

Рішення
разової спеціалізованої вченої ради
про присудження ступеня доктора філософії

Здобувач ступеня доктора філософії Микола Кліщ,
1996 року народження, громадянин України,
освіта вища: закінчив у 2019 році Львівський національний університет імені Івана Франка
за спеціальністю біологія,
навчається в аспірантурі в Інституті біології клітини Національної академії наук України, м. Львів,
виконав акредитовану освітньо-наукову програму Інституту біології клітини Національної академії наук України.

Разова спеціалізована вчена рада, утворена наказом Інституту біології клітини Національної академії наук України, м. Львів від «06» серпня 2025 року № 78/ОД, у складі:

Голови разової спеціалізованої вченої ради - Михайло Гончар, доктор біологічних наук, професор, член-кор. НАН України, завідувач відділу аналітичної біотехнології, Інститут біології клітини НАН України

Рецензентів - Олег Стасик, доктор біологічних наук, старший дослідник, завідувач відділу сигнальних механізмів клітини, Інститут біології клітини НАН України

Наталія Стасюк, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник відділу аналітичної біотехнології, заступник директора з наукової роботи, Інститут біології клітини НАН України

Офіційних опонентів - Сергій Шульга, доктор біологічних наук, професор, старший науковий співробітник, завідувач лабораторії промислової та харчової біотехнології відділу геноміки і молекулярної біотехнології, заступник директора з наукової роботи ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»

Денис Колибо, доктор біологічних наук, професор, член-кор. НАН України, завідувач лабораторії імунології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України.

на засіданні «02» жовтня 2025 року прийняла рішення про присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – біологія Миколі Кліщу на підставі публічного захисту дисертації «Механізми протипухлинного впливу нових гетероциклічних сполук: моделювання *in silico*, цитотоксична та імуномодулююча дія *in vitro* та *in vivo*» за спеціальністю 091 – біологія.

Дисертацію виконано в Інституті біології клітини Національної академії наук України, м. Львів.

Науковий керівник Ростислав Стойка, доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України, завідувач відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу, Інститут біології клітини Національної академії наук України.

Дисертацію подано у вигляді спеціально підготовленого рукопису українською мовою, який повністю відповідає вимогам до оформлення дисертації, затвердженим Наказом МОН України від 12.01.2017 р., № 40.

У дисертаційній роботі показано, що сполуки Les-6547 та Les-6557, які є похідними тіопірано[2,3-d]тіазолу, володіють цитотоксичною дією та мають сприятливий терапевтичний індекс. Спираючись на результати аналізу *in silico*, протипухлинна дія Les-6547 та Les-6557 може бути зумовлена їхньою взаємодією із сигнальними протеїнкіназами, зокрема CDK2. Результати клонотипного аналізу та проточної цитометрії вказують на те, що антипроліферативний ефект сполук Les-6547 та Les-6557 реалізується через зупинку клітинного циклу. Це узгоджується з гіпотезою про конкурентне інгібування циклін-залежної кінази CDK2 за участю цих сполук.

Сполука COTI-NMe₂ з родини α -N-гетероциклічних тіосемікарбазонів є потужнішим цитотоксичним чинником, ніж її попередник – сполука COTI-2. Цитотоксична дія COTI-NMe₂ співрозмірна з дією іншого α -N-гетероциклічного тіосемікарбазону – триапіну. COTI-NMe₂ ефективно пригнічує ріст клітин мишачої меланоми B16F10 не лише дикого типу, але й резистентної лінії B16F10/ADR. Результати молекулярного докінгу 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. Доведено 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.

Результати досліджень можуть бути використані в галузі медичної хімії та фармакології для розробки нових ефективних протипухлинних агентів на основі похідних тіазолу та тіосемікарбазону, а також в галузі молекулярної біології для розуміння механізмів, що лежать в основі росту пухлин, ідентифікації потенційних цілей для лікування раку та розробки стратегій щодо подолання резистентності до ліків. Результати досліджень можуть бути використані у навчальних курсах «Методи клітинної біології», «Біохімія тваринної клітини» та «Регуляція проліферації, диференціації та апоптозу клітин».

