

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу **Кліща Миколи Васильовича**

«Механізми протипухлинного впливу нових гетероциклічних сполук: моделювання *in silico*, цитотоксична та імуномодуюча дія *in vitro* та *in vivo*», представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «біологія» за спеціальністю 091 – Біологія

Актуальність обраної теми дисертації. У роботі досліджено цитотоксичні властивості нових гетероциклічних сполук *in vitro*, моделювання механізмів їхньої дії *in silico* та оцінка здатності клітинних вакцин, виготовлених з використанням цих сполук, протидіяти росту новоутворень у експериментальних тварин.

Робота є актуальною, так як онкологічні захворювання досі залишаються дуже розповсюдженими у світі. Протягом останніх десятиліть у розвинених країнах відбулося помітне зниження смертності від раку за рахунок ширшого впровадження скринінгу та збільшення доступності лікування. Проте попри розробку нових терапевтичних підходів, спрямованих на лікування раку, їхня ефективність залишається обмеженою. Також актуальною залишається проблема селективності дії хіміотерапевтичних препаратів. Тому розробка нових підходів, спрямованих на адресне націлювання пухлиноспецифічних вразливостей, а також їх поєднання для досягнення синергічного ефекту, є важливими напрямками сучасної фармакології та медицини.

Таким чином, такий напрямок досліджень є актуальним на даний час у зв'язку з великим поширенням ракових захворювань та пошуком нових фармацевтичних препаратів і протоколів лікування раку.

Зв'язок роботи з державними науковими програмами, планами. Дисертаційна робота виконана в рамках наукових досліджень відділу Регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини НАН України: теми «Роль імуномодуляторної активності у протипухлинній дії традиційних та експериментальних медикаментозних препаратів за їх доставки полімерними наноносіями до різних клітин-мішеней *in vitro* та *in vivo*» (реєстраційний номер

0122U002240, 2022-2026 pp.); українсько-австрійського білатерального науково-дослідного проєкту «Подвійна дія на специфічні вразливості злоякісних клітин новими похідними тіосемікарбазону» (реєстраційний номер 0124U003513, 2022-2024 pp.) згідно з наказом Міністерства освіти і науки України від 07.07.2023 № 826 «Про фінансування спільних українсько-австрійських науково-дослідних проєктів у 2023 році»; НДР «Взаємозв'язок між імуномодуляторною дією і протипухлинною активністю нових гетероциклічних сполук (похідні тiazолу і 4-тіазолідинону)» (реєстраційний номер 0120U103077, 2020-2024 pp.); НДР «Молекулярний дизайн, синтез і доклінічні випробування нових похідних тiazолу і тiazолідинону із селективною дією на клітини мієлопроліферативних новоутворень» (реєстраційний номер 0124U003835, 2024-2026 pp.), підтриманого грантом Національного фонду досліджень України (договір про надання грантової підтримки № 204/0104 від 01 серпня 2024 року).

Оцінка обґрунтованості наукових положень, висновків, сформованих у роботі. Дисертація Кліща М.В. є завершеною науковою роботою, що містить всі необхідні структурні елементи від обґрунтування актуальності та стратегії дослідження до аналізу отриманих результатів та висновків. Частини дисертаційної роботи викладені послідовно та логічно пов'язані між собою. Наведено обґрунтування для вибору кожного методу дослідження, всі експериментальні дані супроводжуються відповідним аналізом. Експериментальні результати було опрацьовано з використанням загальноприйнятих методів статистичної обробки даних.

Також було проведено порівняння отриманих результатів з даними, описаними у світовій літературі іншими дослідниками. Виходячи з узагальнення результатів дисертації, було показано, що мета дисертаційної роботи була повністю досягнута в ході виконання дослідження, а дисертація є завершеною науковою кваліфікаційною працею. Завершується робота вичерпними розгорнутими висновками, які логічно описують отримані результати та відображують наукове та практичне значення дисертаційної роботи.

Повнота викладення основних результатів роботи в наукових фахових виданнях. Ключові положення дисертаційної роботи було висвітлено у наукових

працях дисертанта. За темою дисертації опубліковано 8 наукових праць, серед яких 2 статті у вітчизняних та міжнародних фахових періодичних виданнях, а також 6 тез доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях, конгресах та наукових з'їздах. Наукові публікації за темою дисертації відповідають чинним вимогам законодавства України.

Оцінка змісту дисертації та її завершеності. У дисертаційній роботі чітко та науково коректно сформульовано мету, яка відображається у поставлених завданнях, визначено об'єкт та предмет роботи. Вичерпно обґрунтовано актуальність поставленої проблеми та використання тих чи інших експериментальних методів. Викладення експериментального матеріалу структурно та змістовно відповідає поставленим завданням.

