Національна академія наук України
Інститут біології клітини

Національна академія наук України
Інститут біології клітини

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Кліщ Микола Васильович

УДК 616-006:615.277:547.7+612.017+004.94

ДИСЕРТАЦІЯ

Механізми протипухлинного впливу нових гетероциклічних сполук: моделювання *in silico*, цитотоксична та імуномодулююча дія *in vitro* та *in vivo*

09 – Біологія
091 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

_____ М. В. Кліщ

Науковий керівник Стойка Ростислав Стефанович, доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України

Львів-2025

АНОТАЦІЯ

Кліщ М. В. Механізми протипухлинного впливу нових гетероциклічних сполук: моделювання *in silico*, цитотоксична та імуномодулююча дія *in vitro* та *in vivo*. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія. – Інститут біології клітини НАН України, Львів, 2025.

Дисертаційна робота спрямована на дослідження цитотоксичних властивостей нових гетероциклічних сполук *in vitro*, моделювання механізмів їхньої дії *in silico* та оцінку здатності клітинних вакцин, виготовлених з використанням цих сполук, протидіяти росту новоутворень у експериментальних тварин.

За даними Міжнародного агентства з вивчення раку, у 2022 році у світі було зареєстровано близько 20 млн нових випадків онкологічних захворювань, а смертність від різних видів раку сягнула 9.7 млн. За останні десятиліття у розвинених країнах смертність від раку помітно знизилася завдяки ширшому впровадженню нових методів діагностики та збільшення доступності лікування. Наприклад, у США протягом 1991–2022 рр. смертність від онкологічних захворювань знизилась на 34%. Проте у глобальному масштабі онкологічні хвороби залишаються актуальною медичною проблемою. Згідно з прогнозами Всесвітньої організації охорони здоров’я, кількість нових випадків раку до 2050 року може зрости на 77% і досягти 35 млн. Попри розробку нових терапевтичних підходів для лікування раку, їхня ефективність та селективність залишається обмеженою. Саме тому розробка нових підходів, спрямованих на точне націлювання пухлиноспецифічних вразливостей, є важливими напрямками сучасної фармакології та медицини.

В результаті виконання дисертаційної роботи з’ясовано умови ефективності клітинних вакцин, створених з використанням нових гетероциклічних сполук (α-N-гетероциклічних тіосемікарбазонів), для протидії росту пухлин у лабораторних мишей. Запропоновано механізми протипухлинної дії α-N-гетероциклічних тіосемікарбазонів та похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу на основі моделювання *in silico*, що включає їх порівняння із раніше описаними протипухлинними препаратами з експериментально підтвердженими механізмами дії. Результати моделювання підкріплені експериментальними даними, отриманими з використанням відповідних методів дослідження *in vitro*.

Цитотоксичний ефект COTI-NMe_2, нового α-N-гетероциклічного похідного тіосемікарбазону, перевищував відповідні значення для похідного COTI-2 у 2-3 рази щодо клітин CT26 та майже вдвічі – для клітин B16F10 дикого типу. Подібні закономірності спостерігалися і для клітин лінії HCT116, тоді як у випадку SW480 суттєвої різниці між досліджуваними похідними тіосемікарбазону не виявлено. Додатково було оцінено цитотоксичні властивості COTI-NMe_2 щодо клітинних ліній мишачої меланоми B16F10 дикого типу та ізогенної лінії B16F10/ADR, стійкої до доксорубіцину. Аналіз результатів показав подібну чутливість обох ліній до дії COTI-NMe_2, що вказує на малу ймовірність його взаємодії з ABC-транспортерами, які забезпечують резистентність клітин лінії B16F10/ADR до доксорубіцину.

За допомогою молекулярного докінгу та симуляції молекулярної динаміки було спрогнозовано, що одним із можливих механізмів протипухлинної дії COTI-NMe_2 є функціональна реактивація мутантного білка p53, зокрема у разі наявності міссенс-мутації R175H. Дані імунофлюоресцентної мікроскопії та аналізу Вестерн-блот підтвердили зростання вмісту активного p53 у клітинах лінії HCT116. Похідні тіопірано[2,3-d]тіазолу Les-6547 та Les-6557 продемонстрували показники докінгу, співставні з лігандами, здатність яких до зв’язування була підтверджена експериментально. Було запропоновано можливий механізм їхньої дії, який

пояснює отримані експериментальні результати, а саме інгібування протеїнкінази CDK2. Дана гіпотеза була підкріплена експериментальними даними, отриманими з використанням методів клоногенного аналізу та проточної цитометрії, які підтвердили, що антипроліферативні властивості даних сполук зумовлені зупинкою клітинного циклу у фазі G1/S.

Таргетна терапія раку із застосуванням високо селективних інгібіторів протеїнкіназ сьогодні розглядається як один із найперспективніших методів лікування онкологічних захворювань. Проте, незважаючи на високу ефективність, що може спричиняти майже повну ремісію 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).

Одним із можливих способів подолання цієї проблеми є комбінований підхід, що поєднує інгібітори протеїнкіназ з іншими засобами, здатними впливати на різні пухлинні вразливості. В роботі висунено гіпотезу, що ефективним рішенням може бути застосування похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу, які, згідно з отриманими даними, можуть взаємодіяти з циклін-залежними протеїнкіназами, у комбінації з новими похідними тіосемікарбазону, що сприяють реактивації мутантного білка p53 та індукують імуногенну загибель пухлинних клітин.

Оцінка виживаності тварин без розвитку пухлин засвідчила, що найвищий рівень виживаності та найменша частота утворення пухлин характерні для групи мишей, яких імунізували клітинами B16F10, попередньо обробленими COTI-NMe_2 (500 нМ) протягом 48 годин. Крім того, у тварин, вакцинованих такими клітинами, у разі розвитку пухлин їхній об’єм був значно меншим порівняно з тими, яким вводили клітини лінії B16F10 після 24-годинної інкубації з препаратом. Тривала обробка клітин цієї лінії порівняно низькими дозами препарату COTI-NMe_2 (500 нМ протягом 48 годин) зумовлює більш виражені імуногенні наслідки загибелі

клітин B16F10, порівняно з іншими комбінаціями концентрації препарату та часу впливу. Це підтверджує відсутність прямого зв'язку між цитотоксичністю препарату та імуногенністю загиблих клітин.

Крім того, встановлено, що підвищення концентрації COTI-NMe_2 сприяє зростанню фагоцитарної активності клітин J774.2, однак лише за використання низьких доз (<10 нМ), які не проявляють вираженої цитотоксичної дії. Це зростання супроводжувалося збільшенням кількості активних фагоцитарних клітин J774.2, які після культивування у кондиціонованому середовищі поглинали термоінактивовані дріжджові клітини, хоча середня кількість поглинутих клітин дріжджів на одну фагоцитуючу клітину залишалася відносно сталою.

Ми вважаємо, що вплив на пухлиноспецифічні вразливості, зокрема відновлення функції білка p53 та реактивація імунної системи за допомогою нових похідних тіосемікарбазону *in vivo*, а також цілеспрямоване регулювання активності циклін-залежних протеїнкіназ за допомогою похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу, може сприяти вибірковому знищенню злоякісних клітин із відповідними характеристиками. Це відкриває можливості для розробки нових, більш ефективних стратегій цільової терапії раку. Унікальність запропонованого підходу полягає у потенційній дуальній протипухлинній активності тіосемікарбазонів, яка мінімізує ризик розвитку стійкості до цих препаратів *in vivo*. Навіть у разі повторної мутації гена *TP53*, що робить його нечутливим до дії цих сполук, їхній імуногенний ефект зберігається. Отже, у довгостроковій перспективі цей підхід не має аналогів у терапії пухлин, що характеризуються гіперекспресією мутованого гена *TP53* та імунологічною толерантністю.

Ключові слова: тіосемікарбазон, тіазол, карцинома, цитотоксичність, імуномодуляція, імуногенна загибель клітин, фагоцитоз, мутації *TP53*, реактивація p53, молекулярний докінг, молекулярна динаміка.

ANNOTATION

Klishch M. Mechanisms of antitumor effect of novel heterocyclic compounds: *in silico* modeling, cytotoxic and immunomodulatory action *in vitro* and *in vivo* – Qualification scientific work on the rights of a manuscript.

The thesis for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty 091 – Biology – Institute of Cell Biology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, 2025.

The dissertation is aimed at studying the cytotoxic properties of new heterocyclic compounds *in vitro*, modeling their mechanisms of action *in silico*, and evaluating the ability of cellular vaccines prepared with these compounds to counteract the growth of tumors in model animals.

According to the International Agency for Research on Cancer, in 2022, about 20 million new cases of cancer were registered in the world, and deaths from various types of cancer reached 9.7 million. Over the past decades, cancer mortality has decreased significantly in developed countries due to the wider implementation of new diagnostic methods and increased availability of treatment. For example, in the United States, cancer mortality decreased by 34% between 1991 and 2022. However, oncological diseases remain a pressing medical problem on a global scale. According to forecasts by the World Health Organization, the number of new cancer cases may increase by 77% by 2050 and reach 35 million. Despite the development of new therapeutic approaches for the treatment of cancer, their effectiveness and selectivity remain limited. That is why the development of new approaches aimed at precisely targeting tumor-specific vulnerabilities is an important direction of modern pharmacology and medicine.

As a result of studies in the dissertation work, the conditions for the effectiveness of cellular vaccines created using new heterocyclic compounds (α-N-heterocyclic thiosemicarbazones) to counteract tumor growth in model mice were clarified. The mechanisms of antitumor action of α-N-heterocyclic thiosemicarbazones and

thiopyrano[2,3-d]thiazole derivatives are proposed based on *in silico* modeling, including their comparison with previously described antitumor drugs with experimentally confirmed mechanisms of action. The modeling results were supported by experimental data obtained using appropriate *in vitro* research methods.

The cytotoxic effect of COTI-NMe_2, a new α-N-heterocyclic thiosemicarbazone derivative, was 2–3 times more potent than the corresponding values for the COTI-2 derivative in CT26 cells and almost twice in wild-type B16F10 cells. Similar patterns were observed for HCT116 cells, whereas in the case of SW480, no significant difference between the studied thiosemicarbazone derivatives was found. Additionally, the cytotoxic properties of COTI-NMe_2 were evaluated against wild-type and isogenic B16F10/ADR mouse melanoma cell lines resistant to doxorubicin. The analysis of the results showed similar sensitivity of both cell lines to COTI-NMe_2, indicating that it is unlikely to interact with ABC transporters, which provide resistance of B16F10/ADR cells to doxorubicin.

Using molecular docking and molecular dynamics simulation, it was predicted that one of the possible mechanisms of COTI-NMe_2 antitumor action is the reactivation of mutant p53 protein, in particular in the presence of the R175H missense mutation. Immunofluorescence microscopy and Western blot analysis data confirmed the increase in the content of active p53 in HCT116 cell line. The thiopyrano[2,3-d]thiazole derivatives Les-6547 and Les-6557 demonstrated docking scores comparable to ligands with experimentally confirmed binding capability. A possible mechanism of their action was proposed to explain the experimental results, namely, inhibition of CDK2 kinase. This hypothesis was supported by experimental data obtained using clonogenic assay and flow cytometry methods, which confirmed that the antiproliferative properties of these compounds are due to cell cycle arrest in the G1/S phase.

Targeted cancer therapy using highly selective protein kinase inhibitors is currently considered one of the most promising methods of treating cancer. However, despite their high efficacy, which can lead to almost complete remission even in patients with stage 4

cancer, these drugs are powerless against aggressive tumor recurrence, which usually develops 9–14 months after the start of therapy (Zhong et al, 2021).

A possible way to overcome this problem is a combination approach that combines protein kinase inhibitors with other agents that can affect different tumor vulnerabilities. We hypothesize that an effective solution may be the use of thiopyrano[2,3-d]thiazole derivatives, which, according to the data obtained, can interact with cyclin-dependent protein kinases, in combination with new thiosemicarbazone derivatives that promote the reactivation of mutant p53 protein and induce immunogenic tumor cell death.

The assessment of the survival of tumor-free animals showed that the highest survival rate and the lowest incidence of tumor formation were observed in the group of mice immunized with B16F10 cells pretreated with COTI-NMe_2 (500 nM) for 48 hours. In addition, in animals immunized with such cells, in case of tumor development, their volume was significantly smaller compared to those who received B16F10 cells after a 24-hour incubation with the drug. Prolonged treatment of B16F10 cells with relatively low doses of COTI-NMe_2 (500 nM for 48 hours) contributes to more pronounced immunogenic outcomes of the B16F10 cells death compared to other combinations of concentration and exposure time. This confirms the absence of a direct relationship between the cytotoxicity of the drug and the immunogenicity of the dead cells.

In addition, it was found that an increase in the concentration of COTI-NMe_2 promotes the growth of phagocytic activity of J774.2 cells, but only when low doses (<10 nM) are used, which do not show a pronounced cytotoxic effect. This increase was manifested by an increase in the number of active J774.2 phagocytic cells that, after cultivation in conditioned medium, absorbed thermally inactivated yeast cells, although the average number of absorbed particles per phagocytic cell remained relatively unchanged.

We believe that the effect on tumor-specific vulnerabilities, including restoration of p53 protein function and reactivation of the immune system with new thiosemicarbazone derivatives *in vivo*, as well as targeted regulation of cyclin-dependent kinase activity with thiopyrano[2,3-d]thiazole derivatives, may contribute to the selective destruction of malignant cells with the appropriate characteristics. In the future, this opens up opportunities for the development of new, more effective strategies for targeted cancer therapy. The uniqueness of the proposed approach lies in the potential dual antitumor activity of thiosemicarbazones, which minimizes the risk of developing resistance to these drugs *in vivo*. Even in the case of repeated mutation of the *TP53* gene, which makes it insensitive to the action of these compounds, their immunogenic effect is preserved. Thus, in the long term, this approach has no analogues in the treatment of tumors characterized by overexpression of the mutated *TP53* gene and immunological tolerance.

Keywords: thiosemicarbazone, thiazole, carcinoma, cytotoxicity, immunomodulation, immunogenic cell death, phagocytosis, p53 mutations, p53 reactivation, molecular docking, molecular dynamics.

Список праць, опублікованих за темою дисертації

Статті у фахових періодичних виданнях, що проіндексовані у базах даних Web of Science Core Collection та/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** (Дисертант виконав основні дослідження *in vitro* та *in vivo*, спільно із науковим керівником та співавторами сформулював концепцію цієї роботи, проаналізував результати та підготував їх до публікації).

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, IF = 5.1** (Дисертант виконав частину аналізу *in silico*, яка включала молекулярний докінг, а також частину експериментів *in vitro*, що стосувалася дослідження антипроліферативних властивостей сполук (клоногенний аналіз), проаналізував відповідну частину результатів та підготував їх до публікації в статті і тезах).

Тези доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях, конгресах та наукових з'їздах:

1. **Klishch M.**, Skorokhyd N., Panchuk R., Stoika R. Study of capability of traditional and experimental antitumor drugs to induce immunogenic cell death in murine NK/Ly lymphoma [abstract]. 1st International Conference of Young Scientists of the Institute of Cell Biology and the University of Rzeszów "Current Issues in Cell Biology and Biotechnology". Lviv, Ukraine – Rzeszów, Poland, June 2, 2021.
2. **Klishch M.**, Skorokhyd N., Panchuk R., Stoika R. Comparative studies of thiosemicarbazone derivatives as potential inducers of immunogenic cell death in murine carcinomas [abstract]. Conference of Young Scientists of Institute of Cell Biology and University of Rzeszów. Lviv, Ukraine, May 25, 2023.
3. **Klishch M.**, Skorokhyd N., Panchuk R., Stoika R. Time and dose-dependent induction of immunogenic cell death in murine melanoma by a novel thiosemicarbazone derivative [abstract]. Conference of Young Scientists of Institute of Cell Biology and University of Rzeszów. Lviv, Ukraine, May 20, 2024.
4. **Klishch M.**, Skorokhyd N., Panchuk R., Stoika R. Induction of immunogenic cell death in murine melanoma by a novel thiosemicarbazone derivative [abstract]. In: 7th Congress of the All-Ukrainian Public Organization «Ukrainian Society of Cell

Biology» with international representation; 2024, Lviv, Ukraine. https://doi.org/10.30970/uscb.2024

5. Finiuk N., Barska M., Ivasechko I., Manko N., Klyuchivska O., **Klishch M.**, Lootsik M., Lesyk R., Maslyak Z., Stoika R. Response of isolated lymphocytes of patients with chronic lymphocytic leukemia to pyrrolidinedione-thiazolidinone hybrid Les-6287 compound [abstract]. In: 7th Congress of the All-Ukrainian Public Organization «Ukrainian Society of Cell Biology» with international representation; 2024, Lviv, Ukraine. https://doi.org/10.30970/uscb.2024

6. **Klishch M.**, Panchuk R., Stoika R. A novel thiosemicarbazone derivative as a potential reactivator of mutant p53: *in silico* evaluation [abstract]. VIII Scientific Conference "Latest Advances in Biotechnology", Kyiv Aviation Institute, Department of Biotechnology, Kyiv, Ukraine, April 25, 2025.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ 2
Список праць, опублікованих за темою дисертації 9
ЗМІСТ 12
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ 16
ВСТУП 20
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 28
1.1. Білок p53 як мішень у протипухлинній терапії 28
1.1.1. Роль TP53 та вплив мутацій 28
1.1.2. Терапевтичне обґрунтування реактивації p53 29
1.1.3. Роль прихованих сайтів у реактивації p53 29
1.1.4. Кишеня L1/S3 30
1.1.5. Обмеження наявних реактиваторів p53 31
1.1.6. Від COTI-2 до COTI-NMe_2: розробка нового похідного 32
1.2. Застосування похідних тіазолу у терапії раку товстого кишківника 34
1.2.1. Сучасні підходи до лікування колоректального раку 34
1.2.2. Перспективи застосування похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу як терапевтичних засобів 36
1.3. Імуногенна загибель пухлинних клітин (ІЗК), її механізми та роль у протипухлинній терапії 38
1.3.1. Молекулярні маркери ІЗК 39
1.3.2. Кальретикулін та його екстерналізація при ІЗК 42
1.3.3. Вивільнення HMGB1 при ІЗК 44
1.3.4. Позаклітинний АТФ у контексті ІЗК 47
1.3.5. Білки теплового шоку в ІЗК 49

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ 51
2.1. Досліджувані сполуки 51
2.2. Культивування клітин 54
2.3. Лімфоцити периферичної крові людини: виділення та культивування .. 55
2.4. Тест МТТ та тест на утворення колоній 56
2.5. Аналіз клітинного циклу 57
2.6. Метод виключення трипанового синього 58
2.7. Молекулярний докінг 59
2.7.1. Використання молекулярного докінгу для оцінки селективності лігандів 59
2.7.2. Застосування молекулярного докінгу для пошуку молекулярних мішеней 60
2.8. Симуляція молекулярної динаміки 62
2.9. Імунофлуоресцентний аналіз 63
2.10. Вестерн-блот-аналіз 63
2.11. Імунізація тварин 64
2.12. Дослідження фагоцитарної активності 66
2.13. Статистичний аналіз даних 68
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ 69
3.1. Селективна цитотоксичність тіопірано[2,3-d]тіазолів до клітин колоректального раку 69
3.2. Моделювання молекулярних механізмів протипухлинної дії нових тіопірано[2,3-d]тіазолів 75
3.2.1. Прогнозування молекулярних мішеней 75
3.2.2. Взаємодія із циклін-залежними кіназами як потенційних механізм дії нових тіопірано[2,3-d]тіазолів 77

3.3. Тіопірано[2,3-d]тіазоли інгібують проліферацію клітин колоректальної аденокарциноми людини 79
3.4. Тіопірано[2,3-d]тіазоли індукують зупинку клітинного циклу в клітинах колоректального раку людини 82
3.5. Дослідження цитотоксичної дії α-N-гетероциклічних тіосемікарбазонів 85
3.6. Моделювання механізму реактивації мутантних форм білка p53 за участю нових α-N-гетероциклічних тіосемікарбазонів 89
3.6.1. Селективність відомих реактиваторів p53 до кишені L1/S3 89
3.6.2. Передбачається, що COTI-NMe_2 селективно зв'язується з кишенею L1/S3 91
3.6.3. Конформаційні відмінності в кишені L1/S3 у різних варіантах p53 та їх значення для передбачуваної селективності 94
3.6.4. COTI-NMe_2 стабілізує конформацію структурного мутанта p53 R175H 96
3.6.5. Прогнозована стабільність комплексу p53 R175H – COTI-NMe_2 97
3.7. Вплив COTI-NMe_2 на внутрішньоклітинну локалізацію білка p53 та його реактивацію 101
3.8. Імуномодулююча дія α-N-гетероциклічних тіосемікарбазонів 104
3.8.1. Дослідження резистентності до росту трансплантованих пухлин в експериментальних тварин 104
3.8.2. Вплив на фагоцитарну активність 107
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ 114
ВИСНОВКИ 118
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 119
ДОДАТОК 1. СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ

ДИСЕРТАЦІЇ..... 143
ДОДАТОК 2. РЕЗУЛЬТАТИ АНАЛІЗУ IN SILICO 144

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АДФ – аденозиндифосфат

АМФ – аденозинмонофосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

АФО – активні форми оксигену

ДК – дендритні клітини

ДМСО – диметилсульфоксид

ЕР – ендоплазматичний ретикулум

ІЗК – імуногенна загибель клітин

ККЛ – ко-кристалізований ліганд

ABC – АТФ-зв’язувальна касета

AKT – серин/треонінова протеїнкіназа 1

ANOVA – дисперсійний аналіз

ATCC – Американська колекція типових культур

ATG5 – білок аутофагії 5

ATG7 – білок аутофагії 7

BAK1 – BCL2-антагоніст/кілер 1

BAX – BCL2-асоційований білок X

BCAP31 – білок, асоційований з рецептором В-клітин

BCL2 – асоційований білок В--клітинної лейкемії 2

BECN1 – беклін-1

CASP-1 – каспаза-1

CASP-8 – каспаза-8

CD4+ Т-лімфоцити – Т-хелпери

CD8+ Т-лімфоцити – цитотоксичні Т-лімфоцити

CD91 (LRP1) – кластер диференціації 91 (білок, споріднений із рецептором ліпопротеїнів низької густини)

CHARMM36 – Гарвардське силове поле макромолекулярної механіки, версія 36

ChEMBL – база даних біоактивних молекул

CML – мова розмітки хімічних структур

COTI-2 – сполука 2, синтезована компанією Critical Outcome Technologies Inc.

COTI-NMe_2 – диметильоване похідне COTI-2

CRISPR/Cas9 – кластеризовані регулярно розділені короткі паліндромні повтори / CRISPR-асоційований білок 9

CRT – кальретикулін

CTLA-4 – білок 4, асоційований із цитотоксичними Т-лімфоцитами

DAMP – молекулярні патерни, пов’язані з ушкодженням

DAPI – 4',6-діамідино-2-феніліндол – флуоресцентний барвник ДНК

DMEM – середовище Ігла у модифікації Дульбекко

eIF2α – еукаріотичний ініціаторний фактор 2 альфа

FBS – фетальна сироватка великої рогатої худоби

FDA – Управління з продовольства і медикаментів США

HBSS – збалансований сольовий розчин Хенкса

HMGB1 – білок високомобільної групи 1

HSP70 – білок теплового шоку 70

HSP90 – білок теплового шоку 90

ICAM-1 – міжклітинна молекула адгезії 1

IFN-γ – інтерферон-гамма

IL-15 – інтерлейкін-15

IL-18 – інтерлейкін-18

IL-1β – інтерлейкін-1 бета

LAMP1 – лізосомально-асоційований мембранний білок 1

Les-6547 – похідне тіопірано[2,3-d]тіазолу 6547

Les-6557 – похідне тіопірано[2,3-d]тіазолу 6557

McCoy's 5A – Культуральне середовище McCoy's 5A

MHC-I – головний комплекс гістосумісності класу I

MMFF – молекулярне силове поле Merck

MQ – 2-метилен-3-хінуклідинон

MSI – мікросателітно-нестабільний

MSS – мікросателітно-стабільний

mTOR – мішень рапаміцину ссавців

MTT – 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій бромід

MyD88 – білок первинної відповіді на мієлоїдну диференціацію

NF-κB – ядерний фактор каппа B

NK – природні кілери

NLRP3 – NLR-подібний рецептор з піриновим доменом 3

NPT – ансамбль із фіксованим числом частинок, тиском і температурою

NVT – ансамбль із фіксованим числом частинок, об’ємом і температурою

P2RX7 – пуринергічний рецептор P2X7

P2RY2 – пуринергічний рецептор P2Y2

PANX1 – паннексин-1

PBS – фосфатно-сольовий буферний розчин

PDB – банк даних білкових структур

PDBQT – модифікація формату PDB із анотацією часткових зарядів (Q) та типів атомів (T)

PERK – PRK-подібна кіназа ендоплазматичного ретикулуму

PI3K – фосфатидилінозитол-3-кіназа

PMSF – фенілметилсульфонілфторид

PRR – рецептори розпізнавання патернів

RAC1 – субстрат 1 ботулотоксину C3, споріднений із Ras

RAGE – рецептор кінцевих продуктів глікації

RMSD – середньоквадратичне відхилення (координат атомів)

ROCK1 – Rho-асоційована протеїнкіназа 1

RPMI-1640 – середовище 1640 Меморіального інституту Розуелл-Парк для культивування клітин

SPR – поверхневий плазмонний резонанс

STIMA-1 – 2-етеніл-3H-хіназолін-4-он

TIP3P – переносний міжмолекулярний потенціал із 3-ма точками

TLR2 – Toll-подібний рецептор 2

TLR4 – Toll-подібний рецептор 4

TP53 – ген-супресор пухлин, що кодує білок p53

UFF – універсальне силове поле

V-rescale – термостат із масштабуванням швидкостей

VCAM-1 – судинна молекула адгезії 1

ZMC1 – цинк-зв'язувальний металошаперон 1

ZMC2 – цинк-зв'язувальний металошаперон 2

ВСТУП

Актуальність теми

Згідно з даними Міжнародного агентства з вивчення раку, у 2022 році у світі було задокументовано близько 20 млн нових випадків онкологічних захворювань, а кількість смертей від різних видів раку становила 9.7 млн. Одним із найпоширеніших є рак товстої та прямої кишки (колоректальний рак), який у 2022 році посів третє місце за поширеністю у світі (9.6% усіх випадків раку) та друге місце за смертністю (9.3% смертей).

Протягом останніх десятиліть у розвинених країнах відбулося помітне зниження смертності від раку за рахунок ширшого впровадження скринінгу та збільшення доступності лікування. Зокрема, у США протягом 1991-2022 рр. смертність від онкологічних захворювань зменшилась на 34%. Проте на глобальному рівні проблема раку залишається актуальною. Згідно з прогнозами Всесвітньої організації охорони здоров'я, середньорічна частота нових випадків раку досягне 35 млн у 2050 році, що на 77% більше, ніж у 2022 році.

Проте попри розробку нових терапевтичних підходів, спрямованих на лікування раку, їхня ефективність залишається обмеженою. Зокрема, впровадження надзвичайно дорогих моноклональних антитіл та інгібіторів протеїнкінази забезпечило збільшення середньої тривалості життя онкопацієнтів лише на 2–5% порівняно з традиційною хіміотерапією. Також актуальною залишається проблема селективності дії хіміотерапевтичних препаратів. Саме тому розробка нових підходів, спрямованих на адресне націлювання пухлиноспецифічних вразливостей, а також їх поєднання для досягнення синергічного ефекту, є критично важливими напрямками сучасної фармакології та медицини.

Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами

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 рр.); українсько-австрійського білатерального науково-дослідного проєкту «Подвійна дія на специфічні вразливості злоякісних клітин новими похідними тіосемікарбазону» (реєстраційний номер 0124U003513, 2022-2024 рр.) 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 тіазолу і 4-тіазолідинону)» (реєстраційний номер 0120U103077, 2020-2024 рр.); НДР «Молекулярний дизайн, синтез і доклінічні випробування нових похідних тіазолу і тіазолідинону із селективною дією на клітини мієлопроліферативних новоутворень» (реєстраційний номер 0124U003835, 2024-2026 рр.), підтриманого грантом Національного фонду досліджень України (договір про надання грантової підтримки № 204/0104 від 01 серпня 2024 року).

Мета і завдання дослідження

Метою роботи є дослідження цитотоксичних властивостей нових гетероциклічних сполук *in vitro*, моделювання механізмів їхньої дії *in silico* та оцінку здатності клітинних вакцин, виготовлених з використанням цих сполук, протидіяти росту новоутворень в експериментальних тварин.

Для досягнення зазначеної мети було поставлено наступні завдання:

1. Дослідити цитотоксичні властивості нових похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу та запропонувати можливі механізми їх протипухлинної дії на основі результатів моделювання *in silico*.

2. Провести експериментальну верифікацію передбачених механізмів дії нових похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу з використанням клоногенного аналізу та проточної цитометрії.

3. Оцінити цитотоксичні властивості COTI-NMe_2 – нового α-N-гетероциклічного похідного тіосемікарбазону – щодо різних ліній пухлинних клітин у порівнянні з α-N-гетероциклічними тіосемікарбазонами COTI-2 та тріапіном.

4. Застосовуючи методи молекулярного докінгу та молекулярної динаміки, дослідити можливу здатність сполуки COTI-NMe_2 активувати мутантні форми білка p53, порівнявши COTI-NMe_2 із відомими реактиваторами p53 з експериментально підтвердженим механізмом дії.

5. Підтвердити здатність COTI-NMe_2 активувати мутантні форми білка p53 з використанням методів імунофлюоресцентної мікроскопії та Вестерн-блот-аналізу.

6. Дослідити імуногенні наслідки загибелі пухлинних клітин під впливом COTI-NMe_2 *in vivo*, перевіривши здатність клітин меланоми B16F10, оброблених COTI-NMe_2, індукувати стійкість до росту трансплантованих пухлин у експериментальних тварин.

7. Дослідити імуногенні наслідки загибелі клітин під впливом COTI-NMe_2 *in vitro* та її вплив на фагоцитарну активність із використанням модельної лінії макрофагів миші J774.2.

Об'єкт дослідження

Протипухлинна дія нових гетероциклічних сполук, а саме α-N-гетероциклічних похідних тіосемікарбазону та похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу.

Предмет дослідження

Механізми дії та потенційні молекулярні мішені нових похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу та α-N-гетероциклічних похідних тіосемікарбазону, зокрема подвійна дія на специфічні вразливості пухлинних клітин шляхом активації мутантних форм білка p53 та індукції імуногенної загибелі клітин.