Здобувач має 8 наукових публікацій за темою дисертації, з них 2 статті (1 - у вітчизняному та 1 - у міжнародному фахових періодичних виданнях, що входять до WoS або Scopus) та 6 тез доповідей в збірниках матеріалів конференцій:

Статті у виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core або Scopus:

1. **Klishch, M.**, Skorokhyd, N., Panchuk, R., Stoika, R. (2024). Biochemical and cellular mechanisms of immunogenic cell death. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 96(6), 5–16. <https://doi.org/10.15407/ubj96.06.005> (Q4, Scopus).
2. Kozak, Y., Finiuk, N., Czarnomysy, R., Gornowicz, A., Pinyazhko, R., Lozynskyi, A., Holota, S., Klyuchivska, O., Karkhut, A., Polovkovych, S., **Klishch, M.**, Stoika, R., Lesyk, R., Bielawski, K., & Bielawska, A. (2025). Juglone-Bearing Thiopyrano[2,3-d]thiazoles Induce Apoptosis in Colorectal Adenocarcinoma Cells. *Cells*, 14(6), 465. <https://doi.org/10.3390/cells14060465> (Q1, WoS, Scopus, IF = 5,1).

У дискусії взяли участь (голова, рецензенти, офіційні опоненти, інші присутні) та висловили зауваження:

Рецензент – Олег Стасик, доктор біологічних наук, старший дослідник, завідувач відділу сигнальних механізмів клітини Інституту біології клітини НАН України, *надав позитивну рецензію із зауваженнями та запитаннями:*

Дискусійні питання та зауваження.

1. Текст дисертації потрібно було вчитати на предмет «сленгізмів», деякі з яких мною були виділені.
2. Ще на етапі анотації необхідно пояснити читачеві, яким чином досвід маніпуляцій із відомою пухлиною (імунізація тварин), може бути перенесений у клініку, адже кожна пухлина має унікальний набір мутацій онкодрайверів.
3. В експериментах по імунізації мишей використовували більш метастатичну сублінію меланоми B16F10, а не вихідну B16, - якою була мотивація такого вибору?
4. Результати молекулярного докінгу не є доказом взаємодії сполуки із потенційною мішенню, а лише припущенням про імовірність такої взаємодії. Для тверджень потрібні дані по ензиматичній активності кіназ.
5. Розділ «Узагальнення та аналіз результатів» краще було б розширити та обговорити перспективи розробки онкотерапій на основі ІЗК.

Рецензент – Наталія Стасюк, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник відділу аналітичної біотехнології, заступник директора з наукової роботи, Інститут біології клітини НАН України. *надала позитивну рецензію із зауваженнями та запитаннями:*

Дискусійні питання та зауваження.

Відзначаючи серйозний науковий та методологічний рівень роботи, а також її загалом належне, згідно з діючими вимогами, оформлення, до роботи виникла низка зауваг та запитань:

1. Попри те, що в дисертації є численні посилання на сучасні публікації, аналіз результатів не містить достатнього порівняння з аналогічними роботами, проведеними в інших дослідницьких групах. Саме тому, доцільно було б розширити обговорення літератури з акцентом на порівняння отриманих результатів з даними конкурентних досліджень, що дозволило би краще оцінити інноваційність і практичне значення запропонованого підходу.
2. Чи може методика забарвлення трипановим синім, яка дозволяє оцінити загальну життєздатність клітин, забезпечити диференціацію типів загибелі клітин у контексті дослідження імунної загибелі клітин (ІЗК)? Чи не могло б застосування додаткових методів, таких як Annexin V/PI або TUNEL-аналіз, підвищити достовірність отриманих висновків щодо типів загибелі клітин, зокрема апоптозу та некрозу?
3. Результати комп'ютерного прогнозування потенційних мішеней досліджуваних сполук (SwissTargetPrediction) є важливим доповненням до експериментальної частини, однак потребують обережної інтерпретації. Було б доцільно або підтвердити отримані дані експериментально, або вказати на ймовірні похибки прогнозу.
4. Висновок №5 до дисертаційної роботи базується переважно на результатах докінгу та молекулярної динаміки, які свідчать про стабільність комплексу COT1-NMe2 з p53. Проте твердження про реактивацію білка потребує додаткової експериментальної верифікації, зокрема через оцінку активації p53-залежних транскрипційних програм або відновлення апоптичного каскаду.

Офіційний опонент – Сергій Шульга, доктор біологічних наук, професор, старший науковий співробітник, завідувач лабораторії промислової та харчової біотехнології відділу геноміки і молекулярної біотехнології, заступник директора з наукової роботи ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», *надав позитивний відгук із зауваженнями та побажаннями:*

Зауваження та побажання.

