокрема, вивчено вплив препаратів на пухлинні клітини з різним рівнем експресії гена *MGMT*. В цьому розділі представлено також дані щодо впливу інгібіторів на аутофагію та летальність пухлинних клітин, отримані з використанням флуоресцентної мікроскопії. Важливим результатом є те, що нові інгібітори в концентрації 10 мкМ практично не впливають на виживаність пухлинних клітин та рівень аутофагії в клітинах, проте роблять їх чутливішими до алкілувальних сполук. Отже, досліджувані інгібітори можуть мати терапевтичний ефект при комбінованій алкілувальній хіміотерапії пухлин, які відзначаються високим рівнем експресії *MGMT*.

Логічним продовженням є **четвертий розділ** роботи, в якому представлено результати вивчення інгібіторів *in vivo*. Для цього використали експериментальні моделі на основі мишей лінії ICR і модель алкілувальної терапії пухлин молочної залози. Порівняно ефективність терапевтичної дії нових інгібіторів і показано, що

всі три відібрані інгібітори здатні знижувати темпи росту пухлин під час алкілувальної хіміотерапії на мишачій моделі. Вивчено вплив інгібіторів на рівень білка MGMT в пухлинах і встановлено, що всі три інгібітори знижують його рівень при комбінованій хіміотерапії. Тут варто зазначити, що зниження вмісту MGMT теоретично можливе не тільки в результаті деградації цього суїцидального фермента, як стверджує автор, але і внаслідок інгібування сполуками експресії гена білка MGMT. Досліджено можливий механізм регресії пухлин в умовах терапії за участі інгібіторів MGMT. Зроблено фундаментальний висновок про те, що ймовірним механізмом є апоптоз. Важлива також відносна безпека комбінованої хіміотерапії для нормальних клітин.

Концептуально важливим є прикінцевий *п'ятий розділ* роботи, в якому аналізуються та узагальнюються отримані результати. В ньому описано загальну логіку і послідовність етапів дослідження, проведено порівняння різних аспектів біологічної активності сполук. В принципі, в роботі, присвяченій інгібіторам фермента, бажаний також аналіз SAR (structure-activity relationship) і виявлення структурних факторів, що визначають біоактивність. Проте в цьому випадку він об'єктивно практично неможливий, оскільки вибірка сполук досить невелика (всього 5 структур, причому різних класів). Варто зазначити, що такий важливий узагальнювальний розділ у дисертаціях зустрічається далеко не завжди.

Достовірність отриманих результатів

Достовірність результатів дисертаційної роботи не викликає сумнівів. Вона підтверджується перш за все застосуванням комплексу адекватних і сучасних експериментальних дослідницьких методів. Вони включають, зокрема, набір стандартних методів молекулярної та клітинної біології (екстракція білків, гель-електрофорез, Вестерн-блот-аналіз, культивування клітин тощо), клоногенний та МТТ тести, флуоресцентну спектрометрію та мікроскопію, а також методи роботи з модельними тваринами й аналізу динаміки росту пухлин. В роботі коректно проведено статистичну обробку отриманих даних. Використані методи дозволили одержати достовірні результати, на яких ґрунтуються зроблені в роботі висновки.

Ступінь обґрунтованості наукових положень та висновків дисертації

Мета й завдання дослідження чітко сформульовані, а матеріали дисертації викладено у повній відповідності з ними. Автором проведений ґрунтовний аналіз літератури за темою дисертаційної роботи, що дозволило виявити наукову новизну отриманих результатів. Застосування вказаних вище сучасних методів дало змогу розв'язати ті проблеми, що лежали в основі проведеного дослідження. Наукові положення та висновки дисертації добре обґрунтовані й відповідають отриманим результатам. Висновки роботи чітко сформульовані та висвітлюють її основний зміст.

Наукова новизна роботи

Наукова новизна дисертаційної роботи достатньо очевидна. Основними її досягненнями у плані фундаментальної науки є наступні.

Вперше всебічно вивчено біологічну активність серії нових ненуклеозидних інгібіторів MGMT. Основним механізмом дії цих сполук є інгібування фермента MGMT та зниження вмісту цього білка в пухлинних клітинах. Продемонстровано ефективність інгібіторів у поєднанні з класичним алкілувальним препаратом N-нітрозометилгуанідином у системах *in vitro* та *in vivo*, що є досягненням роботи. Встановлено синергічний ефект зниження кількості білка MGMT при спільній дії нових інгібіторів і алкілувального агента в пухлинних клітинах людини Нер-2, що відрізняє їх від ефекту відомого клінічного інгібітора O⁶-бензилгуаніну. Вперше показано, що комбінована терапія з використанням нових інгібіторів приводить до посилення аутофагії та підвищення летальності пухлинних клітин з високим рівнем білка MGMT. Вперше встановлено терапевтичний ефект нових інгібіторів MGMT у модельній системі *in vivo* на основі мишей лінії ICR, аж до повної регресії пухлин, а також зниження рівня білка MGMT в умовах комбінованої хіміотерапії. Вперше виявлено ознаки апоптичного механізму регресії пухлин в умовах алкілувальної хіміотерапії за участі інгібіторів MGMT, що можна вважати фундаментальним результатом цього дослідження.