Методи дослідження

Для оцінки цитотоксичної дії досліджуваних сполук було використано метод визначення некротичних клітин за виключенням барвника трипанового синього, а також МТТ-тест. Для передбачення можливих механізмів дії сполук були використані методи *in silico*, такі як молекулярний докінг та симуляція молекулярної динаміки. Молекулярний докінг використовувався як для оцінки селективності зв'язування сполуки з білком-мішенню, для пошуку найбільш імовірних білків-мішеней у вибірці та для порівняння передбачених властивостей досліджуваних сполук із речовинами та препаратами з експериментально підтвердженими властивостями. Симуляцію молекулярної динаміки застосовували для оцінки стабільності комплексів, передбачених за допомогою молекулярного докінгу, а також для оцінки впливу ліганда на конформаційну стабільність мутантного білка. Для дослідження антипроліферативних властивостей похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу використовували клоногенний аналіз та проточну цитометрію. Для експериментального дослідження впливу COTI-NMe_2 на реактивацію мутантних форм білка p53 було застосовано методи імунофлюоресцентної мікроскопії та аналіз Вестерн-блот. Для оцінки імуномодуляторної дії COTI-NMe_2 були використані як методи *in vitro*, так і *in vivo*.

Щоб оцінити вплив COTI-NMe_2 на процес фагоцитозу, було застосовано метод оцінки фагоцитарної активності мишачих макрофагів лінії J774.2 із використанням термоінактивованих дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* як об'єкта фагоцитозу. У цьому експерименті також було використано метод фазово-контрастної мікроскопії. Для оцінки імунізації *in vivo* використано метод клітинних вакцин на основі мишачої меланоми лінії B16F10 та з використанням мишей лінії C57BL/6. В роботі також були застосовані методи автоматизованого гематологічного аналізу. Статистичну обробку результатів та їхнє графічне представлення було виконано за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism 9, а також з використанням бібліотеки Matplotlib 3.10.1 у середовищі Python 3.10.

Наукова новизна отриманих результатів

У дисертаційній роботі вперше запропоновано і обґрунтовано механізм цитотоксичної дії нового α-N-гетероциклічного похідного тіосемікарбазону COTI-NMe_2, 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-NMe_2 на злоякісні клітини різних ліній карцином миші та людини, передусім карцином колоректального походження, та проведено порівняння властивостей COTI-NMe_2 із властивостями раніше описаних α-N-гетероциклічних похідних тіосемікарбазону. Продемонстровано участь COTI-NMe_2 у розвитку резистентності до росту трансплантованих пухлин у експериментальних тварин та здатність посилювати фагоцитоз *in vitro.* Таким чином, встановлено здатність низьких доз COTI-NMe_2 індукувати імуногенну загибель пухлинних клітин.

Практичне значення отриманих 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 вибірковому знищенню злоякісних клітин із зазначеними ознаками.

Особистий внесок здобувача

Дисертант Кліщ М. В. самостійно зібрав і опрацював наукову літературу, пов'язану з темою дисертаційної роботи. Разом із науковим керівником, член-кореспондентом НАН України Стойкою Р. С. та д.б.н. Панчуком Р. Р., було розроблено план досліджень і визначено оптимальні методи для їх виконання. Дисертант самостійно провів усі етапи аналізу *in silico*, представлені в дисертації, адаптувавши методику молекулярного докінгу для виконання поставлених завдань, Дисертант самостійно виконав основну частину експериментальної роботи і сформулював ключові висновки, а також провів аналіз отриманих результатів та підготував їх графічне представлення. Спільно із науковим керівником та співавторами за результатами досліджень було підготовлено до друку наукові публікації. Частина експериментальної роботи була проведена у співпраці із працівниками відділу Регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини НАН України. Зокрема, частину експериментів із визначення цитотоксичності сполук, а також експерименти *in vivo*, включно з гематологічним аналізом, було проведено у співпраці із провідним інженером Скорохід Н. Р. Частину експериментів із використанням фазово-контрастної мікроскопії проведено у співпраці із провідним інженером Ключівською О. Ю. Експерименти з використанням методів імунофлуоресцентної мікроскопії та Вестерн-блот-аналізу було проведено у співпраці з д.б.н. Панчуком Р. Р. Частину експериментів з вивчення антипроліферативних властивостей похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу було проведено у співпраці з науковим співробітником, к.б.н. Фінюк Н. С. та молодшим науковим співробітником, к.б.н. Козак Ю. С.

Апробація матеріалів дисертації

Результати досліджень, проведених в рамках дисертаційної роботи, були представлені, окрім наукових статей, також у формі тез, усних і стендових доповідей на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях та з'їздах: 1-ій

міжнародній конференції молодих вчених Інституту біології клітини та Жешувського університету «Актуальні питання клітинної біології та біотехнології» (Львів, Україна – Жешув, Польща, 2 червня 2021 р.); Конференції молодих вчених Інституту біології клітини та Жешувського університету (Львів, Україна – Жешув, Польща, 25 травня 2023 р.); Конференції молодих вчених Інституту біології клітини та Жешувського університету. (Львів, Україна – Жешув, Польща, 20 травня 2024 р.); 7-му з'їзді Всеукраїнської громадської організації «Українське товариство клітинної біології» з міжнародним представництвом (Львів, Україна, 2024); 8-ї наукової конференції «Новітні досягнення біотехнології» кафедри біотехнології Державного університету «Київський авіаційний інститут» (Київ, Україна, 25 квітня 2025 р.).

Публікації. 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.

Структура та обсяг дисертації. 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.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Білок p53 як мішень у протипухлинній терапії

1.1.1. Роль *TP53* та вплив мутацій

Ген *TP53* є супресором пухлин, який кодує структуру білка p53, фактора транскрипції, який часто називають «охоронцем геному». Він відіграє ключову роль в апоптозі, старінні, зупинці клітинного циклу та репарації ДНК (Hernández Borrero & El-Deiry, 2021). Тому багато протипухлинних препаратів діють, активуючи стрес-індуковану загибель клітин, що запускається білком p53. Однак цей механізм часто порушується, оскільки мутації в гені *TP53* спостерігаються в 50-60% пухлин людини (Baugh et al., 2017). Вони спричиняють втрату функціонального білка p53 або появу його мутантних форм. Ці мутантні білки можуть пригнічувати активність залишкового p53 дикого типу, або набувати нових властивостей, які сприяють росту пухлини, метастазуванню та розвитку резистентності до хіміотерапії (Dolma & Muller, 2022). Зниження чутливості до хіміотерапії, що пов'язане з експресією мутантного варіанту p53, було виявлено в різних типах первинних пухлин, включаючи рак молочної залози (Bergh et al., 1995), яєчників (Righetti et al., 1996) і кровотворних органів (Wattel et al., 1994). Найбільш небезпечними вважаються міссенс-мутації в гені *TP53*, оскільки вони зазвичай призводять до експресії стабільних мутантних білків p53, які відрізняються від дикого типу заміною лише однієї амінокислоти, але мають значно довший період напівжиття. Зазвичай такі мутації виникають у кількох «гарячих точках»: вісім найпоширеніших міссенс-мутацій зустрічаються у п'яти кодонах: 175, 245, 248, 273 і 282 (Varley et al., 1999), та разом становлять 27,74% усіх міссенс-мутацій гена *TP53*, тоді як на найпоширенішу мутацію R175H припадає 5,6% від загальної кількості випадків (Baugh et al., 2017). Залежно від впливу, мутації p53 поділяють на структурні та контактні. Контактні мутації спричиняють заміну амінокислотних залишків, які безпосередньо взаємодіють з ДНК. Такі мутації,

наприклад, p53 R273H, призводять до втрати здатності p53 зв'язуватися із ДНК. Структурні або конформаційні мутації призводять до заміни залишків амінокислот, які підтримують нативну конформацію білка. Ці мутації, такі як p53 R175H, призводять до накопичення неправильно згорнутих білків (Chen et al., 2022).

1.1.2. Терапевтичне обґрунтування реактивації p53

Мутантний p53 є складною терапевтичною мішенню через відсутність алостеричних сайтів для інгібування, термодинамічну нестабільність, яка властива його мутантним формам, а також здатність надавати пухлинам множинну резистентність до ліків (Phatak et al., 2021; Gomes et al., 2021; He et al., 2017). Незважаючи на це, було продемонстровано, що певні сполуки здатні взаємодіяти з мутантним p53 і відновлювати функції, притаманні білку p53 дикого типу. Така реактивація мутантного p53 досягається шляхом згортання білка в конформацію дикого типу, що відновлює його здатність до специфічного зв’язування відповідних сайтів ДНК та функції супресора пухлин.

1.1.3. Роль прихованих сайтів у реактивації p53

p53 тривалий час вважався складною потенційною мішенню для ліків через відсутність чітко визначених алостеричних сайтів для малих лігандів (Hassin & Oren, 2022). Сайти зв'язування реактиваторів p53 зазвичай є прихованими і часто їх не вдається виявити у статичній кристалічній структурі білка, що не зв’язаний з лігандом (Bernini et al., 2014). Тому моделювання молекулярної динаміки, яке враховує конформаційну гнучкість білка, є особливо корисним для прогнозування таких непостійних, тимчасово відкритих сайтів зв'язування. Рідкісним винятком є кишеня у тривимірній структурі мутантного білка p53 Y220C, із якою зв'язується похідне карбазолу PhiKan083. Цей сайт був виявлений за допомогою аналізу кристалічної структури без застосування симуляції молекулярної динаміки (Boeckler et al., 2008). Проте навіть ця структура містить динамічну тимчасово

відкриту додаткову гідрофобну кишеню, яку раніше не вдавалося виявити і яка є продовженням раніше описаної основної кишені. (Joerger et al., 2015). Подальші дослідження уможливили відкриття інших сполук, що зв'язують кишеню Y220C, таких яких резатапопт (rezatapopt, PC14586), який перебуває на другій фазі клінічних випробувань (Ma et al., 2025). Проте сайт зв'язування в p53 Y220C є унікальним для цього мутанта, і сполуки, які націлені на нього, є специфічними для кишені Y220C і не здатні до реактивації p53 з іншими міссенс-мутаціями. В іншому дослідженні було передбачено, що похідні тіосемікарбазону ZMC1 і ZMC2, які реактивують p53, можуть зв'язуватися з двома новими динамічними сайтами p53 R175H, в областях L2/L3 і L1/H2, відповідно (Das & Mukhopadhyay, 2023).

1.1.4. Кишеня L1/S3

Одним із найбільш досліджених динамічних сайтів зв’язування є так звана кишеня L1/S3, що утворений відповідними елементами вторинної структури білка – петлею L1 та β-складчастою структурою S3. L1/S3 – це динамічна гідрофобна кишеня, існування якої було передбачене Вассманом та колегами на основі молекулярної динаміки (Wassman et al., 2013) як сайт зв'язування стиктової кислоти, а також, імовірно, кількох інших відомих реактиваторів мутантних p53. Цей сайт формується навколо залишка Cys124 за рахунок конформаційних змін залишків Ser116, Thr123, Cys124, Thr140 і особливо Leu114. На відміну від кишені Y220C, кишеня L1/S3 не є унікальною для одного мутанта p53 і була виявлена в траєкторіях симуляції молекулярної динаміки як p53 дикого типу, так і мутантних форм p53 R175H, R273H і G245H. Однак переважаючі конформації кишені L1/S3 відрізняються в цих варіантах p53, і не всі вони однаково сприятливі для зв'язування лігандів-реактиваторів p53. Наприклад, положення Leu114 в p53 G245H змінює структуру кишені L1/S3 таким чином, що вона майже не здатна зв'язуватися із лігандами, тоді як для мутантної форми p53 R175H конформація цього сайту є значно більш сприятливою. Здатність стиктової кислоти реактивувати мутантний

p53 R175H була підтверджена експериментально (Wassman et al., 2013). Це свідчить про те, що кишеня L1/S3 як передбачуваний сайт для стиктової кислоти є особливо важливим для відновлення функціональної активності p53 за наявності мутації R175H.

Кишеня L1/S3 була успішно використана для скринінгу *in silico* інших сполук, що реактивують p53. Яскравим прикладом є UCI-LC0023, який, як було продемонстровано, реактивує різні мутантні форми p53 і безпосередньо зв'язується з білком (Durairaj et al., 2022). В іншому дослідженні аналіз *in silico* з використанням структури p53 дикого типу з відкритою кишенею L1/S3 посприяв відкриттю p53-реактивуючих властивостей торіліну (torilin). Ця сполука здатна підвищувати рівень активного p53 в ракових клітинах, що синтезують білок p53 дикого типу, проте її вплив на функціональну активність мутантної форми білка p53 R175H виявлено не було (Li et al., 2019).

Враховуючи переважання динамічних кишень серед сайтів зв'язування реактиваторів p53, в наших дослідженнях *in silico* ми не покладалися на кристалічні структури p53. Замість цього, ми зосередили увагу на кишені L1/S3 як на найбільш ймовірному сайті зв'язування і використали структури p53, що вже використовувалися у попередніх дослідженнях (Wassman et al., 2013). Ці структури отримані на основі симуляції молекулярної динаміки і репрезентують найбільш чисельні кластери з відкритою кишенею L1/S3.

1.1.5. Обмеження наявних реактиваторів p53

Значна частина раніше вивчених реактиваторів p53 є акцепторами Міхаеля з тіоловою реактивністю яка, з одного боку, може забезпечувати додаткові механізми протипухлинної дії через вплив на окисно-відновний баланс пухлинних клітин (Fallatah et al., 2023), проте з іншого боку, вона знижує селективність таких сполук. Винятками є похідне бензімідазолу UCI-LC0045 та похідне тіосемікарбазону COTI-2, механізми дії яких відрізняються від тіол-реактивних реактиваторів p53 (Durairaj

et al., 2022; Lindemann et al., 2019). Відкриття нових сполук-реактиваторів p53, які не є акцепторами Міхаеля і мають вищу селективність, має вирішальне значення для розробки ефективної терапії.

1.1.6. Від COTI-2 до COTI-NMe_2: розробка нового похідного

COTI-2 – це α-N-гетероциклічне похідне тіосемікарбазону, що проявляє цитотоксичну дію до багатьох ліній пухлинних клітин і перебуває на стадії Ib клінічного дослідження (Salim et al., 2016; Maleki et al., 2018). Для COTI-2 притаманні щонайменше два механізми дії, а саме mTOR-залежний та p53-залежний шляхи (Lindemann et al., 2019). COTI-2 може індукувати рефолдинг мутантного p53 до конформації дикого типу, що було підтверджено за допомогою специфічних антитіл (Synnott et al., 2018). Одним із ймовірних механізмів реактивації p53 під дією COTI-2 є утворення хелатів із іонами Zn^{2+}, які здатні дифундувати через цитоплазматичну мембрану, що призводить до зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів Zn^{2+}. Таким чином COTI-2, ймовірно, діє як металошаперон. Такий механізм дії описаний для інших α-N-гетероциклічних тіосемікарбазонів, таких як ZMC1 та ZMC2 (Yu et al., 2017). Однак дослідження SPR-спектроскопії свідчать про те, що COTI-2 може також проявляти свою дію через безпосереднє зв'язування із p53 (Synnott et al., 2019).

Незважаючи на багатообіцяючі характеристики, дія COTI-2 може пригнічуватися через мультирезистентність деяких ракових клітин, що забезпечується АТФ-зв’язувальними касетними транспортерами, або ABC-транспортерами (ATP-binding cassette transporters) (Nunes et al., 2020). Це підкреслює необхідність розробки нових похідних з кращими профілями резистентності. Найбільш перспективною серед кількох досліджуваних похідних виявилася сполука COTI-NMe_2 (Pósa et al., 2022). Наші дослідження *in silico* були зосереджені на COTI-NMe_2 як на основній сполуці, проте включали порівняння її прогнозованих властивостей із властивостями α-N-гетероциклічних похідних

COTI-2 та ZMC2. Кожна з цих двох сполук демонструє структурну схожість із однією з двох груп у молекулі COTI-NMe_2, тому згадане порівняння є важливим для визначення можливих структурно-функціональних взаємозв’язків.

1.2. Застосування похідних тіазолу у терапії раку товстого кишківника

1.2.1. Сучасні підходи до лікування колоректального раку

За даними Міжнародного агентства з вивчення раку (International Agency for Research on Cancer, IARC), рак товстої та прямої кишки (колоректальний рак) є третім за поширеністю онкологічним захворюванням серед чоловіків і жінок – після раку легенів, раку молочної залози у жінок і раку передміхурової залози у чоловіків (Bray et al., 2024). Станом на 2022 рік на колоректальний рак припадало 9,3% смертей від раку в усьому світі, що робить його другим за смертністю після раку легенів (Menon et al., 2024). Впровадження та поширення колоноскопічного скринінгу сприяло поступовому зниженню захворюваності на колоректальний рак у розвинених країнах. Тим не менш, він залишається серйозною проблемою громадського здоров'я, а його частота серед дорослих віком до 50 років зростає (Stoffel & Murphy, 2020; Lingas, 2023; Siegel et al., 2023).

Терапевтичні підходи до лікування колоректального раку включають хірургічне втручання, хіміотерапію, променеву терапію, таргетну терапію та імунотерапію. Променева терапія зазвичай використовується для лікування раку прямої кишки, але цей підхід рідко застосовується для лікування раку товстої кишки. Хірургічна резекція залишається стандартним підходом, в першу чергу для локалізованого раку товстої кишки на ранніх стадіях (стадії 0, I, II). Однак хіміотерапія часто є необхідним доповненням до хірургічного втручання, особливо на пізніх стадіях прогресування раку (III, IV стадії та II стадія високого ризику) (Menon & Cagir, 2024).

Найчастіше хіміотерапію застосовують після хірургічної резекції пухлини (ад'ювантна хіміотерапія) для лікування раку товстої кишки III та IV стадії, рідше на II стадії за наявності відповідних показань (Liu et al., 2019). Для ад'ювантної хіміотерапії зазвичай використовують 5-фторурацил, лейковорин, оксаліплатин,

капецитабін та іринотекан. У більшості випадків їх застосовують у комбінованих схемах лікування, що включають 2-4 препарати. Наприклад, хірургічна резекція колоректального раку III стадії часто супроводжується терапією FOLFOX (5-фторурацил, лейковорин і оксаліплатин) або CapeOx (капецитабін і оксаліплатин) (Kagawa et al., 2024). Сам по собі оксаліплатин має дуже обмежену ефективність при колоректальному раку. Однак у поєднанні з 5-фторурацилом і лейковорином, він підвищує терапевтичний ефект цих препаратів, що було продемонстровано в клінічних дослідженнях III фази (Menon & Cagir, 2024).

Окрім традиційних методів лікування, було розроблено ряд перспективних неінвазивних методів лікування колоректального раку, таких як сфокусована ультразвукова терапія стала (Farooqi et al., 2024). Безпека та ефективність сфокусованої ультразвукової терапії у лікуванні колоректального раку були підтверджені доклінічними та клінічними дослідженнями (Zhang et al., 2022). Цей метод терапії посилює цільову доставку хіміотерапевтичних препаратів, включаючи 5-фторурацил, оксаліплатин і доксорубіцин, що призводить до більш ефективного зменшення розмірів пухлини і поліпшення результатів виживання в моделях на тваринах (Ebrahimi et al., 2023). Фокусована ультразвукова терапія також може впливати на імунну відповідь і мікрооточення пухлини (Farooqi et al., 2024).

Неоад'ювантна хіміотерапія та неоад'ювантна імунотерапія є одними з нових терапевтичних підходів, які призначають перед операцією. Клінічне випробування FOxTROT III фази є найбільш відомим нещодавнім прикладом неоад'ювантної хіміотерапії раку товстої кишки (Morton et al., 2023; Ballal & Saklani, 2024). Неоад'ювантна імунотерапія використовує препарати моноклональних антитіл, такі як ніволумаб, пембролізумаб та іпілімумаб з метою впливу на рецептор запрограмованої клітинної загибелі 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) та білок 4, асоційований із цитотоксичними Т-лімфоцитами (cytotoxic T-lymphocyte

associated protein 4, CTLA-4), що посилює протипухлинний імунітет (Kanani et al., 2021). Рецептор епідермального фактору росту (EGFR) на поверхні ракових клітинах теж є зручною мішенню для препаратів. Ряд клінічних випробувань III фази продемонстрували ефективність препаратів на основі EGFR-специфічних моноклональних антитіл – панітумумабу та цетуксимабу. Було підтверджено їх ефективність як у комбінаціях з 5-фторурацилом, лейковорином та іринотеканом, так і при застосуванні окремо від інших препаратів (Cutsem et al., 2010; Wilke et al., 2008; Arnold et al., 2017).

Клітини колоректального раку часто характеризуються мутаціями в онкогені *KRAS* та гені-супресорі пухлин *TP53*, які досліджуються як потенційні мішені для генної терапії (Hasbullah & Musa, 2021). Також досліджується потенціал застосування CRISPR/Cas9 в генній терапії колоректального раку (Hu et al., 2023). Розробка нових методів лікування раку товстої кишки може отримати значну користь від нових методів скринінгу *in vitro*, таких як мікрофізіологічні системи (Ramos et al., 2023).

Серед проблем хіміотерапевтичних препаратів, які застосовують для лікування колоректального раку, є їх нецільова дія та токсичні побічні ефекти, такі як нейротоксичність, шлунково-кишкова токсичність, еритема, діарея, нудота, нейтропенія, тромбоцитопенія та інші гематологічні розлади (Adebayo et al., 2023; Tofthagen, 2010; Cisterna et al., 2016). Це підкреслює важливість пошуку та розробки нових, більш селективних хіміотерапевтичних препаратів з меншою загальною токсичністю та покращеним терапевтичним індексом.

1.2.2. Перспективи застосування похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу як терапевтичних засобів

Похідні тіазолу та їхні близькі за структурою аналоги становлять особливий інтерес для пошуку нових протиракових препаратів. Показано, що тіазольне кільце

є зручним каркасом для синтезу біологічно активних сполук. Станом на 2021 рік існувало 18 терапевтичних засобів, схвалених Управлінням із продовольства і медикаментів США (Food and Drug Administration, FDA), а також та численні експериментальні препарати, молекули яких містять тіазольний гетероцикл (Petrou et al., 2021). Похідні тіазолу також заслуговують на увагу в пошуку потенційних біологічно активних сполук. Ці сполуки мають широкий спектр біологічної активності, причому багато з них демонструють протиракові властивості. Для частини з них також встановлено потенційні біомішені (Jain et al., 2018). В одному з досліджень похідні імідазо[2,1-b]тіазолу були оцінені як інгібітори рецептора тирозинкінази EGFR, важливої терапевтичної мішені в лікуванні колоректального раку (Sabry et al., 2022). Щодо похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу, інтерес до їхнього вивчення зумовлений їхнім потенціалом як протипухлинних засобів, що включають різні фармакофорні фрагменти, в тому числі фрагменти природних молекул, таких як похідні нафтохінону. Для ряду похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу було виявлено різні механізми протипухлинної дії, зокрема інгібування трансформуючого фактора росту бета (TGF-β) (Ivasechko et al., 2023), людської карбоангідрази IX і XII (Metwally & El-Desoky, 2023), полімеризації тубуліну (Metwally et al., 2022) та активації рецепторів PPARγ (Szychowski et al., 2021).

1.3. Імуногенна загибель пухлинних клітин (ІЗК), її механізми та роль у протипухлинній терапії

На відміну від апоптозу, найбільш вивченого типу регульованої загибелі клітин, який довгий час вважався неімуногенним і толерогенним (Serrano-del Valle et al., 2019), імуногенна загибель клітин (ІЗК) супроводжується вивільненням молекулярних структур (патернів), пов’язаних з ушкодженням (damage-associated molecular patterns, DAMP). Ці молекули сприяють презентації антигенів та подальшому фагоцитозу, таким чином активуючи вроджену та набуту імунну відповідь. Ця відповідь спрямована не лише проти клітин, що гинуть, а також проти життєздатних клітин з тієї самої популяції з аналогічним антигенним профілем.

Імуногенність є ключовою ознакою некрозу та некроптозу. Однак, на відміну від некрозу, ІЗК є регульованим процесом. Крім того, деякі етапи вивільнення DAMP при ІЗК є каспазозалежними і залежать, зокрема, від каспази-8 (CASP-8), ініціаторної каспази екзогенного шляху апоптозу (Fucikova et al., 2020). Враховуючи цей та інші факти, ІЗК іноді класифікують як імуногенний апоптоз (Green et al., 2009; Galluzzi et al., 2017). Однак це визначення не зовсім точне. Деякі інші шляхи регульованої загибелі клітин, такі як некроптоз, піроптоз і фероптоз, демонструють патерни вивільнення DAMP, характерні для ІЗК (Choi et al., 2023). Було показано, що деякі чинники, які зазвичай індукують апоптоз у пухлинних клітинах, можуть індукувати некроптоз або піроптоз в інших типах ракових клітин. Взаємозв'язок між ІЗК та апоптозом ще не визначений остаточно. Виявлення нових взаємозв'язків між цими процесами може допомогти у перепрофілюванні відомих індукторів апоптозу для їх використання як індукторів ІЗК.

ІЗК може викликатися різними факторами, як хімічними, так і фізичними. Серед фізичних факторів, що індукують ІЗК, варто відзначити тепловий шок, високий гідростатичний тиск та іонізуюче випромінювання. Індукція ІЗК також лежить в основі протиракової дії фотодинамічної терапії на основі гіперицину та

редапорфіну (Zhou et al., 2019; Rodriguez-Ruiz et al., 2020; Tatsuno et al., 2019; Krombach et al., 2019). В цих випадках ІЗК індукується комбінацією фізичних і хімічних факторів, які спричиняють продукцію активних форм оксигену (АФО) та стресу ендоплазматичного ретикулуму (ЕР) у ракових клітинах. Багато хімічних факторів, що індукують ІЗК, вже давно використовувалися в хіміотерапії раку задовго до того, як були виявлені їхні ІЗК-індукувальні властивості. Найпоширенішими прикладами є доксорубіцин та оксаліплатин (проте не цисплатин). Також до індукторів ІЗК належать блеоміцин, циклофосфамід, серцеві глікозиди (дигоксин, дигітоксин, уабаїн і ланатозид С), шиконін, антрацикліни – крім вищезгаданого доксорубіцину, ідарубіцин і мітоксантрон також володіють здатністю індукувати ІЗК (Zhou et al., 2019).

Залежно від механізму дії, індуктори ІЗК поділяють на два типи. Індуктори ІЗК І типу діють, викликаючи стрес ЕР та ІЗК-асоційоване вивільнення DAMP, що відбувається опосередковано, без індукції утворення АФО. Стрес ЕР, спричинений індукторами І типу, сам по собі не є летальним для клітини. Індуктори ІЗК ІІ типу викликають клітинну загибель шляхом селективної дії на ЕР (Zitvogel et al., 2010). Вони спричиняють утворення АФО та оксидативний стрес або запускають фосфорилювання фактора трансляції eIF2α за участю протеїнкінази PERK. До індукторів І типу належать такі хіміотерапевтичні препарати, як мітоксантрон, доксорубіцин, оксаліплатин і циклофосфамід. Типовим прикладом індуктора ІЗК ІІ типу є також фотодинамічна терапія на основі гіперицину (Hyp-PDT).

1.3.1. Молекулярні маркери ІЗК

Імунна відповідь може бути активована як екзогенними антигенами, так і аутоантигенами, що вивільняються з пошкоджених клітин (Chen & Nuñez, 2010). Другий випадок відповідає за імуногенну природу ІЗК. Як уже було зазначено, коли пухлинні клітини піддаються ІЗК, вони вивільняють репертуар сигналів, що загалом називаються молекулярними патернами, пов’язаними з ушкодженням

(DAMP) (Choi et al., 2023). Це внутрішньоклітинні молекули зі звичайними функціями всередині клітини. Однак, вивільняючись із клітини, вони набувають імуногенних властивостей (Serrano-del Valle et al., 2019).

Ці молекули можуть як експонуватися на поверхні клітини, так і вивільнятися в пухлинне мікрооточення, в обох випадках запускаючи імунну відповідь проти пухлинних клітин (Krysko et al., 2012). До DAMP, які секретуються в позаклітинне середовище належать, зокрема, позаклітинний АТФ та білок високомобільної групи 1 (high mobility group box 1 protein, HMGB1) – негістоновий білок, що зв'язує хроматин. Такі DAMP, як кальретикулін (CRT), а також білки теплового шоку HSP70 та HSP90, експонуються на клітинній мембрані (Fucikova et al., 2021).

Залежно від їхньої експресії та функцій, DAMP можна розділити на конститутивні (cDAMP) та індуцибельні (iDAMP) (Serrano-del Valle et al., 2019).

DAMP можуть модулювати процеси презентації антигену і фагоцитозу за участю дендритних клітин та макрофагів. Вони також сприяють формуванню прозапального середовища, що сприяє вродженій імунній відповіді проти пухлини (Ahmed & Tait, 2020). Механізм такої модуляції передбачає взаємодію DAMP зі специфічними до них рецепторами розпізнавання патернів (pattern recognition receptors, PRRs). Це мембранні рецептори, розташовані на дендритних клітинах, моноцитах і макрофагах (Serrano-del Valle et al., 2019), а також на природних кілерах (NK) (Liu et al., 2023). Взаємодія PRRs з DAMP сприяє дозріванню цих клітин вродженого імунітету. У свою чергу, ці клітини можуть активувати та модулювати адаптивний імунітет (Kazama et al., 2008).