Розглянувши звіт подібності за результатами перевірки дисертаційної роботи на текстові співпадиння, можна зробити висновок, що дисертаційна робота Кліща М.В. є результатом самостійних досліджень здобувача і не містить елементів фальсифікації, компіляції, фабрикації, плагіату та запозичень. Використані ідеї, результати і тексти інших авторів мають належні посилання та відповідне джерело.

Дисертація складається із наступних розділів: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали та методи досліджень», «Результати досліджень та їх обговорення», «Аналіз і узагальнення одержаних результатів», «Висновки», «Список використаних джерел» та додатків 1 та 2. Дисертацію викладено на 169 сторінках, із них основна частина займає 99 сторінок. Робота містить 23 рисунки, 13 таблиць та 148 джерел літератури.

Огляд літератури розповідає про білок p53 як мішень у протипухлинній терапії, застосування похідних тіазолу у терапії раку товстого кишківника та імуногенну загибель пухлинних клітин (ІЗК), її механізми та роль у протипухлинній терапії.

Розділ 2 «Матеріали та методи» містить вичерпний та детальний опис матеріалів та методів, використаних в ході експериментального дослідження. Так, описано досліджувані сполуки, культивування клітин, молекулярний докінг, імунізацію тварин та інші методи.

В розділі 3 (експериментальна робота) продемонстровано, що сполуки Les-6547 та Les-6557, що є похідними тіопірано[2,3-d]тіазолу, володіють цитотоксичною дією зі сприятливим терапевтичним індексом. Спираючись на результати аналізу *in silico*, протипухлинна дія Les-6547 та Les-6557 може бути зумовлена їхньою взаємодією із сигнальними протеїнкіназами, зокрема CDK2. Результати клонотипування аналізу та проточної цитометрії вказують на те, що антипроліферативний ефект сполук Les-6547 та Les-6557 реалізується через зупинку клітинного циклу. Показано, що сполука COTI-NMe₂ є потужнішим цитотоксичним чинником, ніж її попередник – сполука COTI-2. Цитотоксична дія COTI-NMe₂ співрозмірна з дією іншого α -N-гетероциклічного тіосемікарбазону – тріапіну. COTI-NMe₂ ефективно пригнічує ріст клітин мишачої меланоми B16F10 не лише дикого типу, але й резистентної лінії B16F10/ADR. Наведено результати молекулярного докінгу, які передбачають, що одним з потенційних механізмів дії COTI-NMe₂ може бути реактивація мутантних форм білка p53. Результати імунофлуоресцентної мікроскопії та Вестерн-блот-аналізу вказують на специфічну реактивацію білка p53 з мутацією R175H, що узгоджується із результатами молекулярного докінгу та моделювання молекулярної динаміки. Дія сполуки COTI-NMe₂ в низькій концентрації (500 нМ) протягом тривалішого часу (48 год) найефективніше пригнічує ріст клітин мишачої меланоми B16F10 у тварин з трансплантованою пухлиною. Динаміка виживання тварин узгоджується з гіпотезою про індукцію імуногенної загибелі клітин під дією COTI-NMe₂. Продemonстровано здатність сполуки COTI-NMe₂ посилювати фагоцитарну активність мишачих макрофагів лінії J774.2, причому цей ефект виражений лише за низьких концентрацій (<10 нМ) цієї сполуки, що не проявляють суттєвої цитотоксичної дії.

В розділі 4 «Аналіз і узагальнення одержаних результатів» наведено узагальнену інформацію про отримані результати у роботі та порівняно їх з літературними даними.

Всі розділи дисертаційної роботи логічно відповідають поставленим завданням.

У висновках розкрито як наукове, так і практичне значення дисертації.

Ознайомлення з текстом дисертації дає підстави стверджувати, що за структурою та змістом він відповідає вимогам, що висуваються МОН України. У тексті відображено основні положення, зміст, результати і висновки здійсненого Кліщем М.В. дисертаційного дослідження.

Мова та стиль викладення дисертаційної роботи. Дисертаційна робота написана українською мовою, використовується загальноприйнята термінологія. Стиль мовлення відзначається доступністю викладення та послідовністю.

Наукова новизна. У дисертаційній роботі вперше запропоновано і обґрунтовано механізм цитотоксичної дії нового α -N-гетероциклічного похідного тіосемікарбазону COTI-NMe₂, що базується на реактивації мутантних форм білка p53. Запропоновано механізм цитотоксичної та проапоптотичної дії нових гетероциклічних сполук – похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу, що забезпечується взаємодією із циклін-залежною протеїнкіназою CDK2. Досліджено цитотоксичну дію COTI-NMe₂ на злоякісні клітини різних ліній карцином миші та людини, передусім карцином колоректального походження, та проведено порівняння властивостей COTI-NMe₂ із властивостями раніше описаних α -N-гетероциклічних похідних тіосемікарбазону. Продемонстровано участь COTI-NMe₂ у розвитку резистентності до росту трансплантованих пухлин у експериментальних тварин та здатність посилювати фагоцитоз *in vitro*. Таким чином, встановлено здатність низьких доз COTI-NMe₂ індукувати імуногенну загибель пухлинних клітин.