Практичне значення отриманих результатів

Перш за все, практичне значення дисертаційної роботи полягає в тому, що в ній знайдено 3 нових інгібітори MGMT ненуклеозидного типу, ефективні в поєднанні з алкілувальним препаратом. Ці інгібітори підвищують ефективність алкілувальної хіміотерапії. Одночасно вони мають низьку цитотоксичність. При цьому інгібітори виявляють терапевтичну дію в експериментальних моделях *in vivo*. Виходячи з цього, знайдені інгібітори можуть розглядатись як кандидати в лікарські засоби для терапії пухлин, особливо в рамках алкілувальної хіміотерапії пухлин з високим рівнем MGMT. Препарати, без сумніву, заслуговують на подальші дослідження, у т.ч. структурну оптимізацію та клінічні випробування. Ці нові сполуки зможуть знайти застосування також у молекулярно-біологічних та біомедичних наукових дослідженнях.

Повнота викладу основних результатів роботи в опублікованих працях

Результати роботи повністю опубліковані. За її матеріалами вийшло друком 8 наукових праць, серед яких 3 статті у фахових журналах та 5 тез доповідей на конференціях, у т.ч. міжнародних. Статті опубліковано в міжнародному журналі *Cytology and Genetics* (видавництво Springer, імпакт-фактор 0,5) і у вітчизняних журналах *Biopolymers and Cell* та *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, що індексуються в міжнародних наукометричних базах Scopus та Web of Science відповідно. Це свідчить про високий рівень роботи, наукову новизну й вагомість отриманих результатів.

Підсумкова оцінка змісту дисертаційної роботи

Дисертація справляє дуже позитивне враження. Автором виконаний справді великий обсяг експериментальних досліджень, що дозволило знайти ефективні нові інгібітори терапевтично важливого фермента MGMT. Проведене комплексне

дослідження препаратів, для чого використано численні системи й моделі *in vitro*, *in cellulo* та *in vivo*. Отримані результати мають як фундаментальну наукову, так і практичну цінність. Вони вносять вагомий внесок у наші знання про інгібітори MGMT та їхню взаємодію з алкілувальними сполуками, а також поглиблюють розуміння впливу інгібіторів MGMT на ключові клітинні процеси, зокрема, аутофагію та апоптоз. Результати зможуть знайти застосування в дослідженнях у науках про життя, а в перспективі і в медицині. Сформульовані автором мета й завдання роботи успішно реалізовані, а висновки роботи повністю обґрунтовані. Дисертація якісно оформлена.

В цілому, ця дисертаційна робота є серйозною працею на актуальну тему, виконаною на сучасному експериментальному й теоретичному рівні, в якій отримано нові цікаві результати, важливі для розвитку біології та медицини.

Дискусійні положення, зауваження та запитання до дисертації

Робота за своїм змістом, результатами і глибиною їх аналізу є дослідженням високого рівня. Принципових зауважень до неї немає, а серед окремих зауважень і запитань можна навести наступні.

1. Недостатньо пояснено, чому досліджували саме *ненуклеозидні* інгібітори, в чому їх переваги й недоліки порівняно з нуклеозидними. В літературному огляді взагалі не наводиться така класифікація (нуклеозидні/ненуклеозидні), а інгібітори останнього типу та їхні механізми дії окремо не розглядаються (за винятком ДНК-спрямованого порфірину DIGPor, який не названо *ненуклеозидним*, с. 49).

2. Структури досліджених інгібіторів ми вперше бачимо аж у самому кінці дисертації, в заключному розділі 5 «Аналіз і узагальнення отриманих результатів» (с. 111-112). Це нелогічно, і доречніше було би навести їх на початку обговорення результатів чи в експериментальній частині.

3. Дисертація стосується інгібіторів фермента, проте в ній не наведені дані про власне інгібувальну активність сполук щодо цього фермента, у т.ч. значення IC₅₀, отримані в ферментативній тест-системі. В роботі ж інгібувальну дію сполук оцінювали лише на клітинному рівні.

4. Для первинного відбору інгібіторів з колекції сполук використовували методи *in vitro* (зокрема, флуоресцентний MGMT-тест у безклітинній системі), які коротко описані в кінці дисертації (розділ 5, с. 109-111). Логічніше було би представити процес відбору на самому початку обговорення результатів (розділ 3), перемістивши відповідний фрагмент з розділу 5 у підрозділ 3.1 «Первинний відбір інгібіторів». Корисно було б і навести схему MGMT-тесту.

5. Цікаво, який можливий спосіб зв'язування інгібіторів з ферментом?

6. У списку скорочень для глюкози наведено позначення Glu. Разом з тим, це стандартне позначення глутамінової кислоти, яке теж зустрічається в тексті (наприклад, на с. 31, 32). Загальноприйняте позначення глюкози – Glc.

7. Преамбула висновків на наш погляд, надто громіздка.

Вказані зауваження та рекомендації не стосуються суті роботи і жодним чином не впливають на її загальну високу оцінку.

Загальний висновок та оцінка дисертації

Дисертація є самостійною завершеною науковою працею, що становить вагомий внесок у науки про життя. Актуальність теми, достовірність, наукова новизна та практичне значення результатів, повнота їх викладу в опублікованих працях, обґрунтованість положень і висновків свідчать про високий науковий рівень дисертаційної роботи.

Отримані результати забезпечують вирішення актуальних наукових завдань у галузі знань 09 – «Біологія».

У підсумку, дисертація Катерини Сергіївни Жуваки «Дослідження нових ненуклеозидних інгібіторів MGMT при алкілувальній хіміотерапії пухлинних клітин в модельних системах», відповідає спеціальності 091 – «Біологія» та вимогам «Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у вищих навчальних закладах (наукових установах)», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 23 березня 2016 р. №261 (зі змінами й доповненнями від 3 квітня 2019 р. №283) та «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. №44, а її автор повністю заслуговує присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – «Біологія».

Офіційний рецензент:

завідувач відділу синтетичних біорегуляторів
Інституту молекулярної біології і генетики
НАН України, д.х.н., ст.н.с.



Ігор ДУБЕЙ