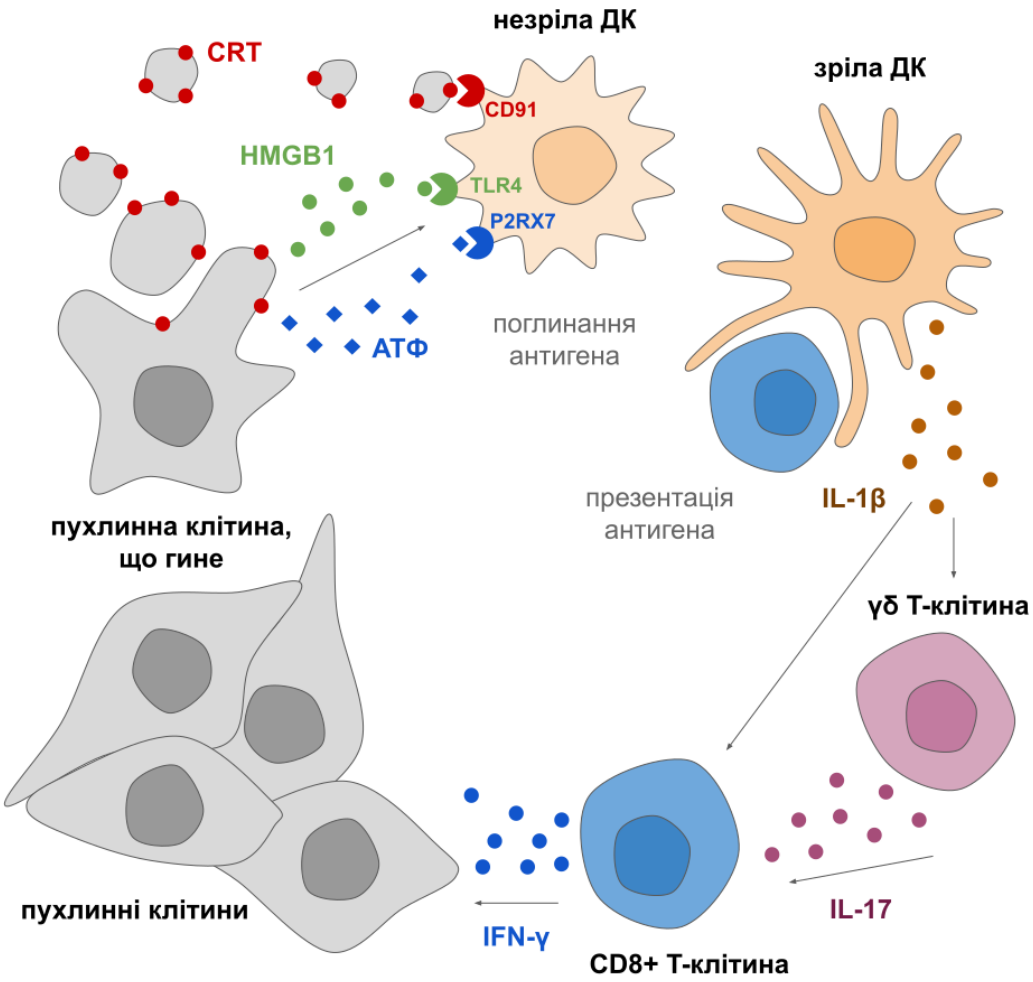


Рисунок 1. Механізм протипухлинної імунної відповіді, що запускається внаслідок імуногенної загибелі клітин (ІЗК). Індукований хіміотерапією стрес пухлинних клітин призводить до експонування та вивільнення цими клітинами кальретикуліну (CRT), білка високомобільної групи 1 (HMGB1) та аденозинтрифосфату (АТФ). Зв'язування цих сигнальних молекул із відповідними рецепторами розпізнавання патернів (включаючи CD91, TLR4 і P2RX7 та інші) сприяє дозріванню дендритних клітин (ДК), посилює презентацію антигену і фагоцитоз дендритними клітинами та макрофагами, запускає вивільнення цитокінів і активацію цитотоксичних CD8+ Т-клітин. (Klishch et al., 2024; адаптовано за Kroemer et al., 2013).

Незважаючи на те, що більшість DAMP стимулюють імунну відповідь, деякі з них, наприклад, аденозин і простагландин E2, діють як імуносупресори та індукують імунну толерантність до загиблих пухлинних клітин (Garg et al., 2017; Galluzzi et al., 2020). Набір DAMP, які секретуються або експонуються під дією різних індукторів ІЗК, може відрізнятися (Galluzzi et al., 2020), але три DAMP – CRT, HMGB1 і АТФ – залучені у шляхах ІЗК, що запускаються більшістю або майже всіма вивченими індукторами цього процесу. Екстерналізація CRT разом з вивільненням HMGB1 і АТФ вважаються характерними ознаками ІЗК і відіграють важливу роль в активації вродженої та адаптивної протипухлинної відповіді (рис. 1). Наступні розділи присвячені детальнішому опису функцій цих найбільш вивчених DAMP, які відіграють критично важливу роль у процесі ІЗК.

1.3.2. Кальретикулін та його екстерналізація при ІЗК

Кальретикулін (CRT) – це розчинний Ca^{2+}-зв'язувальний білок з молекулярною масою 46 кДа і висококонсервативною послідовністю. За нормальних умов він локалізований у просвіті ендоплазматичного ретикулуму, де виконує роль шаперона. CRT виконує інші функції як всередині, так і поза ЕР, такі як регуляція кальцієвого гомеостазу та участь у збиранні компонентів головного комплексу гістосумісності I (MHC-I) (Johnson, 2001; Michalak et al., 2009; Pandya et al., 2019).

При індукції ІЗК CRT транслокується з перинуклеарного ЕР на зовнішній шар клітинної мембрани (Menger et al., 2012). Такий екстерналізований CRT (екто-CRT) діє як потужний тригер фагоцитозу (Kroemer et al., 2013). Екто-CRT полегшує поглинання загиблих ракових клітин та їх фрагментів дендритними клітинами (ДК) і макрофагами, таким чином забезпечуючи їх багатим джерелом пухлино-асоційованого антигенного матеріалу (Schcolnik-Cabrera et al., 2019). Презентація пухлинних антигенів цими клітинами в кінцевому підсумку призводить до активації цитотоксичних CD8+ лімфоцитів (CTL) та адаптивної імунної відповіді проти пухлини (Kroemer et al., 2013).

Функцію екто-CRT як тригера фагоцитозу вперше було продемонстровано у 2005 році (Gardai et al., 2005). Подальші дослідження показали, що екстерналізація CRT є ключовою детермінантою протипухлинної імунної відповіді, пов'язаної з ІЗК (Obeid et al., 2007). Було продемонстровано, що нокдаун CRT або його інгібування CRT-специфічними антитілами значно пригнічує фагоцитоз дендритними клітинами (Serrano-del Valle et al., 2019; Obeid et al., 2007).

Молекулярний механізм ІЗК-асоційованої екстерналізації CRT включає наступні етапи: активація кінази PERK під час ER-стресу призводить до фосфорилювання фактора трансляції eIF2α і зупинки трансляції. Це спричиняє часткову активацію проапоптотичної каспази 8 (CASP-8), розщеплення білка 31, асоційованого з рецепторами В-клітин (BCAP31), та активацію BCL2-асоційованого білка X (BAX) і BCL2-антагоніста/кілера 1 (BAK1). Перед екстерналізацією CRT утворює комплекс з іншим люмінальним білком ER, ERp57. Цей комплекс експортується з ЕР до апарату Гольджі та експонується на плазматичній мембрані через SNARE-залежний екзоцитоз. Деякі етапи екстерналізації CRT можуть відрізнятися залежно від індуктора ІЗК (Panaretakis et al., 2009).

Екто-CRT розпізнається білком, спорідненим із рецептором ліпопротеїнів низької густини 1 (LRP1), також відомим як CD91. Цей PRR експресується дендритними та іншими антигенпрезентувальними клітинами (Gardai et al., 2005). CD91-опосередковане сигналювання сприяє поглинанню клітинних фрагментів, отриманих з мертвих пухлинних клітин. Сигнальний шлях CD91 потребує участі малої ГТФази 1 (RAC1), білка із родини Rac (Gardai et al., 2005; Byrne et al., 2013).

Окрім експонування внаслідок ІЗК, пухлинні клітини демонструють помітний базальний рівень екто-CRT. Можливою причиною цього є те, що у клітинах виникає стрес ЕР внаслідок самої онкогенної злоякісної трансформації (Fucikova et al., 2018). Цей альтернативний тригер ЕР-стресу може також призвести до

екстерналізації CRT і сигналізації про небезпеку навіть за відсутності хіміотерапії (Fucikova et al., 2018), полегшуючи таким чином протипухлинний імунний нагляд (Stoll et al., 2016).

Крім впливу на адаптивний імунітет, опосередкований цитотоксичними Т-лімфоцитами, недавні дослідження показали, що екстерналізація CRT може також сприяти вродженому протипухлинному імунітету шляхом активації природних кілерів (NK). Ця активація опосередкована транс-презентацією інтерлейкіну 15 (IL-15) (Truxova et al., 2020).

Загалом, CRT є важливим чинником, що зумовлює імуногенний характер ІЗК, оскільки його екстерналізація сприяє фагоцитозу, презентації антигену і подальшій активації протипухлинної імунної відповіді.

1.3.3. Вивільнення HMGB1 при ІЗК

Білок високомобільної групи 1 (high-mobility group box 1, HMGB1) – це негістоновий хроматин-зв'язувальний ядерний білок, що належить до підродини високомобільних груп (HMG). Він експресується в усіх ядерних клітинах і є одним з найпоширеніших негістонових білків хроматину (Kroemer et al., 2013). За нормальних умов він регулює структуру хроматину та транскрипцію. Зокрема, HMGB1 регулює активність таких транскрипційних факторів, як p53, NF-κB та деяких інших (Müller et al., 2004; Krysko et al., 2012).

Під час ІЗК HMGB1 може потрапляти в міжклітинне середовище двома шляхами: активною секрецією та пасивним вивільненням. Він може активно секретуватися шляхом нуклео-цитоплазматичної транслокації та везикулярного транспорту у відповідь на стресові стимули із клітин, які ще залишаються життєздатними (Choi et al., 2023; Kroemer et al., 2013). На пізніх стадіях клітинної загибелі (пізній апоптоз, постапоптотичний некроз) проникність ядерної ламіни та

плазматичної мембрани уможливлює пасивну дифузію HMGB1 з клітини, що гине (Yang et al., 2015; Zhu et al., 2015).

Коли HMGB1 пасивно вивільняється у великих кількостях з некротичних клітин або клітин на пізніх стадіях ІЗК, він діє як потужний медіатор запалення (Scaffidi et al., 2002). Він сприяє фагоцитозу макрофагами (Li & Lu, 2021). Подібно до CRT, HMGB1 може також стимулювати процесинг і презентацію антигену (Ge et al., 2021). Він сприяє міграції імунних клітин та їх інфільтрації в пухлини (Klune et al., 2008).

Важливо зазначити, що вивільнення HMGB1 саме по собі не є ознакою лише ІЗК. Задокументовано, що багато препаратів, які є класичними індукторами апоптозу, можуть викликати вивільнення HMGB1 (Andersson & Tracey, 2011). Може здаватися, що ці дані суперечать іншим висновкам про прозапальні ефекти HMGB1 при ІЗК, оскільки апоптотична загибель клітин характеризується як неімуногенна. Однак імуномодуляторна активність HMGB1 значною мірою залежить від його редокс-статусу (Venereau et al., 2012). Припускають, що за окислювальну інактивацію HMGB1 відповідають каспазо- та АФО-залежні механізми апоптозу (Kroemer et al., 2013). Це пояснює очевидну суперечливість наведених вище даних щодо участі HMGB1 в імуногенній та неімуногенній загибелі клітин. Незважаючи на роль HMGB1 в ІЗК, його вивільнення саме по собі ще не є надійним маркером імуногенної загибелі клітин (Fucikova et al., 2020). Однак його можна використовувати як маркер проникності клітинної мембрани (Galluzzi et al., 2009). HMGB1 також може секретуватися в менших кількостях під час стресу із життєздатних клітин з відносно неушкодженою плазматичною мембраною (Kroemer et al., 2013; Choi et al., 2023). Однак найбільше HMGB1 накопичується в позаклітинному просторі на пізніх стадіях клітинної загибелі, коли клітинна мембрана пошкоджена (Scaffidi et al., 2002; Bell et al., 2006; Menger et al., 2012)

HMGB1 зв'язується з різними PRR, включаючи Toll-подібні рецептори TLR2, TLR4 та рецептор для кінцевих продуктів глікації (receptor for advanced glycation end-products, RAGE) (Sims et al., 2010). TLR4 експресується на ДК та макрофагах. Після взаємодії з HMGB1 він запускає сигнальний шлях, який включає білок первинної відповіді на мієлоїдну диференціацію (myeloid differentiation primary response 88, MyD88), який виступає адаптером передачі сигналу вродженої імунної відповіді (Gay et al., 2014; Vigneron et al., 2019). Сигналювання за участю TLR4 та MyD88 сприяє обробці та презентації антигену дендритними клітинами (Apetoh et al., 2007; Saenz et al., 2014) і є необхідною та достатньою для імуногенного характеру клітинної загибелі (Galluzzi et al., 2020). Це було доведено на доклінічних моделях *in vivo*, коли нокаут гена HMGB1 в ракових клітинах і блокування рецептора TLR4 в організмі хазяїна специфічними антитілами знижували імунну відповідь у тварин, які отримували індуктори ІЗК (Apetoh et al., 2007; Nayagom et al., 2019).

У пацієнток з раком молочної залози, які отримували антрацикліни, що індукують ІЗК, поліморфізми з втратою функції в гені, що кодує TLR4, були пов'язані з несприятливим перебігом захворювання (Apetoh et al., 2007).

Сигналізація TLR4 в макрофагах може також активувати сигнальний шлях NF-κB, який збільшує експресію запальних цитокінів і сприяє фагоцитарній активності макрофагів (Li et al., 2021). HMGB1 також може активувати сигнальний шлях PI3K/AKT/mTOR, який посилює презентацію антигену в ДК і макрофагах (Ge et al., 2021). При зв'язуванні з рецепторами на ендотеліальних клітинах HMGB1 підвищує експресію ICAM-1 і VCAM-1, що призводить до посилення адгезії, міграції та інфільтрації імунних клітин у пухлини (Klune et al., 2008).

RAGE є мультилігандним рецептором, який може взаємодіяти не тільки з HMGB1, але й з широким спектром інших DAMP, таких як гліковані білки.

Сигналізація RAGE в ДК має вирішальне значення для їх дозрівання та міграції (Sims et al., 2010).

В цілому, незважаючи на те, що вивільнення HMGB1 саме по собі не є визначальною характеристикою ІЗК, воно відіграє важливу роль у цьому процесі, створюючи прозапальне середовище.

1.3.4. Позаклітинний АТФ у контексті ІЗК

Окрім своєї нормальної функції як безпосереднього джерела енергії для майже всіх клітинних процесів, аденозинтрифосфат (АТФ) може діяти як сигнал небезпеки, коли він вивільняється в позаклітинне середовище. Під час ІЗК позаклітинний АТФ діє як хемоатрактант для імунних клітин і має прозапальну дію.

Механізми вивільнення АТФ залежать від індуктора ІЗК. При ІЗК, спричиненій оксаліплатином та мітоксантроном, АТФ вивільняється за механізмом, залежним від аутофагії (Martins et al., 2014). За умови нестачі білків, необхідні для аутофагії, таких як ATG5, ATG7 і BECN1, АТФ не вивільняється. Існують інші молекули, які необхідні для вивільнення АТФ при ІЗК і активуються в каспазозалежний, а не аутофагічний спосіб. До них відносяться лізосомальний білок LAMP1, який бере участь у лізосомальному екзоцитозі і транслокується на клітинну мембрану при ІЗК; канали паннексину 1 (PANX1), які вивільняють АТФ з клітини; і Rho-асоційована протеїнкіназа 1 (ROCK1), яка разом з міозином-II відповідає за «блеббінг» клітинних мембран (Martins et al., 2014). У деяких випадках індукції ІЗК, наприклад, при гіперицин-опосередкованій фотодинамічній терапії, вивільнення АТФ не залежить від аутофагії. Натомість воно залежить від PI3K-регульованого екзоцитозу та проксимального секреторного шляху, опосередкованого PERK (Garg & Agostinis, 2013).

Функції позаклітинного АТФ опосередковані двома типами пуринергічних рецепторів – метаботропним рецептором P2Y2 (P2RY2), що експресується в

макрофагах, та іонотропним рецептором P2X7 (P2RX7), що експресується переважно в мастоцитах, макрофагах і ДК (Venereau et al., 2015). Коли позаклітинний АТФ зв'язується з P2Y2, він сприяє залученню макрофагів до мікрооточення пухлини, тобто діє як так званий сигнал «знайди мене» і сприяє фагоцитарному кліренсу (Burnstock, 2007; Elliott et al., 2009). Прозапальні ефекти позаклітинного АТФ опосередковані через рецептор P2X7. Після активації він запускає агрегацію інфламасоми NLRP3 в CASP-1-залежний спосіб (Swanson et al., 2019; Amores-Iniesta et al., 2017). Це в подальшому індукує секрецію цитокінів IL-1β та IL-18, що призводить до праймінгу CD8+ Т-клітин, продукції IL-17 γδ Т-клітинами (Ghiringhelli et al., 2009) та підвищеної експресії IFN-γ (Choi et al., 2023).

Окрім вивільнення клітинами, що гинуть, АТФ може виділятися нейтрофілами для залучення інших імунних клітин (Venereau et al., 2015).

Позаклітинний АТФ може бути метаболізований до АДФ і АМФ за допомогою білка CD39 (також відомого як ENTPD1 – ектонуклеозидтрифосфатдифосфогідролаза 1) і далі до аденозину за допомогою CD73. Ці два маркери можуть експресуватися пухлинними клітинами і стромальними клітинами в пухлинному мікрооточенні. На відміну від позаклітинного АТФ, позаклітинний аденозин може діяти як антагоніст позаклітинного АТФ, пригнічуючи цитотоксичну активність CD8+ Т-лімфоцитів. Зв'язування позаклітинного аденозину з пуринергічними рецепторами на поверхні CD8+ Т-клітин підвищує внутрішньоклітинні рівні 3',5'-циклічного АМФ, активуючи таким чином імуносупресивні сигнальні шляхи (Ohta & Sitkovsky, 2001; Stagg et al., 2012; Kepp et al., 2021; Allard et al., 2020). Таким чином, підвищена експресія CD39 і CD73 може змінити прозапальний ефект вивільнення АТФ.

Коли позаклітинний АТФ розщеплюється апіразою або пригнічується вироблення АТФ, реактивність імунних клітин значно знижується. Крім того, поліморфізми P2RX7, що призводять до втрати функції, у хворих на рак молочної

залози асоціюються з несприятливими клінічними результатами (Ghiringhelli et al., 2009). Ці дані підтверджують важливість вивільнення АТФ у стимулюванні імунної відповіді на ракові клітини.

1.3.5. Білки теплового шоку в ІЗК

Окрім найбільш вивчених DAMP, багато індукторів ІЗК запускають вивільнення інших молекул, важливих для імуногенності клітинної загибелі. Білки теплового шоку HSP70 і HSP90 є білками-шаперонами з ЕР, але вони можуть експонуватися на клітинній мембрані за умов стресу, в тому числі при хіміотерапії (Fucikova et al., 2021). Екстерналізація HSP90 на ракових клітинах підвищує імуногенність, стимулюючи секрецію IFN-γ за участю CD8+ Т-клітин (Choi et al., 2023). Вплив HSP70 сприяє дозріванню ДК та активації як CD8+, так і CD4+ Т-лімфоцитів (Serrano-del Valle et al., 2019). Однак, деякі дослідження показали дуже обмежену участь HSP в імуногенності або навіть імуносупресивні властивості цих шаперонів (Choi et al., 2023)

Підсумок огляду літератури

Спираючись на наведені літературні дані, можна зробити висновок, що ключові шляхи регуляції життєздатності пухлинних клітин, зокрема p53-залежні механізми супресії, сигнальні каскади, відповідальні за регуляцію клітинного циклу, а також процеси запрограмованої клітинної загибелі, залишаються актуальними мішенями для пошуку нових напрямів протипухлинної терапії Окрему увагу привертають стратегії, що передбачають вплив на змінену функціональність генів-супресорів пухлин, зокрема *TP53*, а також на молекулярні мішені, задіяні в регуляції проліферації та виживанні клітин.

Поряд із цим, дедалі більше значення надається здатності певних сполук викликати імуногенну загибель пухлинних клітин як чинник, що сприяє протипухлинній імунній відповіді. До основних ознак цього різновиду

запрограмованої клітинної загибелі належать екстерналізація кальретикуліну на поверхні клітин, секреція АТФ та вивільнення HMGB1, що забезпечують активацію антигенпрезентувальних клітин, посилення фагоцитозу та запуск імунної відповіді проти пухлинних клітин. Імуногенний характер загибелі клітин під дією деяких протипухлинних препаратів забезпечує посилення їхньої терапевтичної дії та є важливим фактором, що забезпечує довгострокові результати протипухлинної терапії.

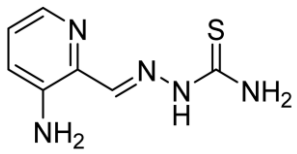
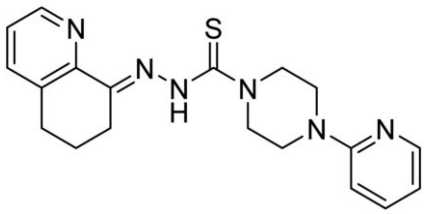
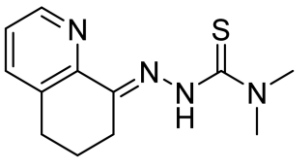
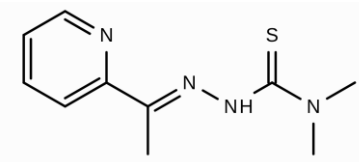
У цьому контексті особливий інтерес становлять малі гетероциклічні сполуки з потенційною подвійною дією, які поєднують властивості модуляторів сигнальних шляхів та здатність індукувати імуногенну загибель клітин.

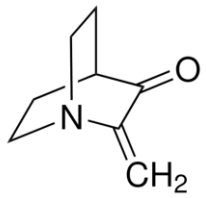
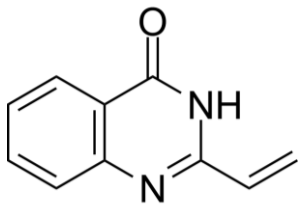
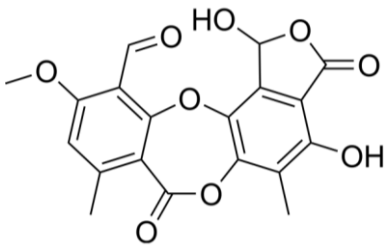
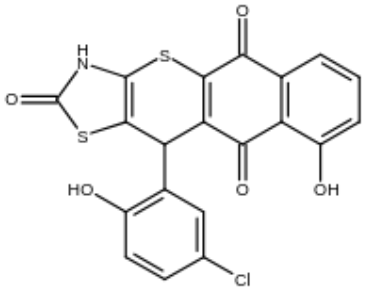
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

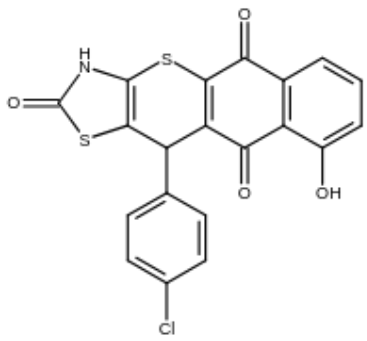
2.1. Досліджувані сполуки

У таблиці 1 наведено перелік сполук, що були включені у моделювання *in silico*. Частина з них була відібрана для експериментів *in vitro* та *in vivo*.

Таблиця 1. Досліджувані сполуки, їх структура та номенклатура за IUPAC.

Скорочена назва сполуки	**Назва сполуки за IUPAC**	**Молекулярна маса**	**Структурна формула**
тріапін	[(*E*)-(3-амінопіридин-2-іл) метиліденаміно] тіокарбамід	195.25 г/моль	
COTI-2	N′-(6,7-дигідрохінолін-8(5H)-іліден)-4-(піридин-2-іл)піперазин-1-карботіоамід	366.5 г/моль	
COTI-NMe_2	2-(6,7-дигідрохінолін-8(5H)-іліден)-N^4,N^4-диметилгідразин-1-карботіоамід	248.35 г/моль	
ZMC2	1,1-диметил-3-(1-піридин-2-ілетиліденаміно) тіокарбамід	222.31 г/моль	

MQ	2-метилен-3-хінуклідинон	137.18 г/моль	
STIMA-1	2-етеніл-3H-хіназолін-4-он	172.18 г/моль	
стиктова кислота	13,17-дигідрокси-5-метокси-7,12-диметил-9,15-діоксо-2,10,16-тріоксатетрацикло[9.7.0.03,8.014,18]октадека-1(11),3(8),4,6,12,14(18)-гексан-4-карбальдегід	386.3 г/моль	
Les-6547	11-(5-хлоро-2-гідроксифеніл)-9-гідрокси-3,11-дигідро-2H-бензо[6,7]тіохромено[2,3-d]тіазол-2,5,10-тріон	442.97 г/моль	

Les-6557	11-(4-хлорфеніл)-9-гідрокси-3,11-дигідро-2H-бензо[6,7] тіохромено[2,3-d]тіазол-2,5,10-тріон	426.97 г/моль	

Тріапін, COTI-2 та COTI-NMe_2 були надані професором Петрою Хеффетер (Dr. Petra Heffeter), яка є керівником науково-дослідної групи Інституту ракових досліджень при Віденському медичному університеті (Австрія).

Сполуки COTI-2 та COTI-NMe_2 були синтезовані на базі Віденського університету (Австрія) науково-дослідною групою під керівництвом доктора Крістіана Коволя (Dr. Christian R. Kowol) (Nunes et al., 2020; Pósa et al., 2022). COTI-2 було синтезовано відповідно до методу, описаного в патенті US8034815B2 (Danter et al., 2011), правовласник – Critical Outcome Technologies Inc. – COTI (Канада).

Сполуки Les-6547 та Les-6557 належать до похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу, які містять у своїй структурі біциклічний фрагмент юглону. Ці сполуки були синтезовані у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького науково-дослідною групою, очолюваною доктором фармацевтичних наук, професором Романом Богдановичем Лесиком (Ivasechko et al., 2023; Kozak et al., 2025).

Сполуки розчиняли у диметилсульфоксиді (ДМСО) і зберігали при –20 °C. Перед додаванням розчинів сполук до культури клітин проводили додаткове розведення у відповідному культуральному середовищі.

2.2. Культивування клітин

У дослідженнях використовували наступні лінії клітин: клітини меланоми миші B16F10 дикого типу, клітини меланоми миші B16F10/ADR, резистентні до адріаміцину (доксорубіцину), клітини колоректальної карциноми миші CT26, клітини лімфоми миші NK/Ly, клітини колоректальної карциноми людини SW480, клітини колоректальної карциноми людини HCT116, клітини колоректальної аденокарциноми людини DLD-1, кератиноцити людини HaCaT, фібробласти миші Balb/c 3T3, макрофаги миші J774.2. Клітини ліній B16F10, B16F10/ADR, CT26, SW480 та HCT116 були надані професором Вальтером Бергером (Walter Berger) з колекції Інституту дослідження раку Віденського медичного університету (Австрія). Клітини ліній HT-29, DLD-1, HaCaT та Balb/c 3T3 були отримані з Американської колекції типових культур (ATCC, Манассас, Вірджинія, США). Клітини ліній J774.2 та NK/Ly були отримані з колекції клітин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України.

Для культивування клітин використовували повноцінні середовища DMEM, RPMI-1640 та середовище МакКоя 5A (McCoy's 5A, Biowest, Франція), із додаванням 10% фетальної сироватки крові великої рогатої худоби (Fetal Bovine Serum, FBS; Biowest, Франція). Вибір середовища для кожної лінії клітин проводили відповідно до рекомендацій Американської колекції типових культур (ATCC). Клітини культивували в CO_2-інкубаторі Galaxy 170S (Eppendorf, Німеччина) при температурі 37 °C, відносній вологості 95% та вмісту CO_2 5% (Kozak et al., 2025).

Клітини пасажували кожні 48–72 год після досягнення ними стану конфлюенту 70-80%. Перед зняттям із субстрату клітини промивали 1-кратним фосфатно-сольовим буферним розчином (phosphate-buffered saline, PBS). Для відокремлення субстрат-залежних клітин від субстрату (крім лінії J774.2)

використовували розчин Versene – L0630, що містив трипсин та ЕДТА (Biowest, Франція). Клітини J774.2 відокремлювали від субстрату-підкладки шляхом піпетування у свіжому культуральному середовищі.

Клітини мишачої лімфоми NK/Ly культивували *in vivo* і трансплантували в асцитній формі шляхом внутрішньочеревної інокуляції мишам лінії C57BL/6 асцитної рідини, згідно з раніше описаною методикою (Lootsik et al., 2013; Klishch et al., 2024). Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (1998), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006) та схвалені Комісією з питань біоетики Інституту біології клітини НАН України (протокол № 2024-1).

2.3. Лімфоцити периферичної крові людини: виділення та культивування

Лімфоцити виділяли з периферичної крові людини, використовуючи гепарин натрію (10 МО/мл) як антикоагулянт. Виділення проводили із застосуванням методу градієнта щільності з використанням Gradisol G за модифікованою процедурою. Периферичну кров змішували з Gradisol G в рівних пропорціях (1:1) і центрифугували при 400 × g протягом 30 хв при кімнатній температурі. Клітини збирали, відмивали у фосфатно-буферному розчині (PBS) та обробляли гіпотонічним розчином для видалення залишкових еритроцитів. Лімфоцити активували фітогемаглютиніном-L (1 мкг/мл) і культивували в середовищі RPMI-1640 з додаванням 20% ембріональної сироватки великої рогатої худоби за контрольованих умов 95% повітря і 5% CO_2 (Ivasechko et al., 2023).

Дослідження з використанням людських лімфоцитів, виділених з периферичної крові дорослих здорових донорів, проводили відповідно до принципів, викладених у Гельсінській декларації та схвалених Комісією з питань біоетики Інституту біології клітини НАН України (протокол № 2023-1), після

отримання письмової інформованої згоди від донорів. Критеріями включення для відбору донорів були чоловіча стать, вік 18–50 років, маса тіла 50–100 кг та індекс маси тіла (ІМТ) від 18.5 до 27. Критерії для виключення включали наявність в анамнезі хронічних захворювань, ампутацій, трансплантацій органів або злоякісних новоутворень; наявність гострого захворювання протягом 14 діб до забору зразка; нещодавня здача крові протягом останніх 60 діб або більше шести донацій крові протягом року; температура тіла понад 37 °C; або будь-які видимі ознаки хвороби на момент забору зразка (Kozak et al., 2025).

2.4. Тест МТТ та тест на утворення колоній

Метаболічну активність клітин, що зазнавали впливу досліджуваних сполук Les-6547, Les-6557, доксорубіцину та ДМСО, оцінювали за допомогою МТТ-тесту згідно з протоколом виробника (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США). Клітини висівали в 96-лункові планшети (5000-10000 клітин у 100 мкл поживного середовища на лунку) і залишали на ніч перед обробкою. Для лімфоцитів проводили активацію фітогемаглютиніном-L (1 мкг/мл) протягом 24 годин (Metwally et al., 2022), після чого їх висівали в 96-лункові планшети з щільністю 100 000 клітин/лунку в середовище RPMI-1640 з додаванням 20% FBS. Досліджувані речовини, включаючи Les-6547, Les-6557 та доксорубіцин, додавали до 100 мкл культурального середовища для досягнення кінцевих концентрацій 0 мкМ, 0,1 мкМ, 1 мкМ, 2,5 мкМ, 10 мкМ та 100 мкМ для всіх сполук, після чого клітини інкубували протягом 24, 48 або 72 годин. Контролем слугували клітини, оброблені ДМСО. Потім додавали 20 мкл розчину МТТ (5 мг/мл) та інкубували протягом 2-4 годин для утворення кристалів формазану. Потім утворені кристали розчиняли додаванням ДМСО. Поглинання формазану вимірювали при 570 нм за допомогою спектрофотометра ThermoScientific Evolution 201 UV-VIS (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, США). За 100% життєздатність вважали контроль з 0,5% ДМСО. Значення IC_{50} для сполук визначали за допомогою програмного забезпечення

GraphPad Prism 8 і 9 (GraphPad Software, Бостон, штат Массачусетс, США) (Kozak et al., 2025).