Практичне значення одержаних результатів. Таргетна терапія раку із використанням високо селективних інгібіторів протеїнкіназ наразі вважається одним із найперспективніших підходів у лікуванні онкологічних захворювань. Однак, незважаючи на виняткову ефективність, що може призводити до майже повної ремісії навіть у пацієнтів із раком 4-ї стадії, ці препарати виявляються неефективними перед агресивним рецидивом пухлини, який зазвичай розвивається через 9–14 місяців після початку терапії (Zhong et al, 2021).

Для вирішення цих проблем в роботі запропоновано використання похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу, для яких, згідно з отриманими даними, передбачається здатність до взаємодії із циклін-залежними протеїнкіназами, у поєднанні із

новими похідними тіосемікарбазону, що можуть реактивувати мутантний білок p53 та зумовлювати імуногенність загибелі пухлинних клітин.

Запропоновано унікальний підхід, який полягає в тому, що потенційна дуальна протипухлинна активність тіосемікарбазонів забезпечує мінімальний ризик розвитку стійкості до цих препаратів *in vivo*. Навіть у разі повторної мутації гена *TP53*, яка може зробити білок p53 нечутливим до дії цих сполук, їхня імуногенна складова зберігається. Цей ефект базується на подвійній дії сполук і не має безпосередніх аналогів для лікування пухлин, які характеризуються надекспресією мутованого гена *TP53* та імунологічною толерантністю.

Отже дія *in vivo* на пухлиноспецифічні вразливості, зокрема відновлення функції білка p53 та реактивація імунної системи за допомогою нових похідних тіосемікарбазону, а також направлена дія нових похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу на активність циклін-залежних кіназ, сприятиме вибіркового знищенню злоякісних клітин із зазначеними ознаками

Зауваження та побажання.

1. В чому проявляється і конкретно полягає «відновлення функції білка p53 та реактивація імунної системи та регулювання активності циклін-залежних протеїнкіназ». Чи це стосується тільки конформаційних відмінностей?
2. Не зовсім зрозуміло вживання висліву «низька доза». В одному випадку «500 нм – низька доза препарату COTI-NMe₂ для клітин B16F10», а в другому – «зростання фагоцитарної активності клітин J774.2, за використання низьких доз (< 10 нм) препарату COTI-NMe₂».
3. Чому автор вважає, що використання похідних тіопірано[2, 3-d]тіазолу це таргетна терапія?
4. «PDB-структури було очищено від молекул води ко-кристалізованих лігандів» - тобто видалявся розчинник і в подальшому всі розрахунки відбувались у вакуумі, але в цьому випадку повністю міняється конформація. Наскільки це коректно?
5. В роботі автор проводив сліпий докінг з коміркою розміром 10Å в трьох вимірах, а для програми AutoDock Vina v.1.2.3 комірка була розміром 5 Å. Чому такий вибір?

6. В дисертації наводяться скорочення і латиною і кирилицею. Необхідно було зробити скорочення українською мовою і поряд надати англійською мовою. Зустрічаються стилістичні і орфографічні помилки та використовується прийменник «при», а українською мовою має бути «за».

Однак, зазначені зауваження не суттєво впливають на загальне позитивне враження від роботи та мають в тому числі дискусійний характер. Загалом дисертаційна робота написана на достатньо високому науковому рівні.

Загальний висновок. Таким чином, дисертаційна робота Кліща Миколи Васильовича «Механізми протипухлинного впливу нових гетероциклічних сполук: моделювання *in silico*, цитотоксична та імуномодулююча дія *in vitro* та *in vivo*» являє собою закінчену науково-дослідну роботу. Актуальність обраної проблеми, високий методичний рівень проведених досліджень, наукове й практичне значення отриманих результатів дозволяє вважати, що дисертаційна робота Кліща М.В. відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» (Постанова Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44) та Постанови Кабінету Міністрів України від 19 травня 2023 р. [№502](#) і наказу МОН України від 12.01.2017 р. № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації». Здобувач заслуговує на присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «біологія» за спеціальністю **091 – біологія**.

Офіційний опонент:

Заступник директора з наукової роботи

ДУ «Інститут харчової біотехнології

та геноміки НАН України»,

доктор біологічних наук, професор

Сергій ШУЛЬГА