1. У чому проявляється і конкретно полягає «відновлення функції білка p53 та реактивація імунної системи та регулювання активності циклін-залежних протеїназ»? 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. У роботі автор проводив сліпий докінг з коміркою розміром 10Å у трьох вимірах, а для програми AutoDock Vina v.1.2.3 комірка була розміром 5 Å. Чому такий вибір?
6. У дисертації наводяться скорочення і латиницею, 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».

Офіційний опонент – Денис Колибо, доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України, завідувач лабораторії імунології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України, *надав позитивний відгук із зауваженнями та побажаннями:*

Зауваження та побажання.

Дисертація виконана на високому рівні, зауваження та запитання мають лише дискусійний характер:

1. Які форми загибелі клітин, розглянуті автором у літературному огляді, віднесено до імуногенної загибелі, а які – до неімуногенної, і де є межа між ними? Чи належить класичний некроз до імуногенної загибелі клітин, чи ні? Якщо так, то чим можна пояснити, що у якості негативного контролю використовували некротичні пухлинні клітини, що піддавалися повторюваним циклам заморожування-розморожування (від –196 до +20 °C, 3х), і ці клітини вважаються такими, що загинули без індукції ІЗК?
2. Які механізми, на думку автора, пояснюють вищу чутливість пухлинних клітин до COTI-NMe₂ порівняно з нормальними клітинами?
3. Чи можлива участь α -N-гетероциклічних похідних тіосемікарбазону в регуляції системи синтезу інтерферонів через, наприклад, внутрішньоклітинні рецептори у пухлинних клітинах?
4. Яким чином COTI-NMe₂ може впливати на імуногенність загибелі клітин і розвиток стійкості до трансплантованих пухлин? Які показники імунітету у досліджуваних тварин можуть про це свідчити?
5. Чи планується подальше поєднання COTI-NMe₂ з іншими таргетними або хіміотерапевтичними агентами для синергічного ефекту?
6. Чи існують потенційні ризики, що можуть виникати за умов гіперактивації імунної відповіді *in vivo* при застосуванні запропонованих схем активації імуногенної загибелі клітин?

Голова разової ради – Михайло Гончар, доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу аналітичної біотехнології, Інститут біології клітини НАН України. *Оцінка позитивна, без зауважень.*

Присутні:

Ростислав Стойка, доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України, завідувач відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу, Інститут біології клітини Національної академії наук України. *Оцінка позитивна, без зауважень.*

Наталія Кацак, кандидат біологічних наук, молодший науковий співробітник відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу, Інститут біології клітини Національної академії наук України. *Оцінка позитивна, із зауваженнями:*

1. Потрібно обґрунтувати вибір антитіл DO-1, які розпізнають як дикий тип, так і численні мутантні форми білка p53, та пояснити доцільність їх використання для оцінки реактивації мутантного p53.
2. Варто було розглянути можливість застосування більш специфічних антитіл до білка p53 — PAb1620 (для дикого типу) та PAb240 (для мутантних форм).
3. Вестерн-блот-аналіз доцільно було б виконати після імунопреципітації для підвищення чутливості методу та уникнення хибнонегативних результатів.
4. Для перевірки реактивації p53 доцільно доповнити аналіз методами, що оцінюють зв'язування з ДНК або функціональну активність білка, такими як тест електрофоретичної рухливості (EMSA), люциферазний репортерний аналіз, імунопреципітація хроматину та диференціальна спектрофлуориметрія для оцінки термостабільності білка.

Результати відкритого голосування:

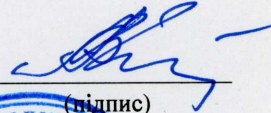
«За» 5 членів ради,

«Проти» 0 членів ради.

На підставі результатів відкритого голосування разова спеціалізована вчена рада присуджує Миколі Кліщу ступінь доктора філософії з галузі знань 09 – біологія за спеціальністю 091 – біологія.

Відеозапис трансляції захисту дисертації додається.

Голова разової спеціалізованої вченої ради


(підпис)

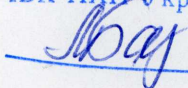
Михайло ГОНЧАР

(власне ім'я та прізвище)

Підпис Гончара М.
ЗАСВІДЧУЮ



Учений секретар
ІБК НАН України, к.б.н.


Барська М.Л