Для аналізу утворення колоній клітинами ліній HT-29 та DLD-1 їх висівали у 12-лункові пластикові планшети за щільності 500 клітин у 2 мл живильного середовища на лунку. Після нічної інкубації клітини піддавали впливу сполук Les-6547, Les-6557 та доксорубіцину в концентраціях від 0,1 до 100 мкМ протягом 72 годин. Після обробки середовище замінювали свіжим середовищем без сполук. Після 14 днів культивування клітини промивали PBS і фіксували холодним метанолом протягом 10 хв. Потім клітини фарбували 0,1% розчином кристалічного фіолетового протягом 10 хвилин. Після промивання пластинам давали висохнути при кімнатній температурі (Núñez et al., 2020). Кількість колоній підраховували за допомогою програмного забезпечення ImageJ (версія 1.5.4; Національний інститут здоров'я, Бетесда, Меріленд, США). Вплив сполук на здатність до утворення колоній розраховували як відсоток колоній відносно контрольної групи (Kozak et al., 2025).

2.5. Аналіз клітинного циклу

Аналіз клітинного циклу клітин HT-29, оброблених Les-6547 (5 мкМ) і Les-6557 (10 мкМ) протягом 24 годин, проводили за допомогою проточного цитофлуориметра FACSCanto II. Після закінчення інкубаційного періоду клітини відокремлювали за допомогою трипсину, збирали і фіксували в холодному етанолі (70%) перед зберіганням при -20 °C протягом 3-х діб. Потім клітини обробляли для аналізу методом проточної цитофлуориметрії, як описано раніше (Metwally et al., 2022). Фіксовані клітини промивали холодним PBS і центрифугували при 2000 об/хв протягом 10 хв, а надосадову рідину видаляли. Осад клітин ресуспендували в PBS з 50 мкг/мл розчину РНКази А, що не містить ДНКази, і фарбували пропідій йодидом у концентрації 100 мкг/мл протягом 30 хв при 37 °C у темряві. Після відмивання клітини ресуспендували в PBS. Розподіл клітинних циклів аналізували

за допомогою проточного цитофлуориметра BD FACSCanto II та програмного забезпечення FACSDiva 6.1.3 (обидва – BD Biosciences Systems, Сан-Хосе, Каліфорнія, США) з подальшим аналізом за допомогою програмного забезпечення FCS Express 7 (De Novo Software, Пасадена, Каліфорнія, США). Систему калібрували за допомогою набору BD Cytometer Setup and Tracking Beads (BD Biosciences, Сан-Дієго, Каліфорнія, США) (Radomska et al., 2022).

2.6. Метод виключення трипанового синього

Життєздатність клітин після інкубації із досліджуваними сполуками та короткочасний цитотоксичний ефект (після 24 год. інкубації) визначали методом виключення трипанового синього. Клітини висівали у 24-лункові пластикові культуральні планшети (Greiner Bio One, Німеччина) в кількості 1×10^5 клітин/мл. Для культивування клітин різних ліній використовували середовище DMEM або RPMI-1640 (Biowest, Франція), доповнене 10% фетальною сироваткою великої рогатої худоби (FBS; Biowest, Франція). Середовище для кожної лінії клітин підбирали згідно з рекомендаціями Американської колекції типових культур (ATCC).

Після прикріплення субстрат-залежних клітин до субстрату, в культуру додавали розчини досліджуваних сполук у диметилсульфоксиді (ДМСО), додатково розведені у відповідному культуральному середовищі. У випадку позитивного контролю в лунку додавали еквівалентну кількість розчинника (ДМСО).

Через 24 години інкубації клітини відділяли від субстрату-підкладки за допомогою розчину трипсину та ЕДТА Versene – L0630 (Biowest, Франція) та підраховували їхню кількість за допомогою гемоцитометричної камери. Кількість некротичних клітин визначали фарбуванням 0.1% розчином барвника трипанового синього. Метод ґрунтується на вибірковому проникненні барвника у клітини з

пошкодженими мембранами, що забарвлює такі клітини у синій колір, тоді як життєздатні клітини залишаються безбарвними.

2.7. Молекулярний докінг

2.7.1. Використання молекулярного докінгу для оцінки селективності лігандів

Молекулярний докінг проводили за допомогою AutoDock Vina версії 1.2.3. (Trott & Olson, 2010; Eberhardt et al., 2021). Структури лігандів були підготовлені вручну в Avogadro версії 1.2.0 (Hanwell et al., 2012) та оптимізовані за допомогою алгоритму найстрімкішого спуску з силовим полем UFF, значенням збіжності 10^{-7} ккал/моль·Å протягом 10^4 кроків мінімізації енергії. Силове поле UFF було вибрано з міркувань відтворюваності. Воно дозволяє відтворити планарну конформацію одного з раніше описаних інгібіторів p53 – стиктової кислоти, що відповідає її конформації, описаній у попередніх дослідженнях *in silico* (Wassman et al., 2013), таким чином даючи можливість використовувати цей ліганд як позитивний контроль. Структури лігандів зберігали у форматі CML та конвертували у формат PDBQT за допомогою OpenBabel версії 3.1.1 (O'Boyle et al., 2011). Під час перетворення розміщення атомів гідрогену було оптимізовано, а неполярні атоми гідрогену видалено.

Білкові структури включали ДНК-зв'язувальний домен p53 дикого типу та мутантні форми білка p53 із міссенс-мутаціями R175H, G245H і R273H. Структури білка p53 дикого типу та перелічених мутантних форм p53 перебували у конформації з відкритою кишенею L1/S3. Структури у зазначених конформаціях були отримані у форматі PDB з проекту на платформі SourceForge (Wassman et al., 2013). Структури білка були перетворені з формату PDB у формат PDBQT за допомогою скрипта prepare_receptor4.py із пакету MGLTools версії 1.5.7 (Sanner, 1999).

«Сліпий» жорсткий докінг (із рухомою молекулою ліганда та нерухомою молекулою білка, без попереднього визначення сайту зв'язування) було виконано зі значенням вичерпності 100. Комірка охоплювала весь домен зв'язування ДНК з додатковими відступами (10 Å у кожному з трьох вимірів). Отримані конформації (докінгові позиції) ліганда оцінювали за допомогою скорингової функції Vina. Для подальшого аналізу відбирали 100 конформацій із найбільш сприятливими значеннями скорингової функції для кожної комбінації білок-ліганд.

2.7.2. Застосування молекулярного докінгу для пошуку молекулярних мішеней

Геометричну оптимізацію лігандних структур проводили в програмі Avogadro версії 1.2.0 з використанням алгоритму найстрімкішого спуску в силовому полі UFF з максимальною кількістю кроків мінімізації енергії 10^4 та величиною збіжності 10^{-7} ккал/моль·Å (Hanwell et al., 2012). Структури були збережені у форматі CML та конвертовані у формат PDBQT за допомогою OpenBabel версії 3.1.1 та Python-скрипта prepare_ligand4.py з пакету MGLTools версії 1.5.7 (O'Boyle et al., 2011; Sanner., 1999). При перетворенні в PDBQT було збережено лише полярні атоми гідрогену.

Для визначення найбільш ймовірних мішеней для кожного ліганду було використано сервіс SwissTargetPrediction, який використовує алгоритм, що базується на основі принципу подібності структур лігандів із уже відомими препаратами (Daina et al., 2019). Вхідні дані включали структури сполук у форматі SMILES, що були згенеровані на основі CML-файлів за допомогою OpenBabel версії 3.1.1 (O'Boyle et al., 2011). Для подальшого аналізу були відібрані потенційні мішені з прогнозованою ймовірністю понад 0%, які залучені до процесів апоптозу, проліферації та онкогенної трансформації. Для кожної відібраної білкової мішені, ідентифікованої за її ChEMBL-ідентифікатором, із ChEMBL API було отримано список PDB-ідентифікаторів (Zdrazil et al., 2024). Відповідні структури білків

людини були отримані з банк даних білкових структур (PDB) на основі їх PDB-ідентифікаторів (Berman, 2000). Для подальшого опрацювання були відібрані PDB-структури з ко-кристалізованими лігандами – субстратами білків або їхніми інгібіторами із експериментально підтвердженою здатністю до зв’язування.

PDB-структури були очищені від молекул води, ко-кристалізованих лігандів та кофакторів за допомогою інструменту парсингу файлів PDB із пакету Biopython версії 1.85 (Cock et al., 2009). Вказаний підхід було застосовано однаково до всіх PDB-структур через обмежені можливості автоматизованих методів надійно відрізнити необхідні кофактори від конкуруючих ко-кристалізованих лігандів на етапі скринінгу. Очищені білкові структури конвертували з PDB у формат PDBQT за допомогою Python-скрипта prepare_receptor4.py з пакету MGLTools версії 1.5.7 (Sanner, 1999).

Ко-кристалізовані ліганди з молекулярною масою понад 200 Да екстрагували з PDB-структур і зберігали у форматі PDBQT, щоб використовувати їх для розрахунку розмірів сайтів зв'язування та порівняння спорідненості. Значення 200 Да було обрано емпірично на основі розподілу молекулярної маси у зразку ко-кристалізованих лігандів для того, щоб відрізнити молекули субстратів та інгібіторів, від молекул кристалізаційних добавок.

Молекулярний докінг проводили, використовуючи програму AutoDock Vina v1.2.3 (Trott & Olson, 2009; Eberhardt et al., 2021) зі значенням параметра вичерпності 8 (за замовчуванням). Центр і розміри комірки сітки були встановлені таким чином, щоб повністю охопити положення ко-кристалізованого ліганду в його сайті зв'язування з додатковими відступами у 5 Å в кожному вимірі. Якщо ко-кристалізований ліганд був меншим у будь-якому з трьох вимірів, ніж досліджуваний ліганд, розмір комірки у цьому вимірі збільшували до максимального розміру молекули досліджуваного ліганду, із додатковим відступом у 5 Å. Позиції докінгу та положення ко-кристалізованих лігандів, зв'язаних з їхніми

сайтами, оцінювали за допомогою скорингової функції Vina і порівнювали оцінки ко-кристалізованих та докованих лігандів.

2.8. Симуляція молекулярної динаміки

Симуляцію молекулярної динаміки було проведено в GROMACS версії 2023.2 (Abraham et al., 2015). Топологію ліганду було підготовлено в SwissParam з використанням силового поля MMFF (Zoete et al., 2011; Bugnon et al., 2023). Топологію білка було створено з використанням моделі води TIP3P і силового поля CHARMM36 для сумісності з топологією ліганду відповідно до вказівок SwissParam. Білок-лігандний комплекс розміщали в кубічній комірці, сольватували та іонізували 0.15 M KCl.

Мінімізацію енергії проводили за допомогою алгоритму найстрімкішого спуску, із пороговим значенням конвергенції 500 кДж/моль·нм. Процес мінімізації енергії складався з 3-х етапів: 1) до 10 000 кроків для системи з позиційними обмеженнями білка та ліганда 2) до 10 000 кроків для системи з обмеженим лігандом і без позиційних обмежень для білка 3) до 30 000 кроків без позиційних обмежень.

Після мінімізації енергії проводилося зрівноважування системи у 2 етапи: 1) в ансамблі NVT (із фіксованими температурою та об’ємом) та 2) в ансамблі NPT (із фіксованими температурою і тиском, але змінним об’ємом). Обидва етапи зрівноважування системи проводились протягом 200 пс та часовим кроком 1 фс з використанням інтегратора leap-frog при температурі 310 К, що підтримувалась за допомогою термостата V-rescale (Bussi et al., 2007), а позиційні обмеження застосовувалися лише до атомів поліпептидного каркасу білка. При переході від ансамблю NVT до NPT тиск у системі було стабілізовано на рівні 1 бар за допомогою ізотропного баростата Берендсена (Berendsen et al., 1984).

Основну симуляцію проводили в ансамблі NPT протягом 100 нс із часовим кроком 2 фс. Температура підтримувалась на рівні 310 К термостатом V-rescale, однак баростат замінено на метод Паррінелло–Рамана (Parrinello & Rahman, 1981), який забезпечує точніше відтворення флуктуацій об'єму в порівнянні з методом Берендсена. Позиційні обмеження протягом основної симуляції не застосовувались. Координати та значення енергії зберігались кожні 10 пс. Для аналізу отриманих траєкторій використовували вбудовані інструменту аналізу GROMACS.

2.9. Імунофлуоресцентний аналіз

Клітини вирощували до досягнення 70–80% стану конфлюенту та обробляли COTI-NMe_2 або еквівалентним об’ємом ДМСО протягом 24 годин. Після цього клітини двічі промивали PBS і інкубували з охолодженим розчином метанол : ацетон (1:1) протягом 15 хв при −20 °C. Паралельно проводили мітку клітин за допомогою мишачого моноклонального первинного антитіла проти людського p53 DO-1 (у розведенні 1:200) протягом 2 годин при кімнатній температурі. Далі клітини інкубували з вторинними антитілами Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Каліфорнія, США), у розведенні 1:2000 протягом 1 год при кімнатній температурі у темряві. Після дворазового промивання PBS, клітини фарбували DAPI з подальшою обробкою реагентом Prolong Diamond Anti-Fade (Life Technologies, Каліфорнія, США) та аналізували за допомогою конфокальної мікроскопії при збільшенні ×40 000 (Rangel et al., 2019).

2.10. Вестерн-блот-аналіз

Аналіз Вестерн-блот проводили для оцінки впливу досліджуваних α-N-гетероциклічних тіосемікарбазонів на рівень експресії білка p53. Рівень p53 визначали з використанням специфічних антитіл DO-1 (Neomarkers, MS-187-P, США). Клітини лінії HCT-116 засівали у 6-лункові планшети по 5×10^5 клітин на

лунку та інкубували із досліджуваними речовинами протягом 6, 12 та 24 годин. Після інкубації клітини піддавали лізису у буфері, що містив 20 мМ TRIS-HCl (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 0,5% Triton X-100, 50 мМ NaF і 1 мМ PMSF (Veremieva, 2010). Виділені з клітин білки розділяли шляхом електрофорезу в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію за модифікованим методом Леммлі (Ivasechko et al., 2023). Первинні антитіла застосовували у концентрації 1:1000, розчинені у 3% BSA. Щоб перевірити рівномірність завантаження білків, на тій самій мембрані виконували імуноблотинг із застосуванням мишачих моноклональних антитіл AC-15 (Sigma Aldrich, Сент-Луїс, Міссурі, США), специфічних до β-актину, у розведенні 1:5000 (Veremieva, 2010). Для візуалізації використовували вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою, у робочому розведенні 1:10000.

2.11. Імунізація тварин

Дослідження з імунізації *in vivo* проводили на самках мишей лінії C57BL/6, яких утримували у віварії Інституту біології клітини НАН України за контрольованої температури на стандартному раціоні (ТОВ «Віта», м. Обухів, Україна) та з водою *ad libitum* (Klishch et al., 2024). Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (1998), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006) та схвалені Комісією з питань біоетики Інституту біології клітини НАН України (протокол № 2024-1).

Клітини меланоми B16F10, оброблені різними концентраціями COTI-NMe_2 (5 мкМ та 10 мкМ протягом 24 год; 500 нМ та 1 мкМ протягом 48 год), використовували для защеплення самок мишей лінії C57BL/6 (1 × 106 клітин на тварину). Перед защепленням клітини промивали від залишків культурального середовища 1-кратним фосфатно-сольовим буферним розчином (phosphate-buffered saline, PBS) та ресуспендували у збалансованому сольовому розчині Хенкса (Hanks' balanced salt solution, HBSS). Інокуляцію пухлинних клітин проводили підшкірно у

бік тіла тварини перед задньою кінцівкою. Як негативний контроль використовували некротичні пухлинні клітини, що піддавалися повторюваним циклам заморожування-розморожування (від –196 до +20 °C, 3х), що вбивало клітини без індукції імуногенної загибелі клітин. Як позитивний контроль використовували клітини, оброблені доксорубіцином (1 мкМ).

Через 14 діб мишам вводили живі клітини B16F10 (1 × 106 клітин на тварину). Протягом експерименту моніторили час появи пухлин, виживаність тварин та вимірювали розміри пухлин.

Через 30 днів після імунізації у тварин, що вижили, відбирали зразки крові для гематологічного аналізу. Забір крові у мишей проводили із ретроорбітального синуса. Для забору крові тварину утримували великим і вказівним пальцями недомінантної руки, одночасно натягуючи шкіру навколо ока. Далі в медіальний кут ока під кутом приблизно 30 градусів у напрямку до носа вводили піпетку. Після забору крові піпетку акуратно витягували, а око миші протирали стерильною ватою. З кожної тварини відбирали по 100 мкл крові у попередньо підготовлені мікропробірки, що містили по 5 мкл 10% розчину антикоагулянту – динатрієвої солі етилендіамінтетраацетатної кислоти (динатрій ЕДТА). Аналіз проводили на 5-компонентному автоматичному аналізаторі крові Dymind DF51 Vet (Shenzhen Dymind Biotechnology Co., Ltd., КНР) із використанням відповідних реагентів для аналізатора (Shenzhen Dymind Biotechnology Co., Ltd., КНР) згідно з інструкціями виробника (Ivasechko et al., 2023).

Методику дослідження проілюстровано на рис. 2.

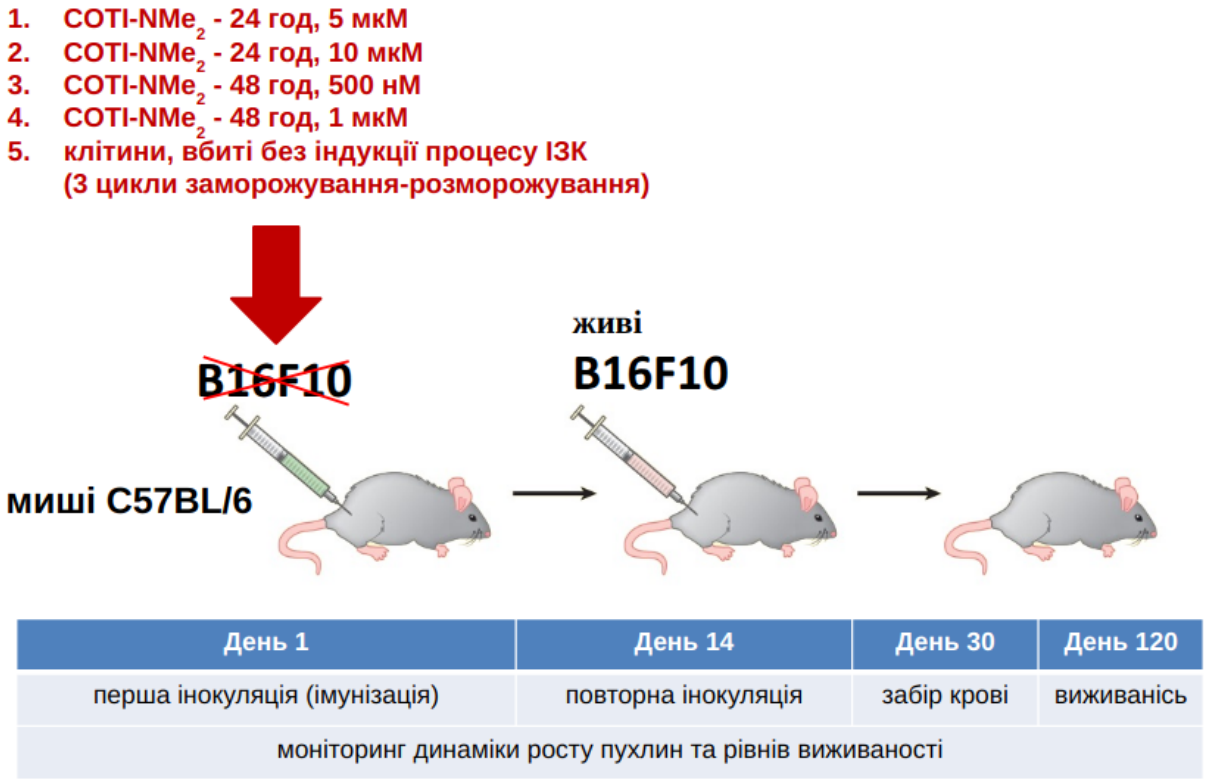


Рисунок 2. Схема методу порівняння ефективності клітинних вакцин, виготовлених на основі клітин меланоми B16F10, оброблених COTI-NMe$_2$ в різних концентраціях та за різної тривалості дії.

2.12. Дослідження фагоцитарної активності

Клітини B16F10 дикого типу засівали у 24-лункові пластикові культуральні планшети (Greiner Bio One, Німеччина). Культивували протягом 72 год у середовищі RPMI-1640 за дії різних концентрації COTI-NMe$_2$ (3.125 нМ, 6.25 нМ, 12.5 нМ, 25 нМ, 50 нМ, 100 нМ). Густина засіювання клітин становила 1×10^4 кл./см^2. Після культивування кондиціоноване середовище очищали від живих клітин шляхом центрифугування протягом 5 хв при 300 × g.

Клітини лінії J774.2 висівали у 24-лункові планшети (1×10^4 кл./см^2), і культивували протягом 24 год, після чого культуральне середовище замінювали на кондиціоноване середовище RPMI-1640 із культури клітин B16F10 дикого типу, оброблених різними концентраціями COTI-NMe$_2$. В якості контрольних зразків

використовували некондиціоноване середовище RPMI-1640 та кондиціоноване середовище RPMI-1640, зібране з культури клітин B16F10, що не піддавалися дії COTI-NMe_2.

Через 48 год після заміни середовища, до культури клітин B16F10 додавали суспензію термоінактивованих клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Через 2 год проводили промивання культури клітин J774.2 для видалення непоглинутих часток (дріжджових клітин). Підрахунок клітин J774.2 та поглинутих клітин дріжджів проводили із використанням фазово-контрастної мікроскопії у 10 полях зору для кожної лунки планшета. Підраховували загальну кількість клітин J774.2, кількість клітин, які поглинули дріжджові клітини (активних клітин J774.2) та кількість поглинутих часток (дріжджових клітин) для кожної активної фагоцитарної клітини та сумарну кількість поглинутих клітин дріжджів у кожному полі зору мікроскопа. На основі вказаних підрахунків обчислювали фагоцитарний індекс (ФІ, частка активних фагоцитарних клітин), загальне фагоцитарне число ($ФЧ_{заг.}$, відношення поглинутих часток до всіх клітин, включно з неактивними фагоцитарними клітинами) та фагоцитарне число для активних клітин ($ФЧ_{акт.}$, середня кількість часток, поглинутих одним активним фагоцитом) згідно з раніше описаною методикою (Legenchuk et al., 2022). Показники обчислювали за формулами:

$$ФІ = \frac{\text{активні клітини } J774.2}{\text{загальна кількість клітин } J774.2}$$

$$ФЧ_{заг.} = \frac{\text{поглинуті клітини дріжджів}}{\text{активні клітини } J774.2}$$

$$ФЧ_{акт.} = \frac{\text{поглинуті клітини дріжджів}}{\text{загальна кількість клітин } J774.2}$$

Методика дослідження проілюстрована на рис. 3.

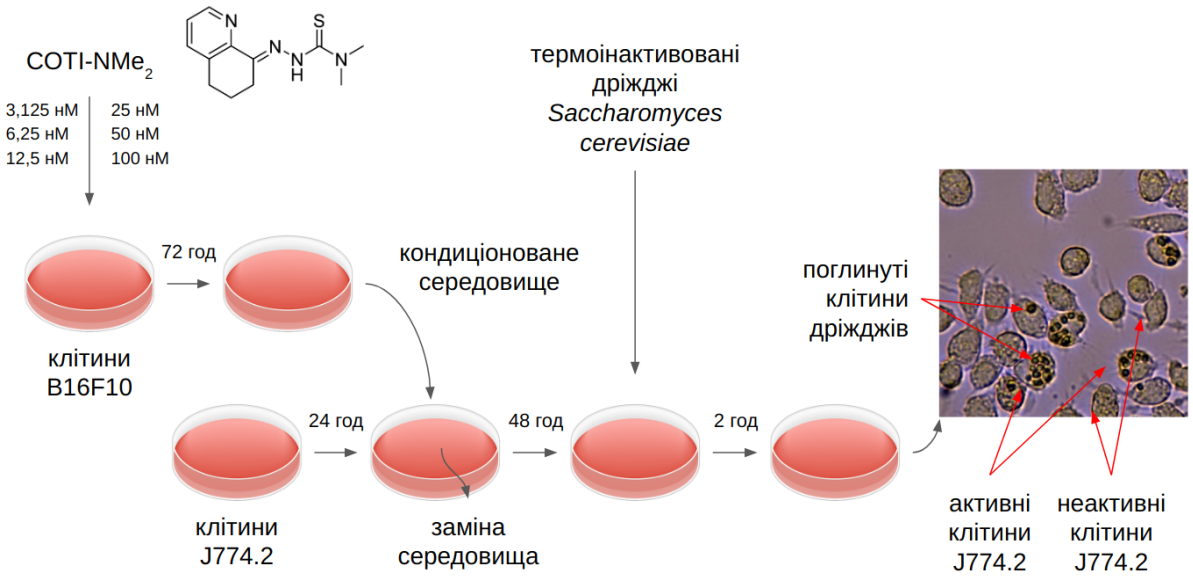


Рисунок 3. Схема методу дослідження впливу COTI-NMe2 на фагоцитарну активність із використанням моделі клітин J774.2 та термоінактивованих дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.

2.13. Статистичний аналіз даних

Статистична обробка результатів та їхнє графічне представлення були виконані за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism 9, а також бібліотеки Matplotlib 3.10.1 у середовищі Python 3.10. Дані представлені у вигляді середнього значення (M) ± стандартного відхилення (SD). Для статистичної обробки застосовували двосторонній аналіз ANOVA. Поправку на множинні порівняння визначали за тестом Тьюкі. Статистично значущими вважали результати при * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Селективна цитотоксичність тіопірано[2,3-d]тіазолів до клітин колоректального раку

Похідні Les-6547 та Les-6557 досліджували на цитотоксичну дію щодо клітинних ліній колоректальної аденокарциноми HT-29 та DLD-1, псевдонормальних мишачих фібробластів лінії Balb/c 3T3, псевдонормальних кератиноцитів людини лінії HaCaT та лімфоцитів людини, виділених з периферичної крові здорового донора, через 24, 48 та 72 години після експозиції за допомогою тесту MTT. Доксорубіцин використовували як референтний препарат.

Клітинні лінії HT-29 та DLD-1 були обрані як репрезентативні моделі колоректального раку через їх відмінні молекулярні характеристики. HT-29 – це мікросателітно-стабільна (MSS) клітинна лінія, яка містить мутацію BRAF V600E. На противагу цьому, DLD-1 є мікросателітно-нестабільною (MSI) та CIMP+, що несе мутацію KRAS G13D. Ці відмінності дозволили широко оцінити потенційну ефективність досліджуваних сполук у різних молекулярних підтипах колоректального раку (Berg et al., 2017).

Сполуки Les-6547 і Les-6557 проявили значну дозозалежну цитотоксичність щодо обох клітинних ліній колоректальної аденокарциноми – HT-29 та DLD-1. IC_{50} для сполуки Les-6547 становила 4.29–5.72 мкМ щодо клітин HT-29 та 5.14–6.62 мкМ до клітин DLD-1 (табл. 2, рис. 4). IC_{50} для сполуки Les-6557 становила 6.54–10.41 мкМ до клітинах HT-29 та 1.94–16.85 мкМ щодо клітин DLD-1 (Kozak et al., 2025).

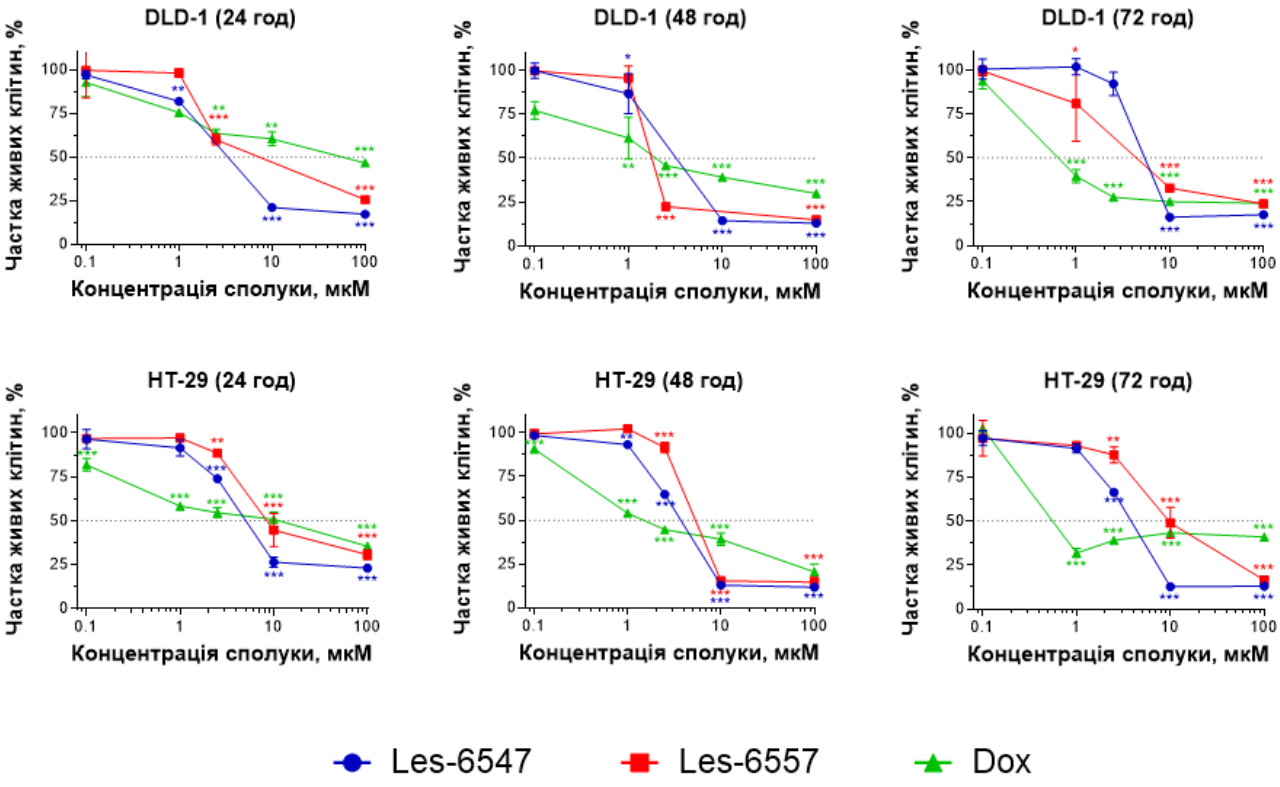


Рисунок 4. Життєздатність клітин колоректальної аденокарциноми HT-29 і DLD-1 через 24, 48 і 72 години після обробки препаратами Les-6547, Les-6557 та доксорубіцином (Dox) як референтним препаратом. Дані аналізу МТТ виражені у відсотках від даних контрольної групи і представлені як середнє ± SD трьох незалежних експериментів (n = 3), проведених у трьох повторах. *$p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ порівняно з контрольними клітинами.

Клітинна лінія DLD-1 гістологічно подібна до первинних пухлин. На відміну від неї, клітинна лінія HT-29 зазвичай використовується для оцінки мультирезистентності, всмоктування поживних речовин та хімічно індукованої диференціації ентероцитів (Hermanowicz et al., 2021). Незважаючи на ці відмінності, обидві клітинні лінії колоректальної аденокарциноми виявили подібну чутливість до досліджуваних сполук. Сполука Les-6547 продемонструвала вищу

цитотоксичність щодо клітин HT-29 протягом усіх часових точок експерименту порівняно зі сполукою Les-6557. Подібна тенденція спостерігалася і після 24 год інкубації клітин DLD-1 з досліджуваними речовинами. З іншого боку, на 48-ій годині експерименту сполука Les-6557 пригнічувала життєздатність клітин колоректальної аденокарциноми DLD-1 у 2.5 рази ефективніше, ніж сполука Les-6547. Було виявлено, що як сполука Les-6547, так і сполука Les-6557 виявляли вищу цитотоксичну активність, ніж референтний препарат доксорубіцин в обох лініях клітин колоректальної пухлини після 24 годин експозиції (рис. 4, табл. 2).

Таблиця 2. Значення IC_{50} (мкМ) досліджуваних сполук для клітин колоректальної аденокарциноми людини за даними МТТ-тесту (24, 48, 72 год інкубації, M ± SD, n = 3). Dox – доксорубіцин.

Клітинна лінія	**час, год**	**Les-6547**	**Les-6557**	**Dox**
HT-29	24	5.72±0.41	10.41±0.23	17.03±0.88
	48	4.29±0.50	6.54±0.07	1.55±0.14
	72	4.44±0.35	9.78±0.03	2.11±0.06
DLD-1	24	5.14±0.81	16.85±19.32	65.34±6.08
	48	5.17±0.58	1.94±0.05	2.01±0.09
	72	6.62±0.07	5.19±1.14	0.76±0.10

Висока токсичність багатьох протипухлинних препаратів для нормальних клітин залишається актуальною проблемою. Зважаючи на це, ми дослідили вплив сполук Les-6547 та Les-6557 на життєздатність лімфоцитів людини, виділених з периферичної крові здорового донора, псевдонормальних кератиноцитів людини HaCaT та мишачих фібробластів лінії Balb/c 3T3. Ми не спостерігали значної

цитотоксичної активності досліджуваних сполук щодо цих клітин (рис. 5, табл. 3). Сполуки Les-6547 та Les-6557 у високій концентрації 100 мкМ знижували життєздатність лімфоцитів здорового донора лише на 25% порівняно з контрольними клітинами. Мишачі фібробласти лінії Balb/c 3T3 були більш чутливими до обробки досліджуваними похідними, ніж лімфоцити людини, виділені з периферичної крові, та клітини лінії HaCaT. З іншої сторони, доксорубіцин продемонстрував найсильнішу цитотоксичну активність проти нормальних (лімфоцити) та псевдонормальних клітин (HaCaT, Balb/c 3T3), знижуючи життєздатність клітин на 50% у концентраціях, нижчих за 1 мкМ (рис. 5, табл. 3).

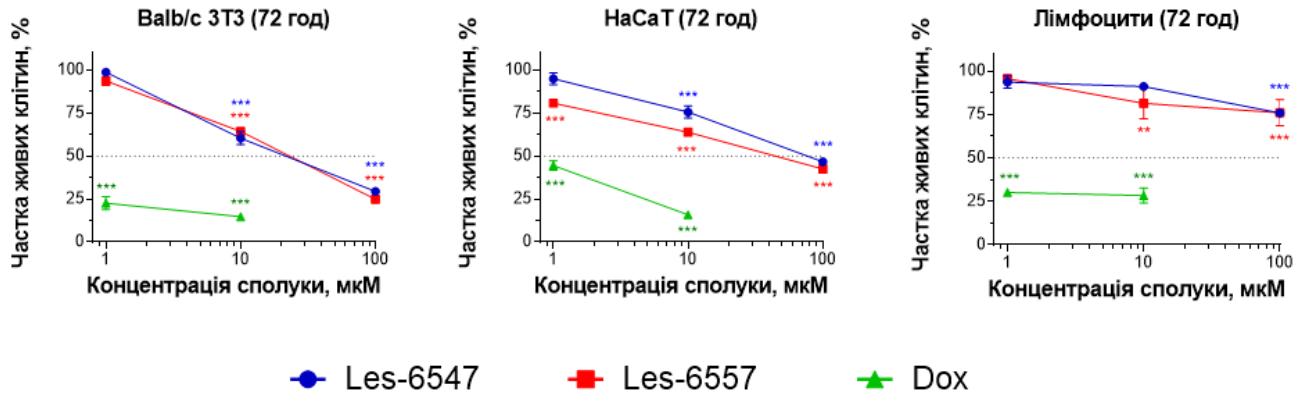


Рисунок 5. Життєздатність лімфоцитів людини, виділених з периферичної крові здорових донорів, кератиноцитів людини HaCaT та мишачих фібробластів Balb/c 3T3 після обробки протягом 72 годин сполуками Les-6547, Les-6557 та доксорубіцином (референтний препарат). Дані виражені у відсотках від контрольної групи і представлені як середнє значення ± SD трьох незалежних експериментів (n = 3), виконаних у трьох повторах. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ порівняно з контрольними клітинами.

Таблиця 3. Значення IC_{50} (мкМ) досліджуваних сполук для нормальних та псевдонормальних клітин за даними МТТ-тесту (72 год інкубації, M ± SD, $n = 3$). Dox – доксорубіцин.

Клітинна лінія	Les-6547	Les-6557	Dox
Balb/c 3T3	31.69±0.41	40.26±0.35	0.56±0.11
HaCaT	89.64±0.84	68.37±0.57	0.90±0.10
Лімфоцити крові людини	>100	>100	0.71 ± 0.11

Таким чином, ми не спостерігали високої цитотоксичної активності досліджуваних сполук проти нормальних (лімфоцити людини, виділені від здорових донорів) та псевдонормальних клітин (кератиноцити HaCaT, фібробласти Balb/c 3T3). Важливо відзначити, що цитотоксична активність сполук Les-6547 і Les-6557 щодо клітин колоректального раку людини виявилася у 10-20 разів вищою, ніж проти псевдонормальних клітин і більш ніж у 50 разів перевищила цитотоксичність проти нормальних лімфоцитів. Наприклад, цитотоксична активність обох препаратів проти клітинної лінії колоректальної аденокарциноми DLD-1 була більш ніж у 16 разів вищою порівняно з лімфоцитами, виділеними з периферичної крові здорових донорів (IC_{50} ~6 мкМ проти >100 мкМ, 72 год), тоді як доксорубіцин у дозах <1 мкМ вбивав 50% нормальних лімфоцитів, псевдонормальних кератиноцитів і фібробластів. Отримані результати свідчать про селективну дію нещодавно синтезованих тіопірано[2,3-d]тіазолів, що є важливою характеристикою для перспективних протипухлинних сполук. Це особливо важливо, оскільки більшість протиракових препаратів, що використовуються в клінічній практиці, впливають як на ракові, так і на нормальні клітини, що суттєво впливає на якість життя онкохворих.

Варто зазначити, що нижче значення IC_{50}, яке спостерігається в клітинах лінії Balb/c 3T3 (31,69 мкМ для сполуки Les-6547), викликає занепокоєння щодо потенційної токсичності. Однак, оскільки клітини Balb/c 3T3 є мишачими фібробластами, їхня відповідь може не повністю відображати селективність цих сполук у тканинах людини. Важливо, що значення IC_{50} для кератиноцитів лінії HaCaT і лімфоцитів людини перевищують 68 мкМ і 100 мкМ, відповідно, що свідчить про кращу селективність у клітинах людини.

Хоча терапевтичне вікно для Les-6547 та Les-6557 відносно вузьке порівняно з деякими таргетними методами лікування, воно все ж більше, ніж у широко використовуваних хіміотерапевтичних засобів, таких як доксорубіцин, який виявляє значну токсичність для нормальних клітин у субмікромолярних концентраціях.

Результати досліджень даного розділу наведено в наступній публікації:

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/cells1406046

3.2. Моделювання молекулярних механізмів протипухлинної дії нових тіопірано[2,3-d]тіазолів

3.2.1. Прогнозування молекулярних мішеней

Оскільки як сполука Les-6547, так і сполука Les-6557 містять по одному асиметричному атому карбону, енантіомери сполук Les-6547 і Les-6557 були проаналізовані окремо. Таким чином, кількість проаналізованих структур лігандів зросла до чотирьох (Les-6547-R, Les-6547-S, Les-6557-R і Les-6557-S). За допомогою SwissTargetPrediction було передбачено 84 потенційні білкові мішені для кожного енантіомера сполуки Les-6557, тоді як для сполуки Les-6547 не було передбачено жодної мішені (додаток 2, таблиця S1). Це можна пояснити незначними структурними відмінностями між сполуками, які можуть впливати на прогнози, засновані на принципі подібності (Daina et al., 2019). Однак, враховуючи високу структурну подібність між сполуками Les-6547 та Les-6557, було проведено докінг обидвох сполук до мішеней, передбачених для сполуки Les-6557, щоб забезпечити можливість порівняння їхніх прогнозованих властивостей. Шість із передбачених білків-мішеней були відібрані для молекулярного докінгу на основі їхньої участі в регуляції апоптозу, проліферації та злоякісної трансормації (табл. 4; додаток 2, табл. S2-S7).

Таблиця 4. Перелік білкових мішеней, передбачених SwissTargetPrediction, що були відібрані для молекулярного докінгу.

Цільовий білок	n	Результат скорингової функції Vina, ккал/моль, M±SD				
		ККЛ	Les-6547		Les-6557	
			R	S	R	S
Циклін-залежна кіназа 2 (CDK2)	202	-7.57 ±2.16	-8.26 ±2.44	-8.47 ±1.77	-8.77 ±2.26	-8.66 ±6.40
Циклін-залежна кіназа 4 (CDK4)	5	-9.74 ±0.68	-8.07 ±0.90	-8.77 ±1.92	-8.08 ±0.88	-9.20 ±0.95

Протеїнкіназа JAK2	117	-8.20 ±1.64	-9.14 ±0.59	-9.54 ±0.74	-9.27 ±0.58	-9.64 ±0.71
Мітоген-активована протеїнкіназа 8 (MAPK8)	17	-6.91 ±1.06	-8.90 ±0.78	-8.70 ±0.92	-8.97 ±0.74	-8.84 ±0.66
Серин/треонінова протеїнкіназа, що взаємодіє з MAP-кіназою 2 (MKNK2)	10	-7.19 ±2.20	-9.05 ±0.13	-8.75 ±1.00	-9.33 ±0.60	-8.90 ±0.89
Матриксна металопротеїназа 9 (MMP9)	11	-7.80 ±2.21	-9.08 ±0.93	-8.36 ±1.05	-8.65 ±0.86	-8.29 ±1.46

n – кількість доступних PDB-структур мішені в різних конформаціях, зв'язаних з ко-кристалізованими лігандами (ККЛ), які були отримані з бази даних PDB RCSB і включені в аналіз. Сполуки Les-6547-R, Les-6547-S, Les-6557-R, Les-6557-S – енантіомери сполук Les-6547 та Les-6557, відповідно. Кожне значення у стовпці ККЛ представляє середнє значення скорингової функції Vina для різних ККЛ, кожен з яких зв’язаний з відповідною конформацією прогнозованого білка-мішені, та оцінений AutoDock Vina в режимі скорингу (score-only) без виконання докінгу. Решта чотири стовпці містять усереднені результати докінгу для енантіомерів сполук Les-6547 та Les-6557, у комплексі з тими самими конформаціями білків-мішеней, що зв'язують відповідні ККЛ. Для кожної з n конформацій мішеней було обрано найбільше абсолютне значення скорингової функції, які далі були усереднені. ККЛ були видалені з білкових структур під час їх підготовки до докінгу. Результати для енантіомерів сполук Les-6547 та Les-6557 співставні з результатами для ККЛ і перевищують їх у випадку CDK2, JAK2 та MAPK8, аналогічна тенденція спостерігається і для решти відібраних мішеней, окрім CDK4.

Таким чином, сполуки Les-6547 та Les-6557 демонструють показники докінгу, співрозмірні з лігандами із експериментально підтвердженою здатністю до зв'язування.

3.2.2. Взаємодія із циклін-залежними кіназами як потенційних механізм дії нових тіопірано[2,3-d]тіазолів

Слід зазначити, що для CDK2, JAK2 та MAPK8 досліджені похідні тіопірано[2,3-d]тіазолу продемонстрували більш сприятливі показники докінгу, ніж ко-кристалізовані ліганди з експериментально підтвердженою здатністю до зв'язування. Це дозволяє припустити, що передбачувана взаємодія сполук Les-6547 та Les-6557 з цими білковими мішенями може пояснювати їхню цитотоксичну та проапоптотичну активність, що була підтверджена експериментально (Kozak et al., 2025). Прогнозовані молекулярні мішені CDK2, JAK2 та MAPK8 можуть бути перспективними кандидатами для подальшого дослідження *in silico* та експериментальної перевірки в майбутніх дослідженнях.

Прогнозована здатність сполук Les-6547 та Les-6557 зв'язувати CDK2 в тому самому сайті, з яким зв’язуються АТФ та відомі інгібітори кіназ, дозволяє припустити, що досліджувані тіопірано[2,3-d]тіазоли теж можуть виступати в ролі інгібіторів кіназ. У випадку CDK2 середні абсолютні значення скорингової функції для сполук Les-6547 та Les-6557 (табл. 4) перевищують відповідні показники для ко-кристалізованого АТФ (рис. 6), але є нижчими, ніж відповідні абсолютні значення для ко-кристалізованих неселективних інгібіторів кіназ, таких як ставроспорин (максимальний показник скорингової функції 13,63 ккал/моль, PDB ID 7NVQ, додаток 2, таблиця S2). На відміну від CDK2, показники докінгу для CDK4 не проявляють достовірних відмінностей порівняно з показниками для ко-кристалізованого АТФ (ідентифікатори PDB: 5FWK, 5FWL, 5FWM, 5FWP). Цей факт сам по собі не може довести, що сполуки Les-6547 та Les-6557 є селективними інгібіторами кіназ, проте кіназоінгібувальні властивості та селективність інгібування тіопірано[2,3-d]тіазолу можуть бути перспективною темою для подальших досліджень.

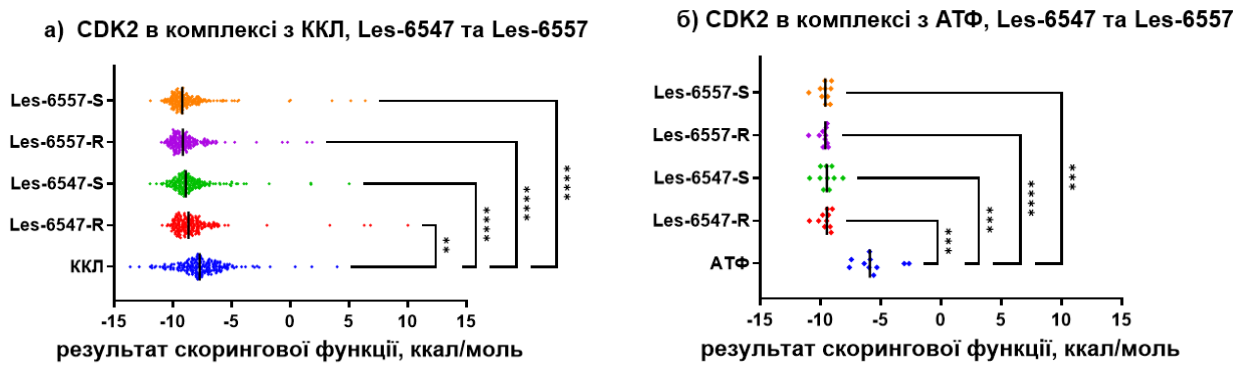


Рисунок 6. Результати докінгу для сполук Les-6547 та Les-6557 для кількох структур CDK2 PDB порівняно з оцінками для а) – всіх ко-кристалізованих лігандів (n = 202) та б) – тільки ко-кристалізованого АТФ (n = 10, ідентифікатори PDB: 1B38, 1B39, 1FIN, 1FQ1, 1GY3, 1JST, 1QMZ, 2CCI, 2CJM, 8FP5). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ порівняно з ККЛ (а) або АТФ (б).

Результати досліджень даного розділу наведено в наступній публікації:

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/cells1406046

3.3. Тіопірано[2,3-d]тіазоли інгібують проліферацію клітин колоректальної аденокарциноми людини

Антипроліферативний потенціал сполук Les-6547 та Les-6557 було проаналізовано за допомогою клоногенного аналізу, який оцінює здатність клітин виживати, проліферувати та утворювати колонії (довготривалий ріст) за дії досліджуваних чинників (Braselmann et al., 2015). Виявлено, що сполуки Les-6547 та Les-6557 інгібували утворення колоній за участю клітин ліній HT-29 та DLD-1 (рис. 7, табл. 5).

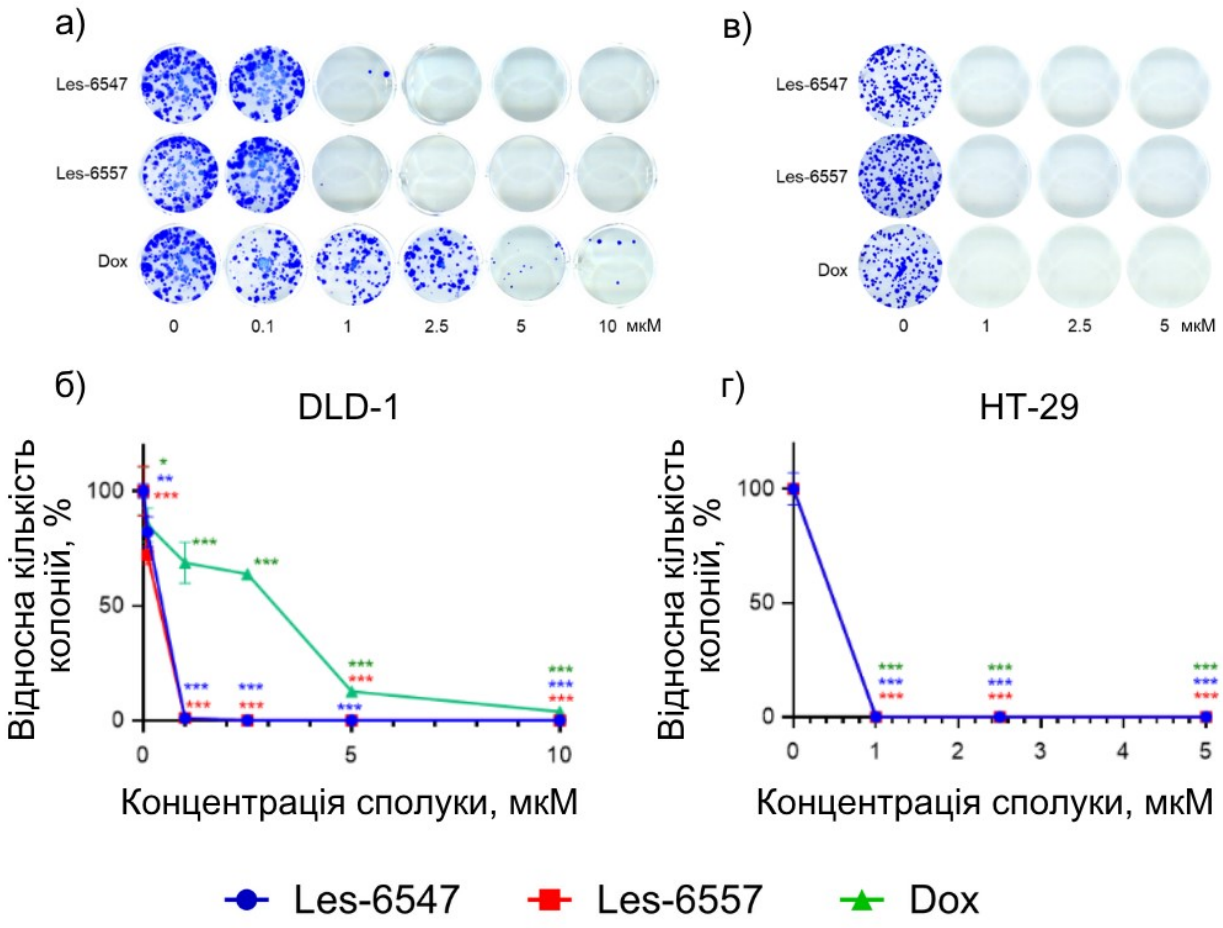


Рисунок 7. Довготривалий вплив (14 діб) сполук Les-6547, Les-6557 та доксорубіцину на колонієутворювальну здатність клітин колоректальної

аденокарциноми DLD-1 та HT-29 після 72-годинної обробки: (а, в) репрезентативні зображення сформованих колоній у лунках культури клітин; (б, г) відносна кількість сформованих колоній за наявності сполуки в культуральному середовищі (% від контролю). Дані виражені у відсотках від контрольної групи і представлені як середнє значення ± SD трьох незалежних експериментів (n = 3), виконаних у трьох повторах. *$p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ порівняно з контрольними клітинами.

Таблиця 5. Значення IC_{50} (мкМ) досліджуваних сполук для клітин аденокарциноми товстої кишки людини за даними клоногенного аналізу (14 діб інкубації, M ± SD, n = 3). Dox – доксорубіцин.

Клітинна лінія	**Les-6547**	**Les-6557**	**Dox**
DLD-1	0.40 ± 0.06	0.33 ± 0.05	3.23 ± 0.05
HT-29	~0.5	~0.5	~0.5

Сполуки Les-6547 та Les-6557 у концентрації 1 мкМ інгібували колонієутворення клітин лінії HT-29 на 100%. У випадку клітин ліній DLD-1, сполуки Les-6547 та Les-6557 у концентрації 1 мкМ інгібували колонієутворення на 99%. Сполуки Les-6547 та Les-6557 у концентрації 2.5 мкМ повністю пригнічували колонієутворення в обох досліджуваних лініях клітин колоректального раку людини. Доксорубіцин продемонстрував подібний вплив на утворення колоній у клітинах лінії HT-29, як і сполуки Les-6547 та Les-6557. Доксорубіцин у концентрації 1 мкМ повністю запобігав утворенню колоній клітин лінії HT-29 (100% інгібування). Однак він був менш ефективним у пригніченні колонієутворення в клітинах лінії DLD-1, де спостерігали ріст колоній на рівні 3,86% відносно контролю навіть після впливу 10 мкМ доксорубіцину (рис. 8, табл. 5).

Таким чином, досліджувані сполуки Les-6547 та Les-6557 проявляють виражену антипроліферативну активність щодо клітин ліній колоректальної карциноми людини HT-29 та DLD-1, про що свідчать результати тесту на колонієутворення. Обидва досліджувані похідні пригнічували виживання, проліферативну та колонієутворюючу активність клітин DLD-1 значно ефективніше, ніж референтний препарат доксорубіцин.

Результати досліджень даного розділу наведено в наступній публікації:

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/cells1406046

3.4. Тіопірано[2,3-d]тіазоли індукують зупинку клітинного циклу в клітинах колоректального раку людини

Клітинний цикл – це впорядкована послідовність подій, яка завершується поділом клітин, що робить його критично важливим процесом для клітинної проліферації. Цей процес часто гіперактивований у ракових клітинах, що сприяє неконтрольованому росту, посиленню міграції, інвазії та метастазуванню (Suski et al., 2021). Крім того, відомо, що зупинка клітинного циклу може призвести до запрограмованої загибелі клітин. Отже, сполуки, що сприяють зупинці клітинного циклу, не тільки пригнічують проліферацію ракових клітин, але й призводять до їхньої загибелі, представляючи ефективну стратегію лікування раку (Pucci et al., 2000).

Щоб визначити, чи пов'язана протиракова активність новосинтезованих тіопірано[2,3-d]тіазолів з регуляцією клітинного циклу, ми оцінили розподіл клітин лінії HT-29 колоректального раку людини за фазами клітинного циклу (рис. 8). Результати вказують на те, що Les-6547 впливає на клітинний цикл, пригнічуючи проходження фаз S і G2/M. Обробка клітин HT-29 препаратом сполуки Les-6547 призвела до збільшення популяції клітин у фазі G2/M з 24,3% до 39,9%, порівняно з контрольною групою. Аналогічне збільшення спостерігалося і в S-фазі, де популяція клітин зросла з 17,3% до 34,7%. Сполука Les-6557 індукувала зупинку клітинного циклу в S-фазі, про що свідчить збільшення клітинної популяції з 14,3% в контрольній групі до 51,3% в обробленій групі (рис. 8).

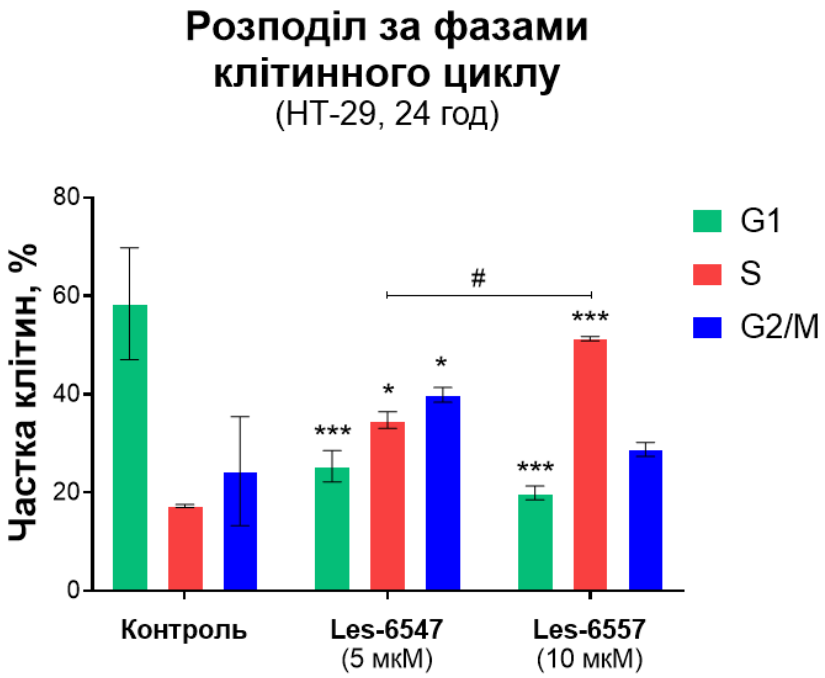


Рисунок 8. Результати проточної цитометрії розподілу клітинного циклу в клітинах колоректальної аденокарциноми HT-29, оброблених протягом 24 годин сполуками Les-6547 (5 мкМ) і Les-6557 (10 мкМ). Відсотки клітин у фазах G1 (зелений), S (червоний) та G2/M (синій) клітинного циклу представлені як середнє ± SD, отримане з трьох незалежних експериментів ($n = 3$), проведених у трьох повторах. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ порівняно з контрольними клітинами; # $p < 0.05$ різниця між сполуками.

Отримані результати узгоджуються з даними молекулярного докінгу, який вказує на можливу здатність досліджуваних сполук взаємодіяти з циклін-залежними кіназами, що регулюють окремі етапи клітинного циклу. Зокрема, циклін-залежна кіназа CDK2 у комплексі з циклінами E та A регулює перехід між фазами клітинного циклу G1/S та S/G2 відповідно. Потенційна взаємодія сполуки Les-6557 із CDK2 може пригнічувати перехід від фази S до фази G2, що пояснює зупинку клітинного циклу у фазі S, що спостерігається під дією цієї сполуки. Тим не менше, Les-6557 не блокує перехід від фази G1 до S-фази. Необхідні подальші

дослідження, щоб з’ясувати, чи може диференційована дія Les-6557 на різні етапи клітинного циклу пояснюватися тим, що CDK2 утворює комплекси із різними циклінами, чи вона зумовлена потенційною взаємодією Les-6557 також із іншими білками-мішенями.

Результати проточної цитометрії узгоджуються також із даними клоногенного аналізу, який показав, що похідні тіопірано[2,3-d]тіазолів інгібують проліферацію, а також з аналізом FITC-аннексину V/пропідію йодиду та каспазної активності, які продемонстрували проапоптотичну активність досліджуваних сполук (Kozak et al., 2025). Цей подвійний ефект індукції апоптозу та зупинки прогресування клітинного циклу може бути особливо корисним у боротьбі з агресивними клітинами колоректального раку, що швидко діляться.

Багатообіцяючі результати, отримані з препаратами сполук Les-6547 та Les-6557, підкреслюють їхній потенціал як кандидатів для подальшого розвитку в терапії колоректального раку. Однак необхідні додаткові дослідження для ретельного вивчення їхньої ефективності та профілю безпеки *in vivo*, а також вивчення потенційних синергічних ефектів з існуючими хіміотерапевтичними препаратами. Вивчення впливу Les-6547 та Les-6557 на різні підтипи колоректального раку з різним генотипом може краще прояснити сфери їхнього терапевтичного застосування та допомогти визначити групи пацієнтів, які можуть отримати найбільшу користь від такого лікування.

Результати досліджень даного розділу наведено в наступній публікації:

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/cells1406046

3.5. Дослідження цитотоксичної дії α-N-гетероциклічних тіосемікарбазонів

Сполука COTI-NMe_2 продемонструвала виражену токсичність щодо досліджуваних ліній злоякісних клітин. Зокрема, за дії сполуки COTI-NMe_2 на клітини карциноми миші CT26 протягом 24 годин, її цитотоксичність перевищувала цитотоксичність COTI-2 у 2–3 рази і була співрозмірною із цитотоксичністю тріапіну. Значення IC_{50} для тріапіну, COTI-2 та COTI-NMe_2 становили 3.3, 8.6 та 3.7 мкМ, відповідно (рис. 9а, табл. 6). Клітини меланоми B16F10 дикого типу були менш чутливими як до дії COTI-NMe_2, так і до інших двох α-N-гетероциклічних тіосемікарбазонів, проте дія COTI-NMe_2 теж була більше виражена, порівняно із COTI-2, а при вищих концентраціях вона перевищувала дію тріапіну. Значення IC_{50} за дії на клітини лінії B16F10 тріапіну, COTI-2 та COTI-NMe_2 становили 9.4, 24.3 та 7.2 мкМ, відповідно (рис. 9б, табл. 6). Клітини лінії HCT116 карциноми людини виявилися особливо чутливими до дії COTI-NMe_2 і значення IC_{50} для тріапіну, COTI-2 та COTI-NMe_2 становили 4.6, 15.2 та 2.1 мкМ, відповідно, таким чином підкреслюючи відмінності в дії COTI-2 та COTI-NMe_2 на клітини цієї лінії (рис. 9в, табл. 6). Проте подібних відмінностей не було виявлено для клітин лінії SW480 карциноми людини. Значення IC_{50} для тріапіну, COTI-2 та COTI-NMe_2 у випадку SW480 були співрозмірними і становили 7.2, 6.9, 8.5 мкМ, відповідно (рис. 9г, табл. 6).

Загалом, для більшості – проте не всіх – клітинних ліній цитотоксична та цитостатична дія COTI-NMe_2 була більш вираженою, ніж дія COTI-2, і була співрозмірною із дією тріапіну, одного з найбільш досліджених α-N-гетероциклічних тіосемікарбазонів. Найбільш чутливими до дії COTI-NMe_2 були клітини лінії CT26 карциноми миші та клітини лінії HCT116 карциноми людини, а менш чутливими були клітини лінії SW480 карциноми людини та мишачої меланоми B16F10 дикого типу. На підставі наведених даних можна зробити

попередній висновок, що тканинне та організмове походження клітин не є визначальним фактором щодо їхньої чутливості до досліджуваних α-N-гетероциклічних тіосемікарбазонів. Разом з тим не можна виключати потенційних закономірностей для ширших вибірок ліній пухлинних клітин.

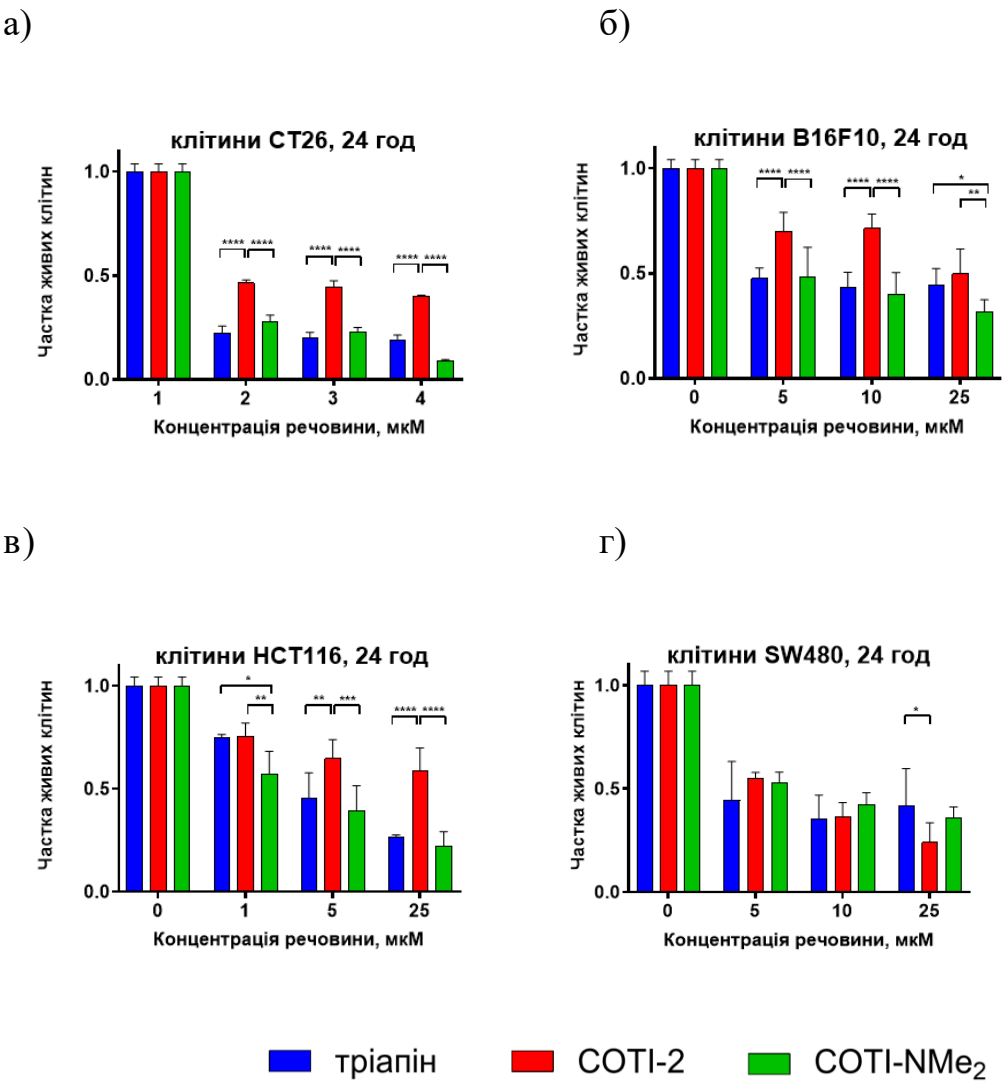


Рисунок 9. Цитотоксична активність COTI-NMe_2 була в 2–3 рази вищою, ніж COTI-2, щодо клітин лінії CT26 (а) і до 2 разів вищою для клітин меланоми B16F10 дикого типу (IC_{50} COTI-NMe_2 = 3.7 та 7.2 мкМ, відповідно, проти 8.7 мкМ та 24.3 мкМ для COTI-2 і співрозмірна з IC_{50} для тріапіну – 3.3 та 9.4 мкМ). Подібні відмінності були отримані для клітин лінії HCT116 (в), тоді як для клітин лінії SW480 не спостерігали вираженої різниці в активності досліджуваних похідних тіосемікарбазону. Дані

представлені як середнє значення ± SD трьох незалежних експериментів (n = 3), виконаних у трьох повторах. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ порівняно з контрольними клітинами.

Таблиця 6. Значення IC_{50} за дії тріапіну, COTI-2 та COTI-NMe_2 на 4 різні лінії клітин пухлин миші та людини.

Сполука	CT26	B16F10	SW480	HCT116
Тріапін	3.3	9.4	7.2	4.6
COTI-2	8.6	24.3	6.9	15.5
COTI-NMe_2	3.7	7.2	8.5	2.1

Також було проведено порівняння цитотоксичної дії COTI-NMe_2 на клітинні лінії меланоми миші B16F10 дикого типу та ізогенної лінії B16F10/ADR з підвищеною чутливістю до доксорубіцину. Показано, що чутливість клітин обох ліній до COTI-NMe_2 є співрозмірною і не проявляє виражених відмінностей (рис. 10). Це дозволяє зробити висновок, що на відміну від COTI-2, COTI-NMe_2 найімовірніше, не є мішенню для ABC-транспортерів, які забезпечують резистентність клітин B16F10/ADR до доксорубіцину, що узгоджується з раніше опублікованими даними стосовно порівняння профілів резистентності (Pósa et al., 2022).

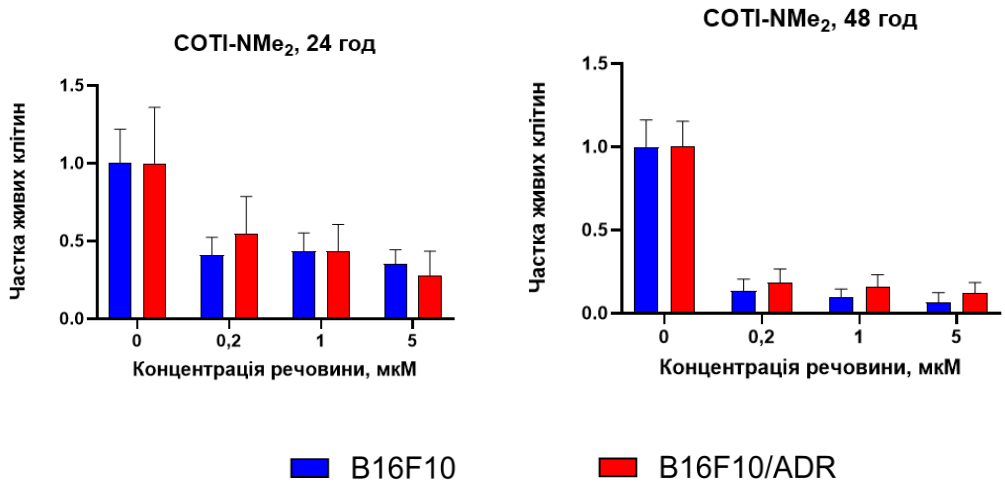


Рисунок 10. Попри різну чутливість до доксорубіцину, чутливість B16F10 та B16F10/ADR до COTI-NMe₂ є співрозмірною: 24 год – чутливість не відрізняється; 48 год – слабка тенденція до підвищеної резистентності у клітин B16F10/ADR порівняно із B16F10 дикого типу. Дані представлені як середнє значення ± SD трьох незалежних експериментів (n = 3), виконаних у трьох повторах.

Результати досліджень даного розділу наведено в наступній публікації:

Klishch M., Skorokhyd N., Panchuk R., Stoika R. Time and dose-dependent induction of immunogenic cell death in murine melanoma by a novel thiosemicarbazone derivative [abstract]. Conference of Young Scientists of Institute of Cell Biology and University of Rzeszów. Lviv, Ukraine, May 20, 2024.

3.6. Моделювання механізму реактивації мутантних форм білка p53 за участю нових α-N-гетероциклічних тіосемікарбазонів

3.6.1. Селективність відомих реактиваторів p53 до кишені L1/S3

Перед застосуванням описаної в розділі 2.7.1 моделі для оцінки селективності COTI-NMe_2, ми провели її апробацію на трьох відомих реактиваторах p53: MQ (похідному APR-246), STIMA-1 та стиктовій кислоті. Показники докінгу для STIMA-1 та стиктової кислоти, зв'язаної з кишенею L1/S3 p53 R175H, були достовірно нижчими, ніж показники для нецільових позицій (рис. 11). Результати скорингової функції Vina є приблизним прогнозом вільної енергії зв’язування ΔG, тому нижчі значення відповідають більшій спорідненості до сайту. Таким чином, отримані показники свідчать про те, що ці реактиватори є селективними до ділянки L1/S3.

Попри те, що MQ реактивує p53 за механізмом, аналогічним до механізму STIMA-1, він проявив тенденцію до менш сприятливих показників докінгу для всіх розглянутих варіантів p53, включно з p53 R175H, без вираженої різниці в результатах між L1/S3-сайтом та нецільовими сайтами. Незважаючи на цей виняток, спорідненість до кишені L1/S3, ймовірно, є характерною особливістю більшості низькомолекулярних реактиваторів структурних мутацій p53, оскільки воно сприяє наближенню цих молекул до тіольної групи залишку Cys124. Ця близькість має вирішальне значення для механізму реактивації, особливо для тіол-реактивних сполук, таких як STIMA-1, а також для похідного бензімідазолу UCI-LC0045 (Durairaj et al., 2022) – попри те, що при дослідженні механізму дії цього похідного *in vitro* не було підтверджено тіол-реактивності. Невідомо, чи стиктова кислота діє за тим самим механізмом, що й STIMA-1 та MQ. Для неї було запропоновано декілька можливих механізмів, включно з утворенням більш реакційноздатних проміжних сполук (Wassman et al., 2013). Тим не менш, селективність до кишені L1/S3 узгоджується з раніше запропонованими

механізмами реактивації p53 і може бути використана для оцінки інших потенційних реактиваторів p53.

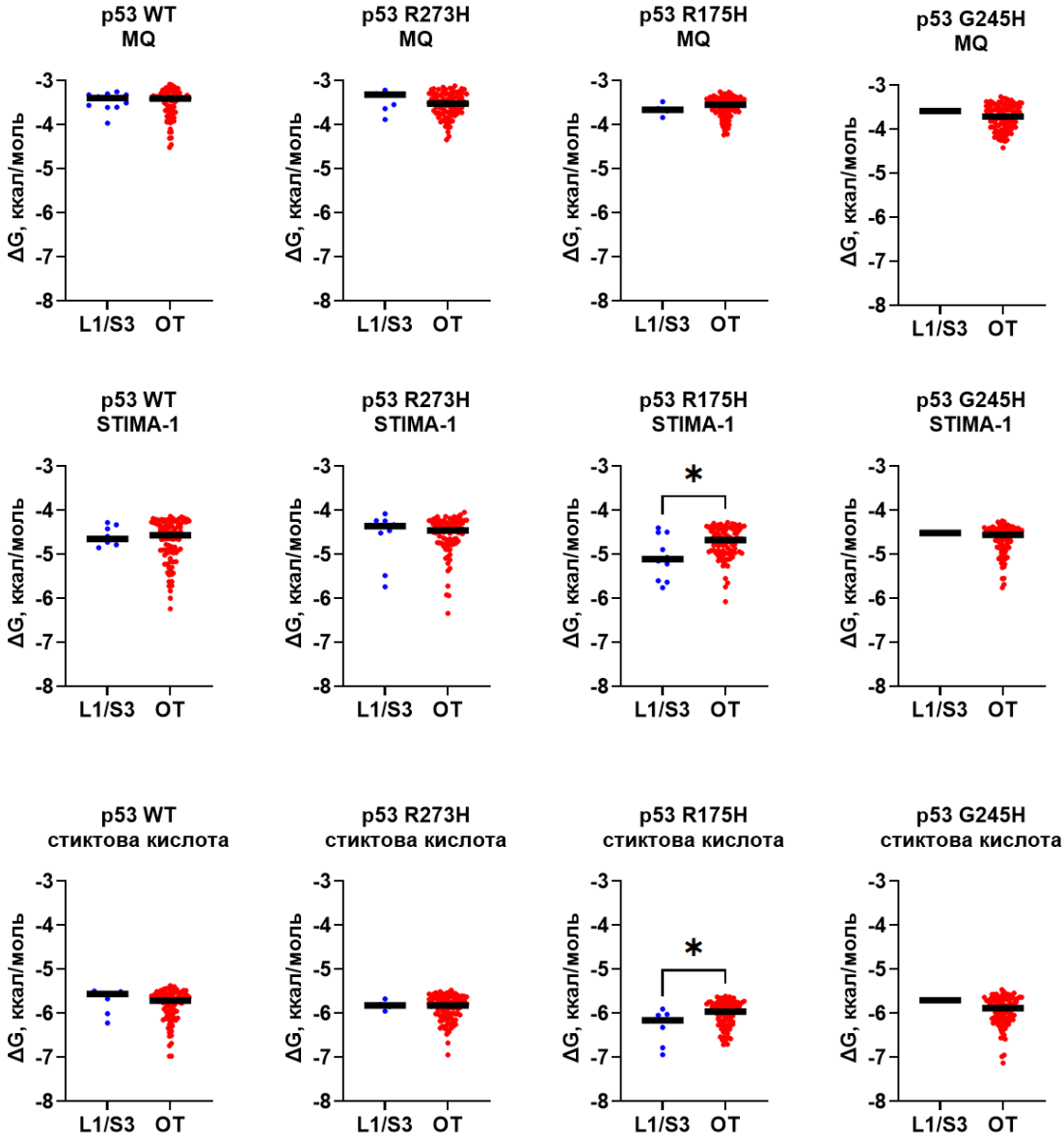


Рисунок 11. Показники докінгу для MQ, STIMA-1 та стиктової кислоти, зв’язаних із сайтами на поверхні ДНК-зв'язувального домену p53 дикого типу та трьох мутантних форм p53: R273H (контактна мутація), R175H та G245H (структурні мутації). Кожна діаграма показує розподіл балів (значень скорингової функції Vina, яке є приблизним прогнозом вільної енергії зв’язування ΔG) для 100 найбільш сприятливих позицій докінгу, розділених на 2 групи: 1) зв'язані з кишенею L1/S3

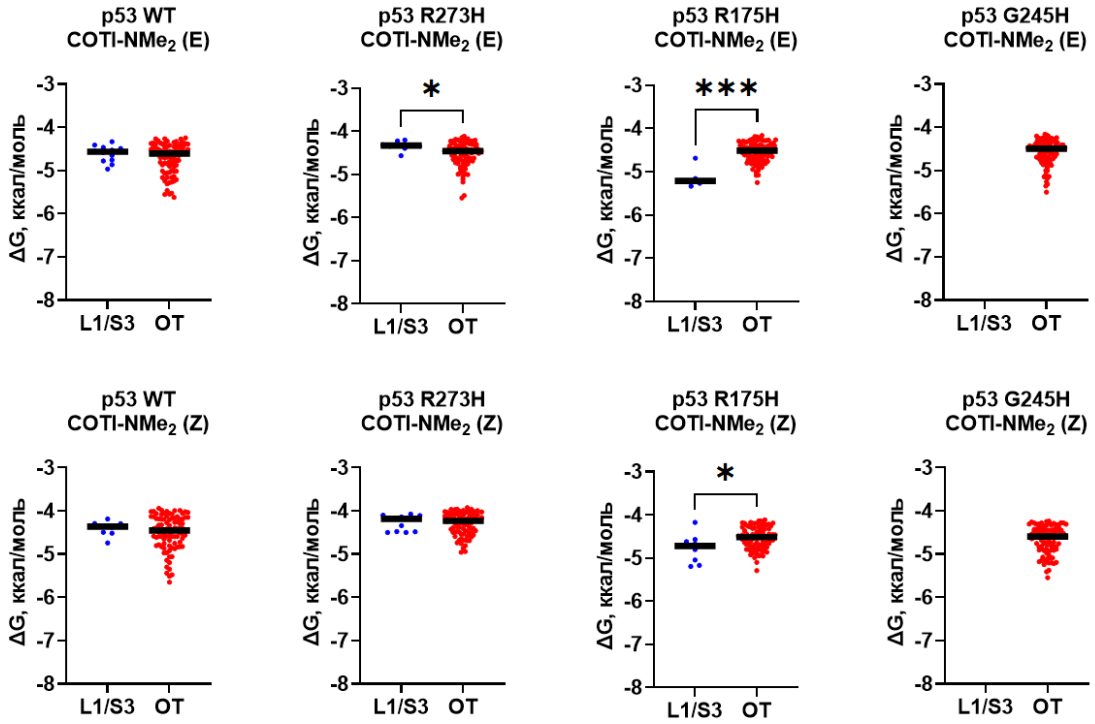
(сині точки) з відстанню між лігандом і атомом сульфуру залишку Cys124 менше 5 Å, і 2) зв'язані з нецільовими сайтами (OT, off-target, червоні точки) де ліганд зв'язаний із будь-якою іншою ділянкою на поверхні молекули, а відстань між атомом сульфуру залишку Cys124 і лігандом понад 5 Å. * $p < 0.05$.

3.6.2. Передбачається, що COTI-NMe₂ селективно зв'язується з кишенею L1/S3

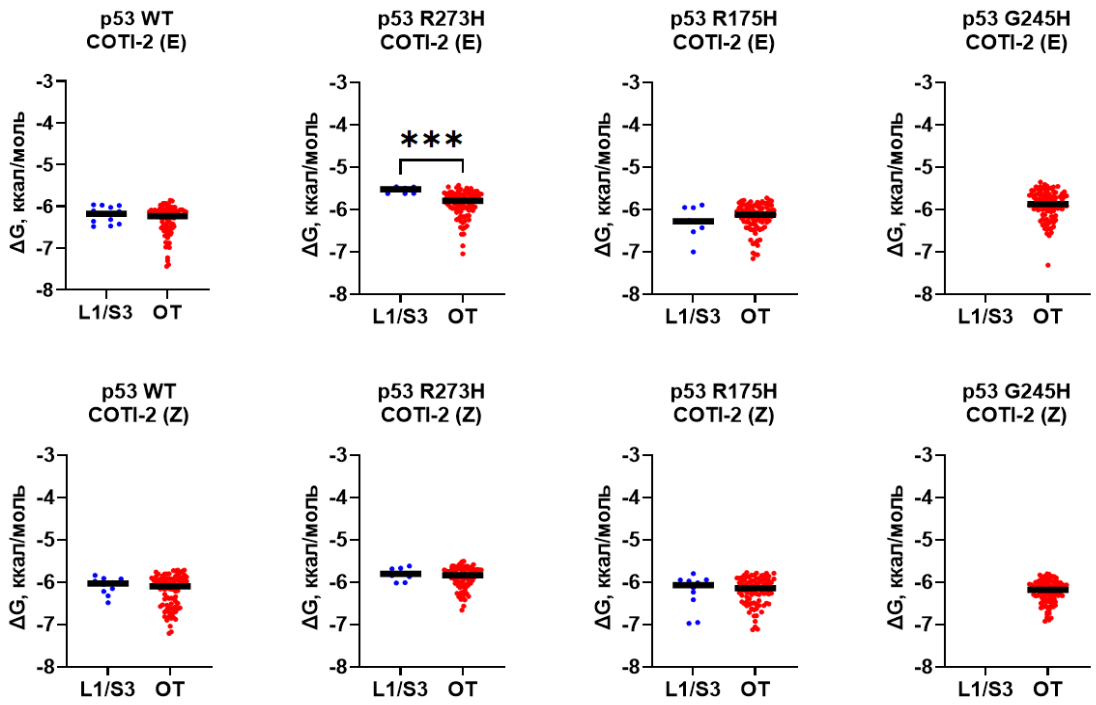
При аналізі кожного похідного тіосемікарбазону було враховано обидва геометричні ізомери цих сполук – (*Z*)-ізомер та (*E*)-ізомер кожного похідного. Показники скорингової функції Vina для обох ізомерів COTI-NMe₂, зв'язаних з кишенею L1/S3 p53 R175H, були достовірно нижчими, ніж показники для докінгових позицій, що відповідали нецільовому зв'язуванню. Ці результати відповідають показникам для відомих реактиваторів p53, таких як STIMA-1 та стиктова кислота. Це свідчить про те, що COTI-NMe₂ може проявляти селективність до кишені L1/S3 (рис. 12а). До того ж зазначена різниця в показниках для (*E*)-COTI-NMe₂ була ще більш вираженою, ніж для STIMA-1 та стиктової кислоти. Вища прогнозована селективність саме для (*E*)-ізомеру становить інтерес в контексті іншого механізму реактивації p53 α-N-гетероциклічними тіосемікарбазонами. Він передбачає хелатування іонів Zn^{2+} і був запропонований для COTI-2 (Lindemann et al., 2019). На відміну від (*Z*)-ізомерів, (*E*)-ізомери COTI-2 та COTI-NMe₂ мають сприятливу конфігурацію трьох атомів (S, N, N), які можуть брати участь у координаційному зв'язуванні іонів металів. У найбільш сприятливій позиції докінгу всі три згадані атоми розміщені поза кишенею L1/S3 (рис. 13), таким чином залишаючись доступними для утворення комплексів з іонами Zn^{2+}. В цілому, порівняння результатів докінгу свідчить про те, що прогнозована селективність COTI-NMe₂ до кишені L1/S3 в p53 R175H перевищує селективність, передбачену для реактиваторів p53 STIMA-1 та стиктової кислоти, а тому COTI-NMe₂ може сам виступати в ролі реактиватора p53. Передбачена конформація зв'язування COTI-

NMe_2 допускає потенційну інтеграцію двох механізмів реактивації p53: рефолдингу за участю Zn^{2+} та рефолдингом, опосередкованим зв'язуванням із кишенею L1/S3. Відносна важливість кожного механізму, а також існування інших можливих механізмів залишаються нез’ясованими, проте порівняно з іншими розглянутими сполуками, прогнозована селективність COTI-NMe_2 до сайту L1/S3 перевищує аналогічні значення для похідних тіосемікарбазону COTI-2 та ZMC2 (рис. 12б-12в).

а)



б)



в)

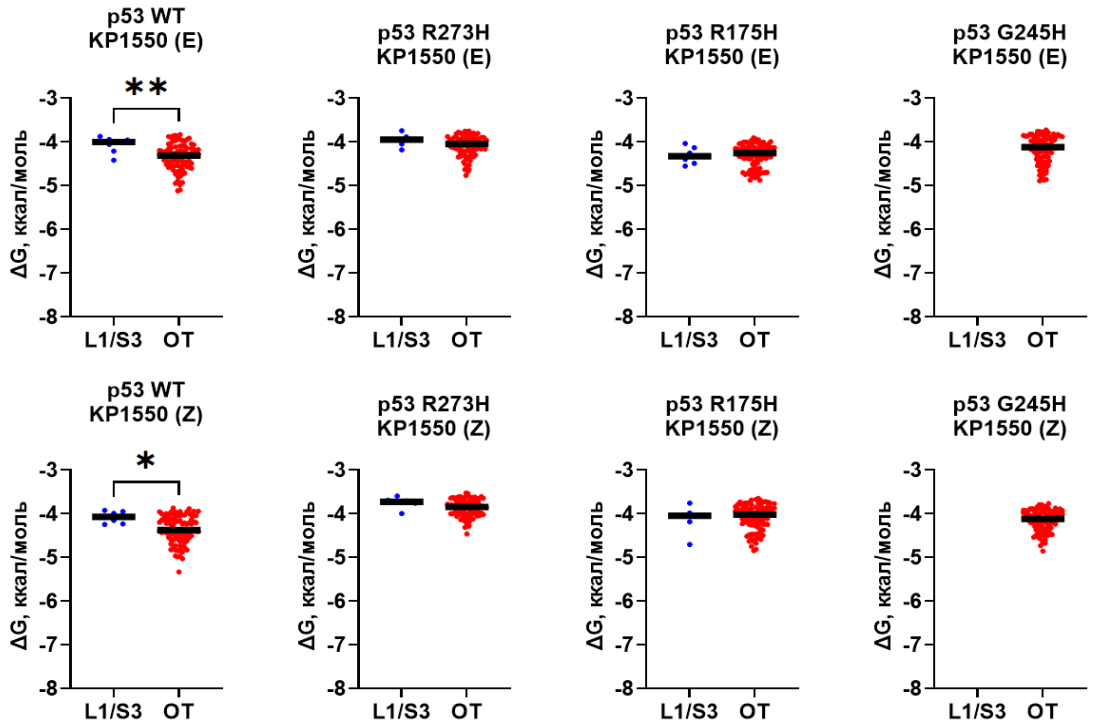


Рисунок 12. Показники докінгу COTI-NMe_2 (а) та інших α-N-гетероциклічних тіосемікарбазонів, COTI-2 (б) і ZMC2 (в), зв'язаних із сайтами на поверхні ДНК-

зв'язувального домену p53 дикого типу та трьох мутантних форм p53: R273H (контактна мутація), R175H та G245H (структурні мутації). Літери E та Z позначають два різні геометричні ізомери кожної сполуки, які аналізувалися окремо. Кожна діаграма показує розподіл балів (значень скорингової функції Vina, яке є приблизним прогнозом вільної енергії зв’язування ΔG) для 100 найбільш сприятливих позицій докінгу, розділених на 2 групи: 1) зв'язані з кишенею L1/S3 (сині точки) з відстанню між лігандом і атомом сульфуру залишку Cys124 менше 5 Å, і 2) зв'язані з нецільовими сайтами (OT, off-target, червоні точки) де ліганд зв'язаний із будь-якою іншою ділянкою на поверхні молекули, а відстань між атомом сульфуру залишку Cys124 і лігандом понад 5 Å. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3.6.3. Конформаційні відмінності в кишені L1/S3 у різних варіантах p53 та їх значення для передбачуваної селективності

У контексті попереднього порівняння, проведеного для α-N-гетероциклічних тіосемікарбазонів, слід зазначити, що для p53 R273H показники докінгу для (*E*)-COTI-NMe_2 і (*E*)-COTI-2 були більш сприятливими для нецільових сайтів, ніж для кишені L1/S3 (рис. 12а-12б). Однак R273H є контактною мутацією, і наразі немає свідчень, що мутантну форму p53 R273H можна реактивувати за допомогою рефолдингу з використанням малих молекул. Подібна несприятлива різниця показників докінгу спостерігається і для сполуки ZMC2, зв’язаного із p53 дикого типу (рис. 12в). Однак результати для сполуки COTI-NMe_2, зв’язаного з кишенею L1/S3 дикого типу p53, також є менш сприятливими, ніж для мутантної форми p53 R175H (рис. 13).

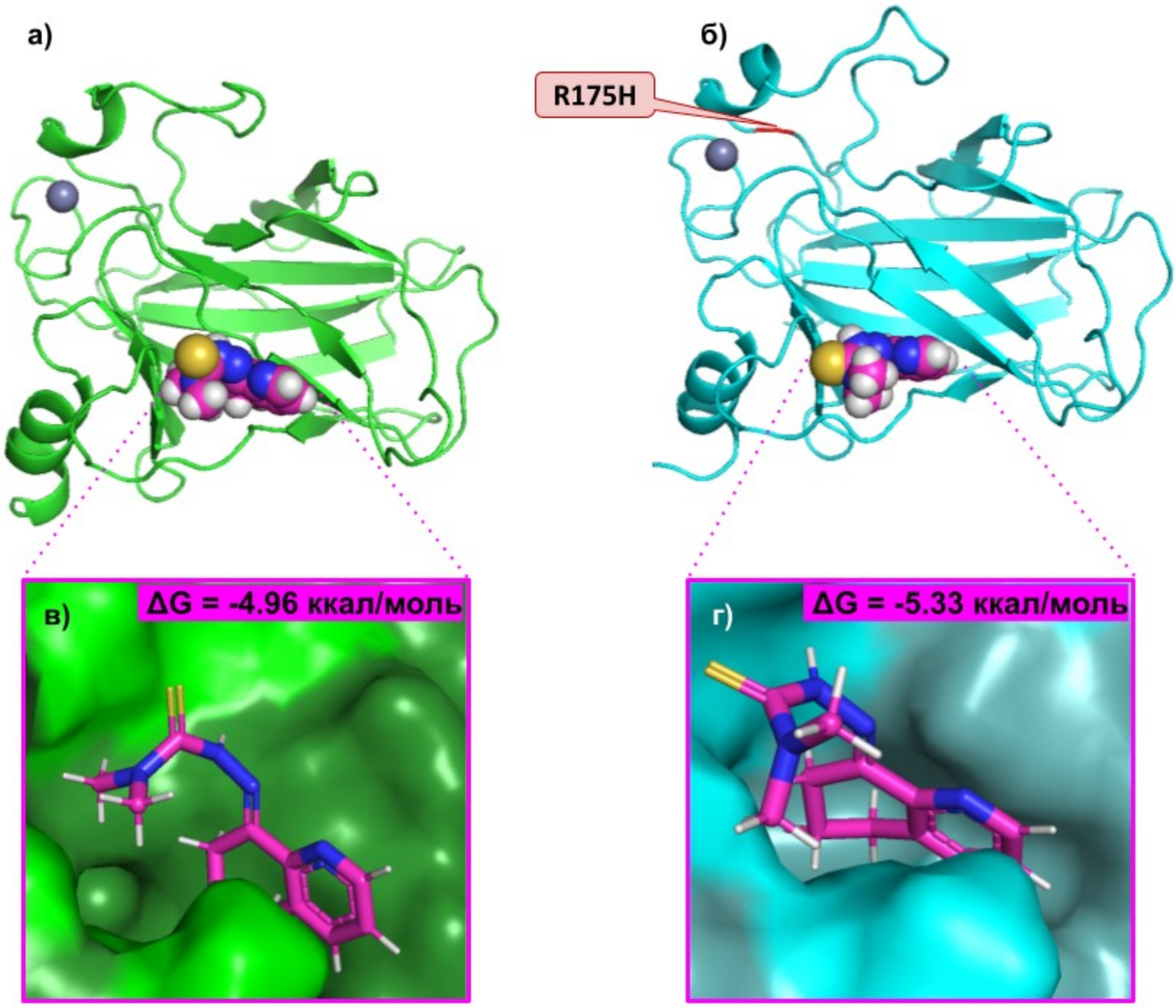


Рисунок 13. Третинна структура ДНК-зв'язувальних доменів білка p53 дикого типу (а) та p53 з мутацією R175H (б) у комплексі із COTI-NMe_2. Ліганд зв'язується з кишенею L1/S3 білка p53, але конформація кишені відрізняється у p53 дикого типу (в) та p53 R175H (г). Значення ΔG вказують на показники скорингової функції Vina для позицій ліганду, зв'язаного з сайтом L1/S3 кожного варіанту p53 і є приблизними прогнозами вільної енергії зв’язування. Прогнозована енергія зв'язування для COTI-NMe_2, зв'язаного з p53 дикого типу, вища, ніж для p53 R175H, що вказує на вищу прогнозовану афінність COTI-NMe_2 до мутантної форми p53 R175H порівняно з білком дикого типу. На даному рисунку зображені позиції докінгу для сайту L1/S3 із найнижчими прогнозованими значеннями ΔG. Результати для вибірки позицій наведені на рис. 12а.

Щодо мутації G245H, то для всіх 9-ти проаналізованих лігандів практично не прогнозується зв'язування з ділянкою L1/S3, незважаючи на те, що G245H є структурною мутацією. Це узгоджується з попередніми дослідженнями, проведеними з використанням цієї самої структури G245H і може бути пояснено несприятливою конформацією залишку Leu-114, яка переважає в мутантній формі G245H (Wassman et al., 2013). Можна було б припустити, що різниця в результатах докінгу для різних варіантів p53 може бути зумовлена упередженим вибором конформацій з відкритою кишенею L1/S3. Однак слід підкреслити, що кожна конформація p53, що використовувалася в аналізі, репрезентує найбільш чисельний кластер із траєкторії молекулярної динаміки серед кластерів із відкритою конформацією кишені L1/S3, тобто є типовою конформацію для відповідного варіанту p53 (Wassman et al., 2013). Таким чином, конформаційні особливості кишені L1/S3 у структурах різних варіантів не є довільними. Навпаки, вони репрезентують прогнозовані характеристики p53 дикого типу та відповідних мутантних форм цього білка.

3.6.4. COTI-NMe_2 стабілізує конформацію структурного мутанта p53 R175H

Для прогнозування впливу сполуки COTI-NMe_2 на структурну стабільність мутантного p53 R175H ми провели симуляцію молекулярної динаміки тривалістю 100 нс для мутантної форми p53 та p53 дикого типу в комплексі з (*E*)-COTI-NMe_2 та без нього. Значення середньоквадратичного відхилення координат атомів (root mean square deviation, RMSD) для білкового остову свідчать про стабілізуючий вплив COTI-NMe_2 на структуру p53 R175H, порушену точковою мутацією (рис. 14).

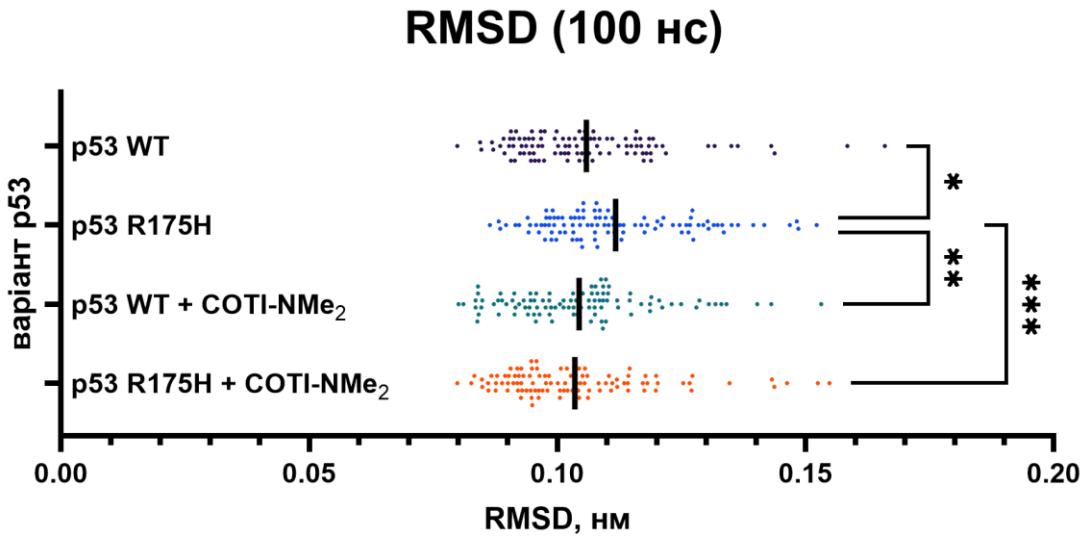


Рисунок 14. Значення середньоквадратичного відхилення координат атомів (root mean square deviation, RMSD), розраховані для білкового остову p53 дикого типу та p53 R175H з COTI-NMe$_2$ та без нього. Аналіз проводився на траєкторії молекулярної динаміки триалістю 100 нс. RMSD для p53 з мутацією R175H без ліганду достовірно вища, ніж для p53 дикого типу та p53 R175H в комплексі з COTI-NMe$_2$. Це свідчить про дестабілізацію структури білка внаслідок міссенс-мутації гена *TP53* та стабілізувальний вплив COTI-NMe$_2$ на структуру p53 R175H, але не на структуру p53 дикого типу. Траєкторія молекулярної динаміки була розбита на 100 сегментів, і для кожного сегмента RMSD розраховували незалежно. Кожна точка на діаграмі відповідає значенню RMSD одного сегмента траєкторії.

3.6.5. Прогнозована стабільність комплексу p53 R175H – COTI-NMe$_2$

Окрім впливу на стабільність структури білка, за допомогою моделювання молекулярної динаміки ми спрогнозували стабільність комплексу (*E*)-COTI-NMe$_2$ з p53 R175H порівняно з комплексами з (*Z*)-COTI-NMe$_2$, STIMA-1 та стиктовою кислотою (рис. 15).

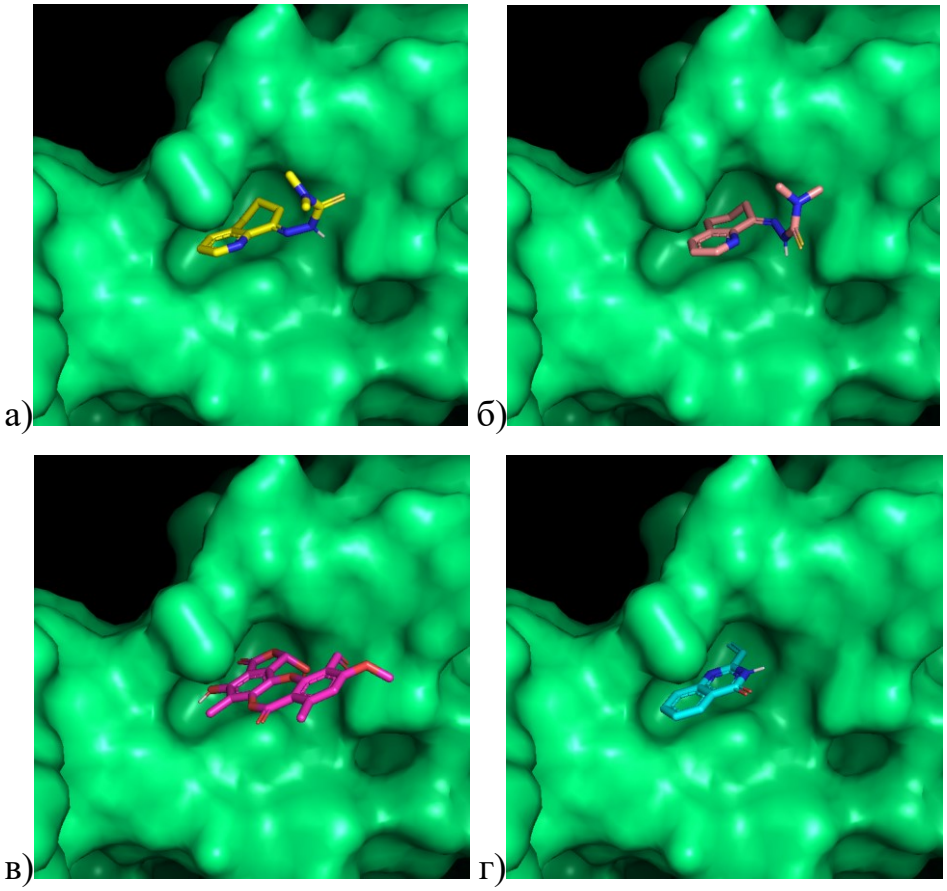
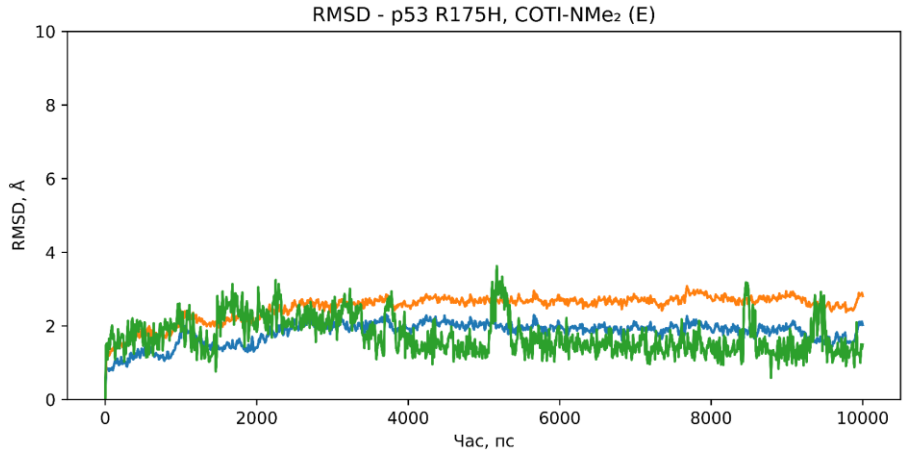
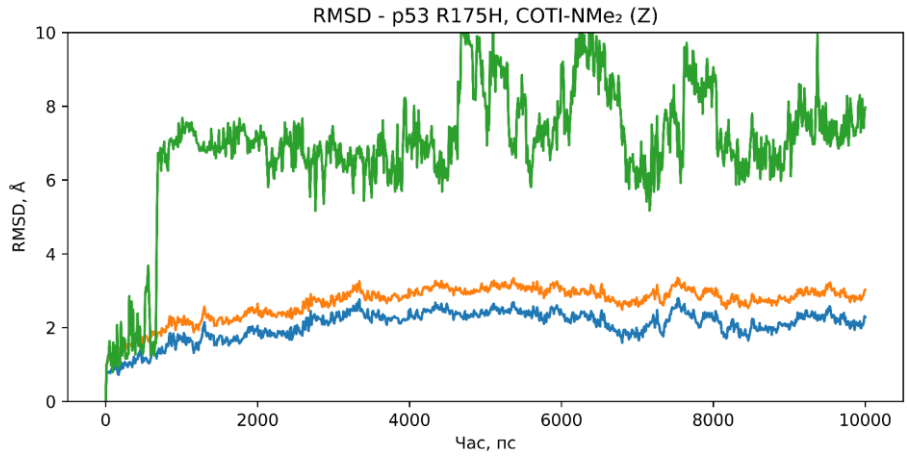


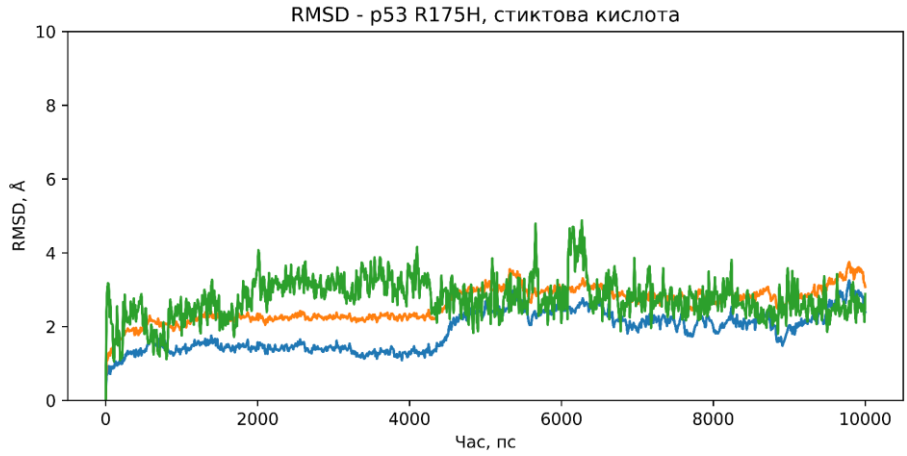
Рисунок 15. Прогнозовані конформації COTI-NMe_2: (*E*)-ізомеру (а) та (*Z*)-ізомеру (б) у порівнянні зі стиктовою кислотою (в) та STIMA-1 (г), зв'язаними з кишенею L1/S3 білка p53 з мутацією R175H.

Комплекс білка p53 з мутацією R175H з (*E*)-COTI-NMe_2 демонструє стабільно низькі значення середньоквадратичного відхилення (RMSD) координат атомів ліганду (в межах 2 Å) протягом перших 10 нс траєкторії, використаних для порівняння з іншими лігандами, що свідчить про стабільність комплексу. Цікаво, що значення RMSD для COTI-NMe_2 були навіть більш сприятливими, ніж ті, що спостерігалися для STIMA-1 і стиктової кислоти в комплексі з p53 R175H (рис. 16). Слід підкреслити, що (*E*)-COTI-NMe_2 залишався зв'язаним з кишенею L1/S3 білка p53 з мутацією R175H протягом 100 нс симуляції (рис. 14). Це узгоджується з результатами для стиктової кислоти, отриманими в іншому дослідженні, де ліганд

залишався зв’язаним із L1/S3-сайтом протягом симуляції молекулярної динаміки тривалістю 60 нс (Wassman et al., 2013).







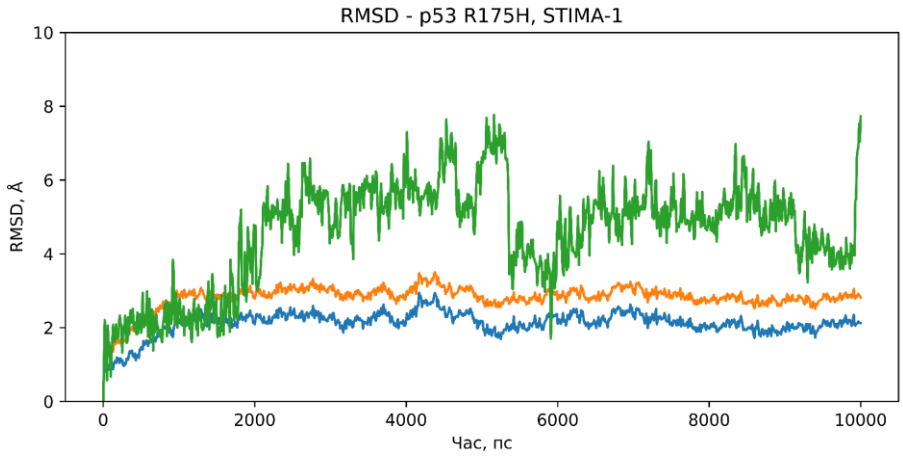


Рисунок 16. Динаміка RMSD, розрахована для атомів поліпептидного каркасу (синій), усіх атомів білка (помаранчевий) та атомів ліганду (зелений) протягом 10 нс траєкторії симуляції молекулярної динаміки для p53 з мутацією R175H в комплексі з чотирма різними лігандами: двома раніше описаними реактиваторами p53: STIMA-1 та стиктовою кислотою, які використовували як позитивні контролі, та двома ізомерами COTI-NMe_2. Значення RMSD для атомів лігандів для (*E*)-COTI-NMe_2 здебільшого перебувають в межах діапазону 2 Å і є стабільно нижчими, ніж для STIMA-1 і стиктової кислоти, що свідчить про стабільність комплексу з COTI-NMe_2.

Результати досліджень даного розділу наведено в наступній публікації:

Klishch M., Panchuk R., Stoika R. A novel thiosemicarbazone derivative as a potential reactivator of mutant p53: *in silico* evaluation [abstract]. VIII Scientific Conference “Latest Advances in Biotechnology”, Kyiv Aviation Institute, Department of Biotechnology, Kyiv, Ukraine, April 25, 2025.

3.7. Вплив COTI-NMe_2 на внутрішньоклітинну локалізацію білка p53 та його реактивацію

За допомогою методу імунофлуоресцентного аналізу встановлено, що локалізація білка p53 дикого типу у клітинах лінії HCT116 є здебільшого дифузною: білок локалізується як у цитоплазмі, так і в ядрі – лише в поодиноких клітинах спостерігали виражену ядерну локалізацію активного p53. У клітинах лінії HCT116, трансфекованих плазмідною конструкцією, що містила ген *TP53* з мутацією R175H, було виявлено знижений вміст активного p53 у нативній конформації. Обробка цих клітин сполукою COTI-NMe_2 супроводжується відновленням рівня нативного p53, також для нього спостерігали більш виражену ядерну локалізацію, що підтверджує відновлення функціональної активності білка p53 під дією COTI-NMe_2. На відміну від трансфекованих клітин HCT116, що синтезують білок p53 з мутацією R175H, рівень активного p53 та його локалізація в клітинах лінії HCT116, що синтезують білок p53 дикого типу не проявляє вираженої залежності від COTI-NMe_2 (рис. 17).

Результати проведеного нами аналізу Вестерн-блот свідчать про часо- та дозозалежне зростання рівня білка p53 у клітинах HCT-116, що синтезують мутантний білок p53 із мутацією R175H (рис. 18).

Отримані результати узгоджуються із нашою гіпотезою про механізм дії COTI-NMe_2 як реактиватора p53, запропонованою на підставі результатів проведеного нами молекулярного докінгу та молекулярної динаміки.

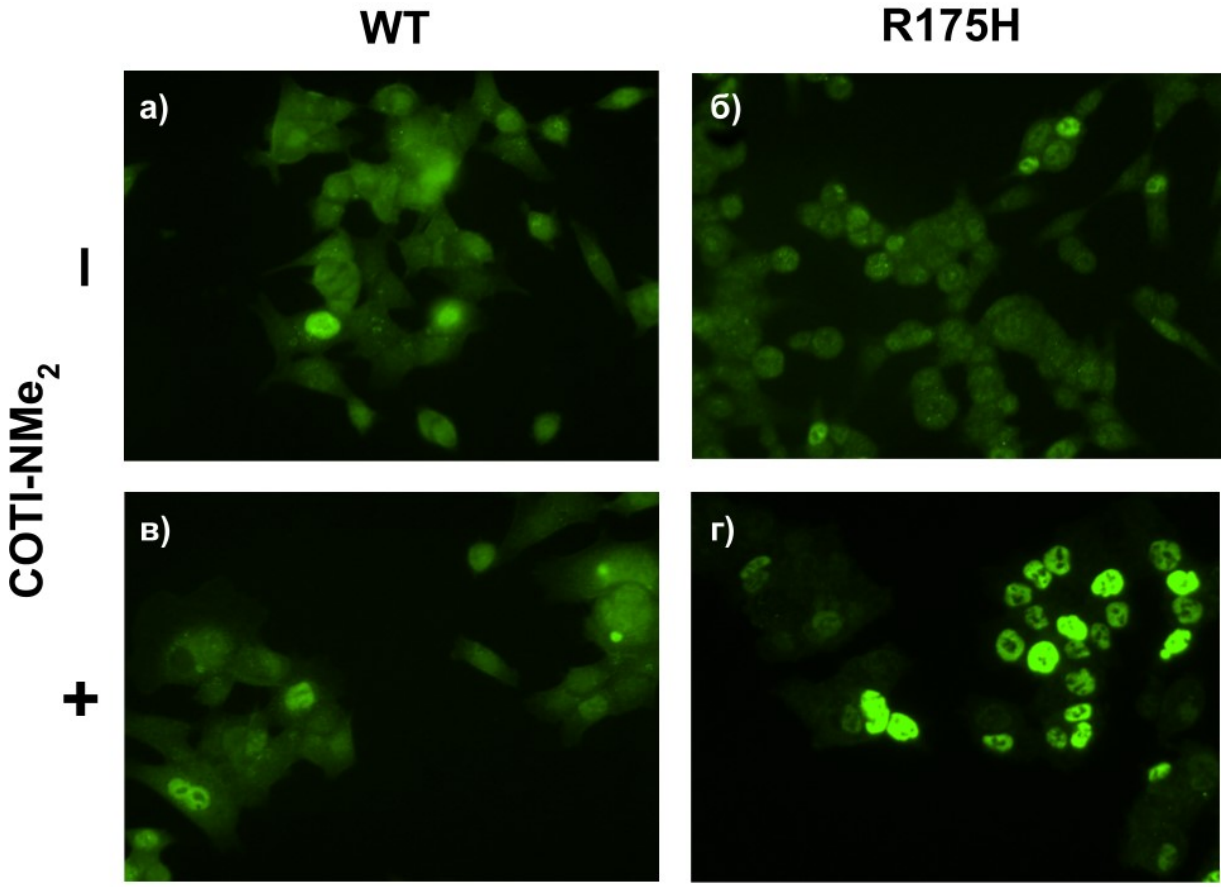


Рисунок 17. а) Локалізація та вміст активного білка p53 дикого типу (WT) в клітинах лінії HCT116; б) клітини HCT116, що експресують p53 R175H, демонструють знижену інтенсивність флуоресценції, що вказує на втрату нативної конформації p53; в) обробка COTI-NMe_2 не змінює рівня p53 та його локалізацію в клітинах HCT116, що синтезують p53 дикого типу; г) COTI-NMe_2 відновлює ядерну локалізацію конформаційно нативного p53 в клітинах лінії HCT116 p53 R175H, що вказує на функціональну реактивацію. Перше антитіло: анти-p53 (DO-1); друге антитіло: Alexa Fluor 488.

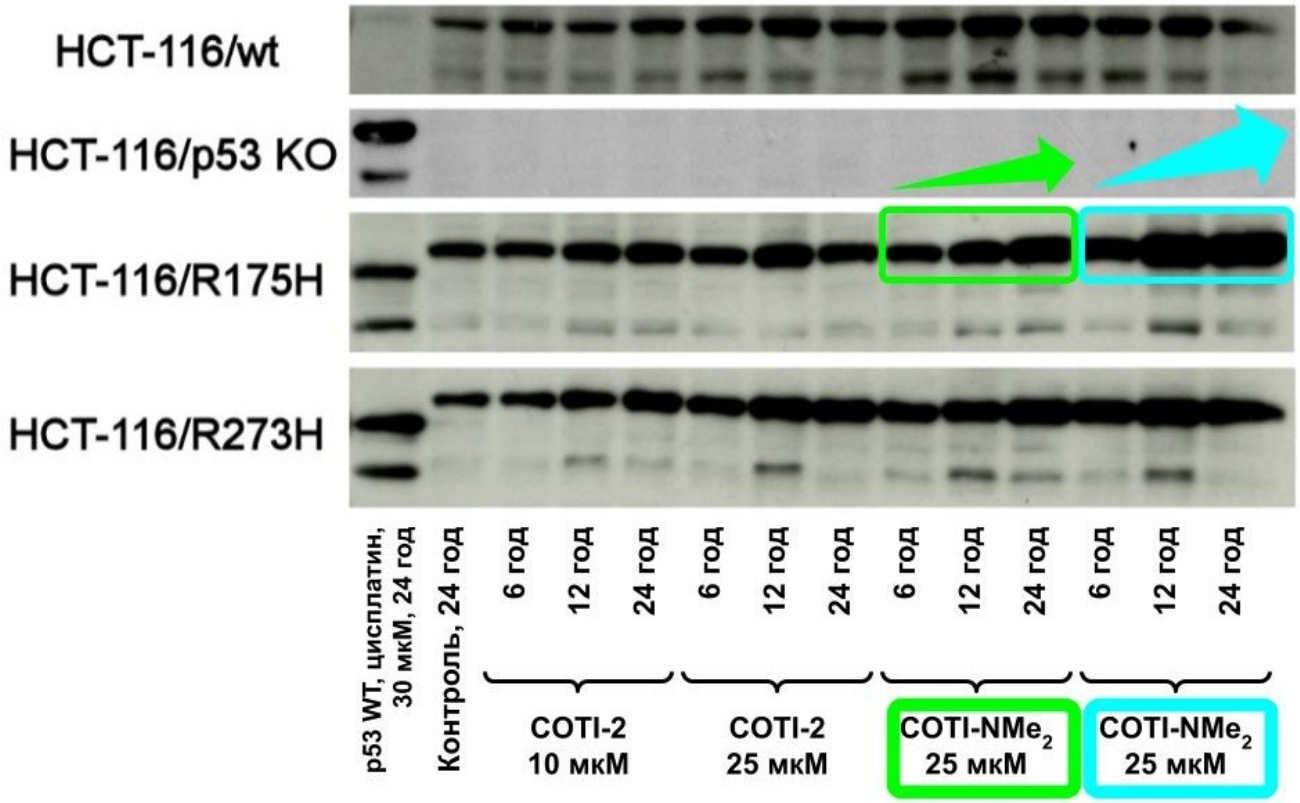


Рисунок 18. Рівень білка p53 в клітинах лінії HCT116, що експресують p53 з мутацією R175H, через 6, 12 та 24 год після дії на ці клітини, сполукою COTI-NMe_2 у концентраціях 10 мкМ та 25 мкМ. p53 WT – білок p53 дикого типу; KO – нокаут гена *TP53*.

Результати досліджень даного розділу наведено в наступній публікації:

Klishch M., Panchuk R., Stoika R. A novel thiosemicarbazone derivative as a potential reactivator of mutant p53: *in silico* evaluation [abstract]. VIII Scientific Conference "Latest Advances in Biotechnology", Kyiv Aviation Institute, Department of Biotechnology, Kyiv, Ukraine, April 25, 2025.

3.8. Імуномодулююча дія α-N-гетероциклічних тіосемікарбазонів

3.8.1. Дослідження резистентності до росту трансплантованих пухлин в експериментальних тварин

Було проведено порівняння ефективності клітинних вакцин на основі клітин меланоми миші B16F10 дикого типу за умов попередньої обробки клітин різними концентраціями COTI-NMe_2 за різної тривалості дії препарату: протягом 24 год у концентраціях 5 мкМ та 10 мкМ; протягом 48 год у концентраціях 500 нМ та 1 мкМ.

Порівняння показників виживаності тварин без появи пухлин (ВБП) показало, що найбільший рівень виживаності і найменша частота росту пухлин спостерігалася у групі мишей, імунізованих клітинами B16F10, які піддавалися впливу COTI-NMe_2 у концентрації 500 нМ протягом 48 год. Крім цього, у тварин, вакцинованих клітинами B16F10 після 48-годинної інкубації із препаратом, у разі розвитку пухлин вони досягали меншого об’єму, ніж у тварин, вакцинованих клітинами B16F10 після 24-годинної обробки COTI-NMe_2 (рис. 19).

Таким чином, обробка клітин B16F10 нижчими дозами COTI-NMe_2 (500 нМ) протягом довшого часу дії (48 год) дозволяє отримати більш ефективну клітинну вакцину на основі меланоми B16F10, порівняно з іншими комбінаціями дози та тривалості дії. Це дозволяє зробити висновок, що цитотоксичність препарату та імуногенність загиблих клітин не є безпосередньо пов’язаними.

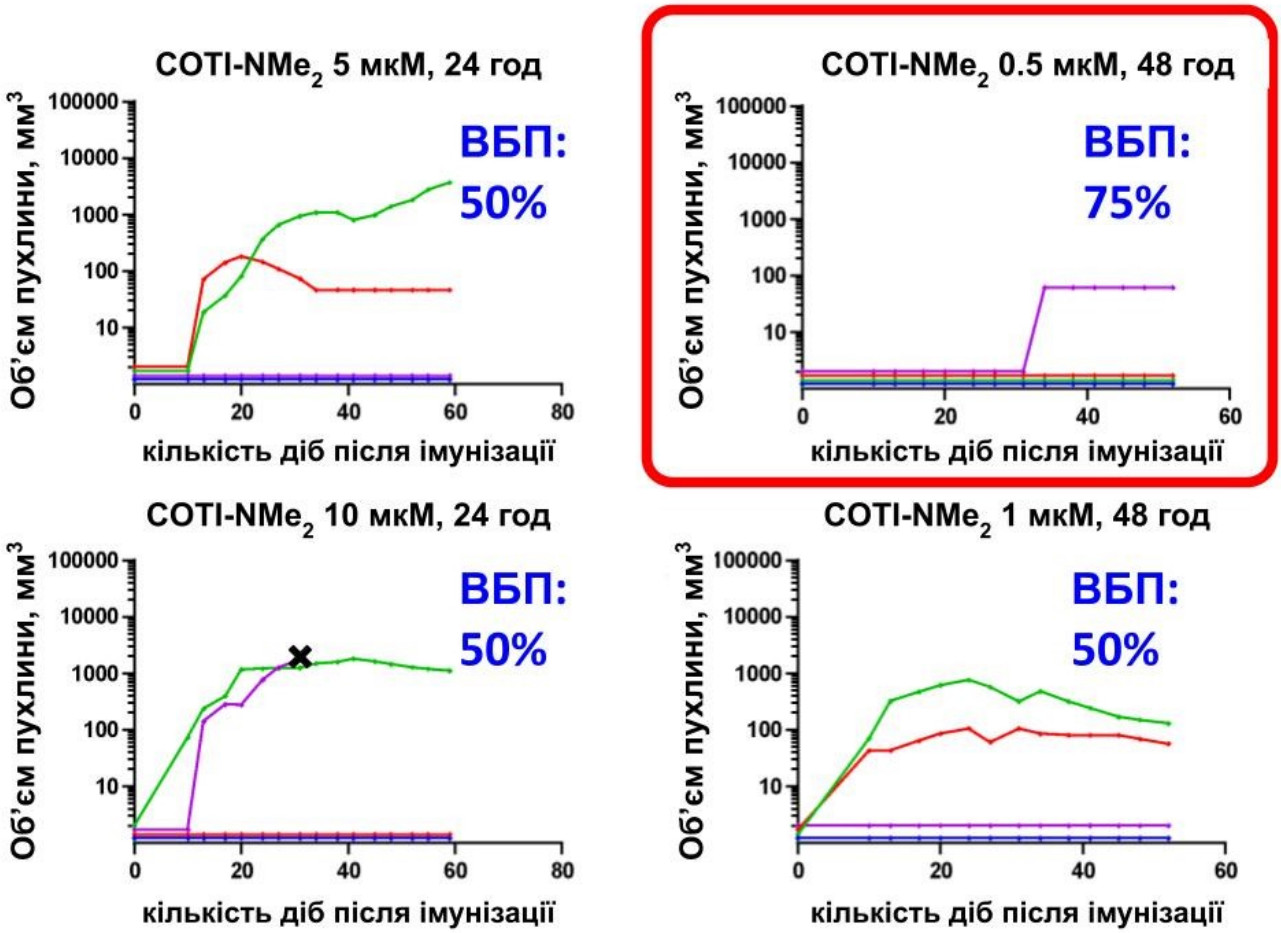


Рисунок 19. Результати порівняння ефективності клітинних вакцин, виготовлених на основі клітин меланоми B16F10, оброблених COTI-NMe2 в різних концентраціях та за різної тривалості дії. Х – загибель тварини; ВБП – виживаність без появи пухлин.

Гематологічні показники мишей, імунізованих клітинами B16F10, обробленими COTI-NMe2 (48 год, 500 нМ) відповідають гематологічним показникам у здорових мишей (рис. 20), що є додатковим свідченням ефективності даної клітинної вакцини. Описану нормалізацію гематологічних показників, зокрема рівня сегментованих нейтрофілів та лімфоцитів, спостерігали також у мишей C57BL/6, імунізованих клітинами NK/Ly, які були попередньо оброблені індукторами ІЗК доксорубіцином та оксаліплатином (Klishch et al., 2024) (рис. 21).

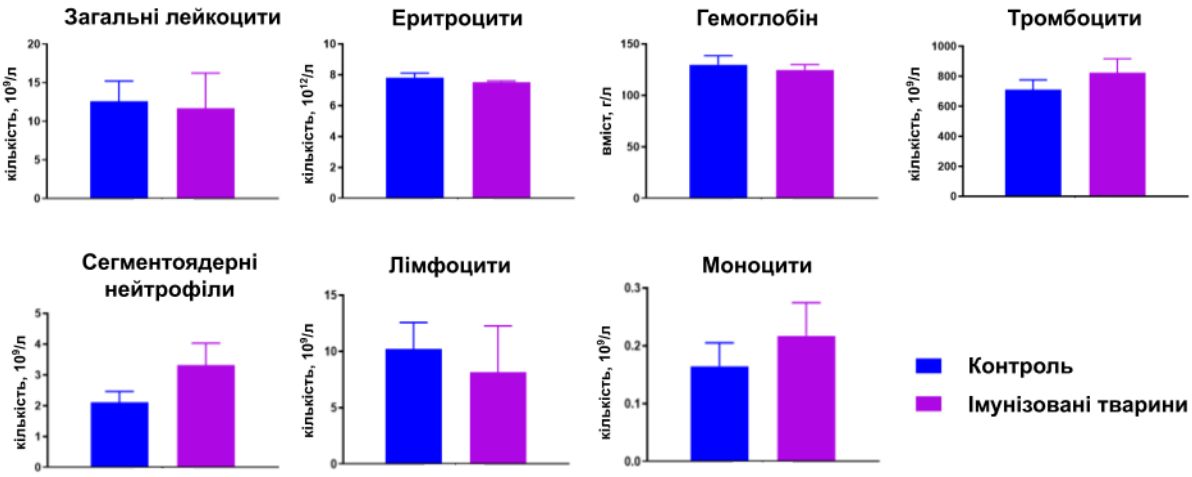


Рисунок 20. Гематологічні показники мишей C57BL/6, імунізованих клітинами B16F10, попередньо обробленими COTI-NMe_2 (48h, 500 нМ) не проявляють виражених відмінностей порівняно з гематологічними показниками здорових тварин.

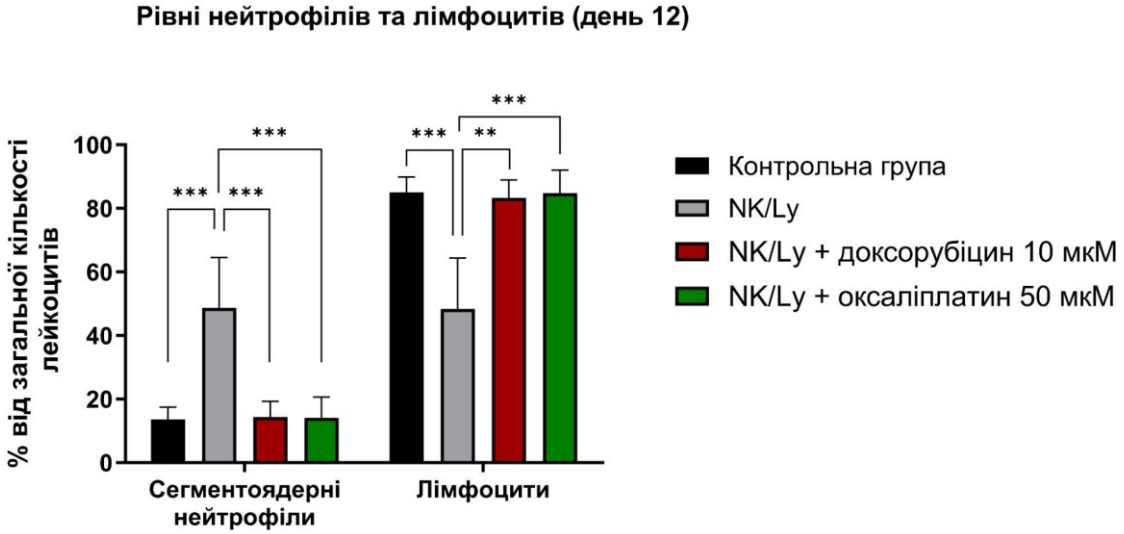


Рисунок 21. Аналіз формули крові самок мишей лінії C57BL/6, імунізованих клітинною вакциною на основі лімфоми NK/Ly. Порівняно із групою здорових мишей, тварини, у яких розвинулася асцитна пухлина після інокуляції необробленими клітинами NK/Ly, продемонстрували більш високе співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів. Навпаки, тварини, імунізовані клітинами NK/Ly,

обробленими доксорубіцином і оксаліплатином, не показали істотних відмінностей у рівнях нейтрофілів і лімфоцитів порівняно зі здоровими тваринами. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (попарні порівняння). Кожна група містила по 4 тварини. Статистичний аналіз виконано в GraphPad Prism 9. Dox – доксорубіцин; Oxp – оксаліплатин.

3.8.2. Вплив на фагоцитарну активність

Показано, що культивування мишачих макрофагів лінії J774.2 у кондиціонованому середовищі RPMI протягом 48 год, у якому до цього протягом 72 год культивували клітини B16F10, призводить до достовірного зростання фагоцитарного числа порівняно з контролем (клітинами, які культивували у некондиціонованому середовищі RPMI). Це зростання стає найбільш вираженим за дії низьких концентрацій COTI-NMe_2 (3.13 нМ та 6.25 нМ, ** $p < 0.01$ та *** $p < 0.001$ відповідно) на клітини B16F10 протягом 72 год культивування у середовищі RPMI (рис. 22).

При культивуванні клітин лінії J774.2 у кондиціонованому середовищі RPMI без COTI-NMe_2 спостерігається тенденція до зростання фагоцитарного числа, проте ця відмінність не є статистично достовірною. Це свідчить про те, що кондиціонування середовища без впливу COTI-NMe_2 не є фактором, який впливає на активацію фагоцитозу. Натомість зростання фагоцитарного числа зумовлене саме впливом COTI-NMe_2. Якщо спиратися лише на результати оцінки фагоцитарної активності, можна виділити дві гіпотези, що пояснюють вплив COTI-NMe_2 на фагоцитарну активність. Перша полягає у безпосередній дії сполуки на клітини J774.2. Друга гіпотеза пояснює цей вплив через тривалу дію низьких концентрацій COTI-NMe_2 на клітини B16F10, що призводить до вивільнення молекулярних патернів, пов’язаних із пошкодженням, які, у свою чергу, розпізнаються макрофагами лінії J774.2 та стимулюють їхню фагоцитарну активність. Щоб оцінити обґрунтованість кожної з цих гіпотез, необхідно

розглянути результати оцінки фагоцитарної активності в комплексі із результатами імунізації тварин.

Дані щодо зростання фагоцитарної активності клітин лінії J774.2, яке пов’язане із низькими концентраціями COTI-NMe_2, загалом узгоджуються з даними експериментів з імунізації лабораторних тварин (мишей C57BL/6). В обох випадках очікуваний результат був досягнутий за дії низьких доз препарату на клітини B16F10 протягом тривалого часу дії (48–72 год). Як розвиток резистентності до трансплантованих пухлин, так і зростання фагоцитарної активності є тими проявами, які спостерігаються при індукції імуногенної загибелі клітин під дією хіміотерапевтичних препаратів *in vivo* та *in vitro*, що опосередковано свідчить про здатність низьких доз сполуки COTI-NMe_2 індукувати імуногенну загибель пухлинних клітин. Оскільки даний ефект не спостерігається при вищих концентраціях COTI-NMe_2, це опосередковано вказує на наявність інших механізмів дії, які не пов’язані з індукцією ІЗК, домінують при вищих концентраціях препарату і проявляються як зростання загальної цитотоксичності без виражених імуногенних наслідків загибелі пухлинних клітин.

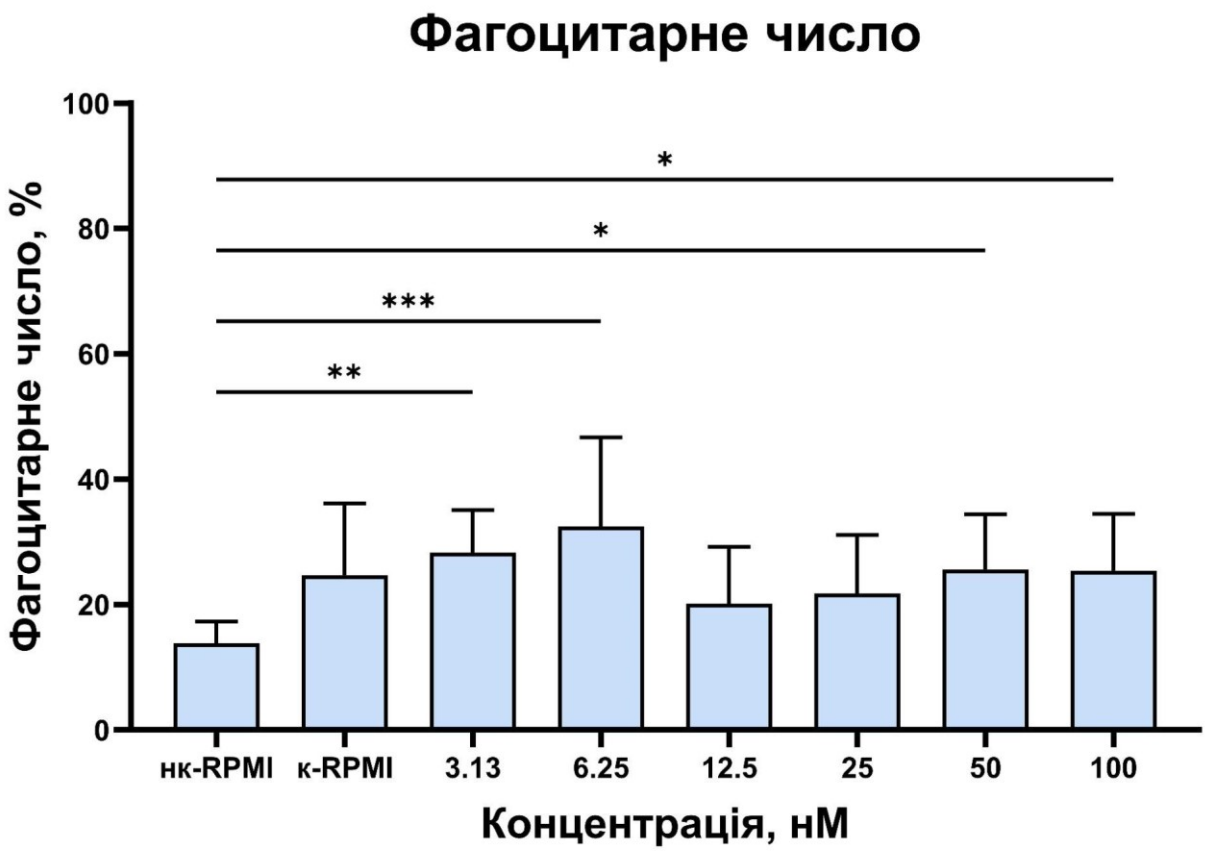
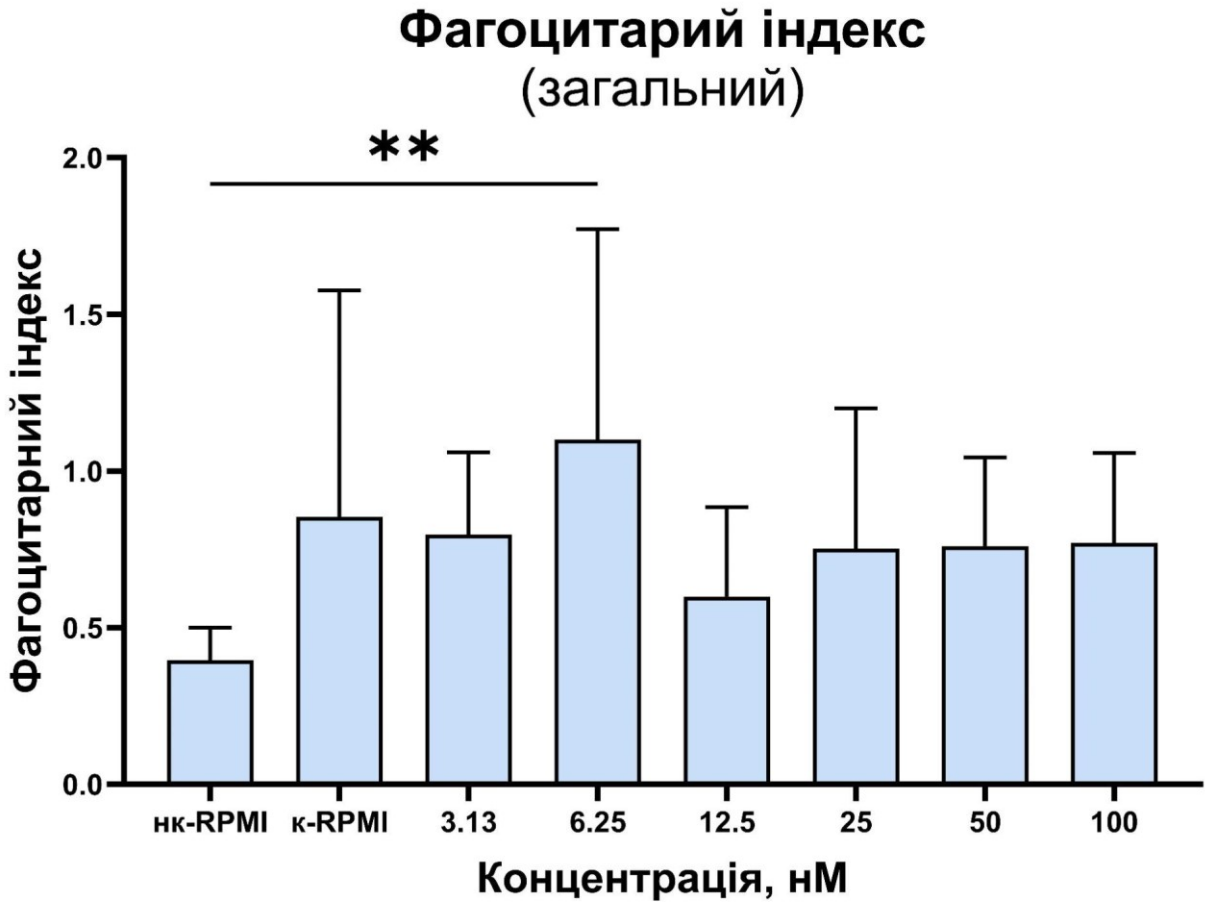


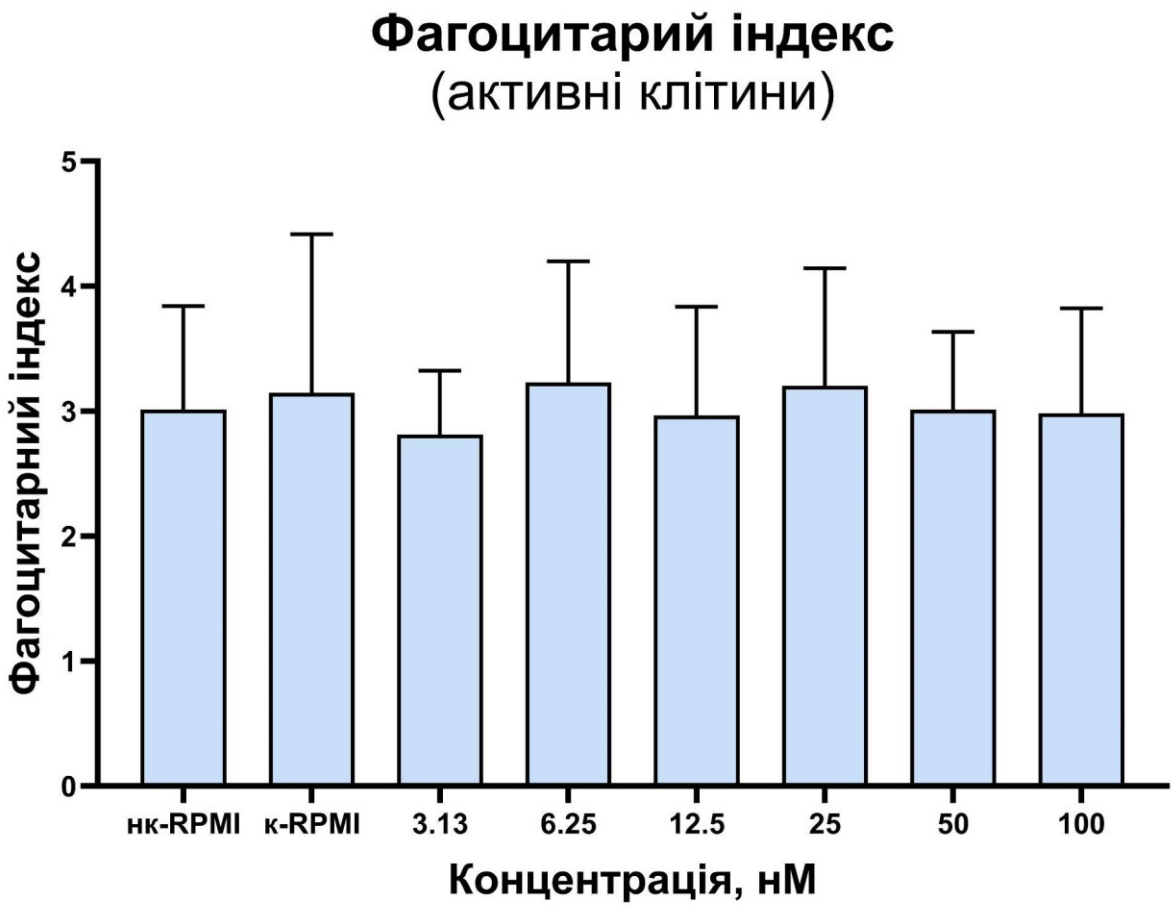
Рисунок 22. Клітини лінії J774.2 культивували протягом 48 год. у некондиціонованому середовищі RPMI або кондиціонованому RPMI із культури клітин B16F10, оброблених COTI-NMe_2 в різних концентраціях, та необроблених клітин B16F10. Клітини J774.2, які культивували в кондиціонованому середовищі RPMI характеризувалися вищою фагоцитарною активністю, що визначалася за часткою активних фагоцитарних клітин. Продемонстровано зростання фагоцитарного числа для клітин J774.2 при зростанні концентрації COTI-NMe_2, проте лише для низьких доз <10 нМ, які не проявляють вираженої цитотоксичної дії. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

При порівнянні інших показників фагоцитозу, таких як загальний фагоцитарний індекс та фагоцитарний індекс для активних клітин, було виявлено,

що динаміка загального фагоцитарного індексу збігалася із динамікою фагоцитарного числа. Проте фагоцитарний індекс, обчислений лише для активних фагоцитів, не залежав від концентрації COTI-NMe$_2$ (рис. 23). Це вказує на те, що дія факторів, що були виділені в кондиціонованое к впливу на клітини сполуки COTI-NMe$_2$, не пов’язана із посиленням активації вже активних фагоцитів. Тобто вона не впливає на середню кількість фагоцитованих частинок – клітин термоінактивованих дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Проте вплив COTI-NMe$_2$ та факторів, виділених у кондиціоноване середовище, проявляється через зростання частки активованих фагоцитів.

а)





б)

Рисунок 23. Показники загального фагоцитарного індексу (а) та фагоцитарного індексу активних фагоцитів (б) для клітин J774.2. Зміни загального фагоцитарного індексу відповідали змінам фагоцитарного числа. Водночас індекс, розрахований лише для активних фагоцитів, не демонстрував залежності від концентрації COTI-NMe_2. Це свідчить про те, що дія факторів, виділених у кондиціоноване середовище під впливом COTI-NMe_2 не полягає в посиленні активності вже активованих фагоцитів (тобто не впливає на середню кількість фагоцитованих частинок – клітин термоінактивованих *Saccharomyces cerevisiae*), а пов'язаний зі збільшенням кількості фагоцитів, які перейшли в активний стан. ** $p < 0.01$.

Таким чином, нами продемонстровано зростання фагоцитарної активності для клітин лінії J774.2 при зростанні концентрації COTI-NMe_2, проте лише для низьких

доз <10 нМ, які не проявляють вираженої цитотоксичної дії. Зростання характеризувалося збільшенням частки фагоцитарних клітин J774.2, які після культивування у кондиціонованому середовищі поглинали клітини термоінактивованих дріжджів, проте середня кількість часток, поглинутих активними фагоцитами залишалася сталою. Спираючись на результати оцінки фагоцитарної активності *in vitro* та дані експериментів *in vivo* з імунізації лабораторних тварин, можна стверджувати, що найбільш імовірним поясненням зв'язку між впливом сполуки COTI-NMe_2 та фагоцитарною активністю макрофагів є здатність цієї сполуки індукувати імуногенну загибель пухлинних клітин, що супроводжується виділенням факторів, які стимулюють фагоцитоз.

Результати досліджень даного розділу наведено в наступних публікаціях:

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

2. **Klishch M.**, Skorokhyd N., Panchuk R., Stoika R. Study of capability of traditional and experimental antitumor drugs to induce immunogenic cell death in murine NK/Ly lymphoma [abstract]. 1st International Conference of Young Scientists of the Institute of Cell Biology and the University of Rzeszów "Current Issues in Cell Biology and Biotechnology". Lviv, Ukraine – Rzeszów, Poland, June 2, 2021.

3. **Klishch M.**, Skorokhyd N., Panchuk R., Stoika R. Time and dose-dependent induction of immunogenic cell death in murine melanoma by a novel thiosemicarbazone derivative [abstract]. Conference of Young Scientists of Institute of Cell Biology and University of Rzeszów. Lviv, Ukraine, May 20, 2024.

4. **Klishch M.**, Skorokhyd N., Panchuk R., Stoika R. Induction of immunogenic cell death in murine melanoma by a novel thiosemicarbazone derivative [abstract]. In:

7th Congress of the All-Ukrainian Public Organization «Ukrainian Society of Cell Biology» with international representation; 2024, Lviv, Ukraine. https://doi.org/10.30970/uscb.2024

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

У ході виконання дисертаційної роботи було запропоновано механізми протипухлинної дії досліджуваних нових гетероциклічних сполук на основі даних молекулярного докінгу, молекулярної динаміки та експериментальних даних, а також проведено обґрунтування цих гіпотез шляхом проведення подальших експериментів. Отримані результати свідчать про перспективність використання досліджуваних сполук як мультифункціональних протипухлинних чинників та свідчать про доцільність подальших досліджень цих сполук та оцінки їхнього потенціалу для клінічного застосування. Проведений порівняльний аналіз даних досліджень *in silico, in vitro* та *in vivo* засвідчує взаємозв'язок між структурними особливостями досліджуваних молекул і специфікою їхньої дії на клітинному та організмовому рівнях.

Вивчення цитотоксичних властивостей гетероциклічної сполуки COTI-NMe_2, що належить до родини α-N-гетероциклічних тіосемікарбазонів (Pósa et al., 2022) показало перевагу цієї сполуки над раніше відомим аналогом COTI-2 щодо здатності викликати загибель злоякісних клітин. Для всіх тестованих ліній пухлинних клітин (CT26, B16F10, HCT116) спостерігали більш виражену дію нового похідного, що вказує на його підвищену спорідненість до критичних молекулярних мішеней та/або ефективніше внутрішньоклітинне накопичення. Принципово важливим є той факт, що COTI-NMe_2 зберігає ефективність щодо ізогенної лінії B16F10/ADR – експериментальної меланоми з фенотипом множинної резистентності до ліків. Подібна дія дозволяє припустити, що ця сполука обходить класичні механізми мультирезистентності, зокрема, дію ABC-транспортерів, що підкреслює її терапевтичну перевагу над традиційними хіміопрепаратами. Ці результати узгоджуються з даними іншого дослідження, у якому було продемонстровано, що структурні відмінності у молекули COTI-NMe_2

порівняно з COTI-2 запобігають розвитку резистентності пухлинних клітин до цього препарату (Pósa et al., 2022).

Значний інтерес також становить порівняльна оцінка ефективності дії похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу (сполуки Les-6547, Les-6557), які демонструють виражену селективність до клітин колоректального раку і мінімальний вплив на нормальні та псевдонормальні клітини. Це важливо з огляду на необхідність зменшення неспецифічної дії, яка часто обмежує клінічне застосування сполук із цитотоксичними властивостями.

За результатами моделювання *in silico*, одним із механізмів дії сполуки COTI-NMe_2, ймовірно, є реактивація мутантного білка p53. Зокрема, ця сполука виявила порівняно високу спорідненість до ділянки L1/S3 – кишені, яка утворюється в деяких конформаційних станах p53, в тому числі за наявності мутації R175H (Wassman et al., 2013). У той час як багато відомих реактиваторів p53 мають неспецифічну тіолову реактивність (Fallatah et al., 2023), це не притаманно для сполуки COTI-NMe_2. Окрім того, структурно-функціональні особливості COTI-NMe_2 зумовлюють його потенційну здатність діяти як металошаперон та впливати на активність білка p53 через зміну внутрішньоклітинної концентрації Zn^{2+}. Такий механізм дії був підтверджений для інших α-N-гетероциклічних тіосемікарбазонів із протипухлинною дією (Lindemann et al., 2019), що дозволяє розглядати його і як потенційний механізм дії COTI-NMe_2.

Також було запропоновано механізм дії сполук Les-6547 і Les-6557 як потенційних інгібіторів циклін-залежної кінази CDK2, що відіграє важливу роль у прогресії клітинного циклу (Zhang et al., 2024). Їхній інгібувальний ефект запропоновано за результатами використання методу молекулярного докінгу, а також частково обґрунтовано за допомогою експериментальних даних, зокрема даних клоногенного аналізу і проточної цитометрії, які продемонстрували блокування проліферації клітин за рахунок зупинки у фазі G1/S. Це свідчить про

потенціал цих сполук як інгібіторів сигналів проліферації з незалежним від p53 механізмом дії, що є важливим для пухлин із порушеною p53-сигналізацією. Подальші дослідження цих сполук можуть бути спрямовані на застосування молекулярно-біологічних методів для отримання безпосередніх свідчень щодо їх впливу на кіназу CDK2, які можуть дати більш переконливі докази на користь запропонованого нами механізму.

Результати наших досліджень *in vivo* дозволили охарактеризувати COTI-NMe_2 як індуктор імуногенної загибелі клітин (ІЗК). Цей тип загибелі має принципове значення, оскільки супроводжується вивільненням молекулярних структур, пов'язаних із пошкодженням (damage-associated molecular patterns, DAMP), активацією антиген-презентувальних клітин та запуском імунної відповіді проти пухлинних клітин (Serrano-del Valle et al., 2019). Проведені нами експерименти з використанням клітинних вакцин на основі B16F10 засвідчили, що 48-годинна обробка клітин COTI-NMe_2 у концентрації 500 нМ забезпечує найбільш виражений захисний ефект. У імунізованих мишей спостерігали не лише зниження частоти появи пухлин, але й істотно менші темпи пухлинного росту та значно менший розмір пухлин у разі їх появи.

Отримані результати дозволяють зробити висновок про те, що ефективність індукції ІЗК залежить не лише від цитотоксичної дії сполуки, але, насамперед, від механізму її дії. Характерно, що коротка експозиція або надмірні дози COTI-NMe_2 знижували імуногенність, що підкреслює необхідність ретельного підбору параметрів для стимуляції протипухлинного імунітету.

Окрему увагу в роботі було приділено впливу сполуки COTI-NMe_2 на фагоцитарну активність мишачих макрофагів лінії J774.2. Встановлено, що при низьких концентраціях (<10 нМ) відбувається зростання кількості активних фагоцитів, здатних поглинати частинки термоінактивованих дріжджів. Цей процес відбувається без істотного зростання середньої кількості поглинутих часток на

клітину, що свідчить не про активацію одиничних фагоцитів, а про залучення до процесу більшої кількості клітин. Такий ефект, ймовірно, опосередковується вивільненням хемоатрактантів з попередньо оброблених пухлинних клітин, що характерно для процесу імуногенної загибелі клітин. Це може свідчити про потенціал сполуки COTI-NMe_2 як імуномодулювального засобу, який, імовірно, має здатність активувати протипухлинний імунітет.

Оскільки більшість сучасних препаратів виявляють обмежену ефективність при агресивних пухлинах, особливо із мутаціями *TP53*, стратегія, яка поєднує реактивацію p53 (COTI-NMe_2) з пригніченням проліферативних сигналів сполуками Les-6547 та Les-6557, заслуговує на подальше вивчення. Такий комбінований підхід дозволяє не лише підвищити терапевтичну ефективність, але й зменшити ймовірність рецидиву за рахунок активації імунної пам’яті. Важливо, що запропонована стратегія охоплює різні рівні патогенезу пухлинного процесу – від безпосереднього знищення пухлинних клітин до модифікації їх мікрооточення та активації протипухлинного імунітету. Тому цей підхід заслуговує на подальше дослідження у доклінічних і, потенційно, клінічних випробуваннях.

ВИСНОВКИ

1. Сполуки Les-6547 та Les-6557, що є похідними тіопірано[2,3-d]тіазолу, володіють цитотоксичною дієюзі 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.
2. Результати клоногенного 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.
3. Сполука COTI-NMe_2 з родини α-N-гетероциклічних тіосемікарбазонів є потужнішим цитотоксичним чинником, ніж її попередник – сполука COTI-2. Цитотоксична дія COTI-NMe_2 співрозмірна з дією іншого α-N-гетероциклічного тіосемікарбазону – тріапіну. COTI-NMe_2 ефективно пригнічує ріст клітин мишачої меланоми B16F10 не лише дикого типу, але й резистентної лінії B16F10/ADR.
4. Результати молекулярного докінгу передбачають, що одним з потенційних механізмів дії COTI-NMe_2 може бути реактивація мутантних форм білка p53.
5. 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.
6. Дія сполуки COTI-NMe_2 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-NMe_2.
7. Продемонстровано здатність сполуки COTI-NMe_2 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.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Adebayo, A. S., Agbaje, K., Adesina, S. K., & Olajubutu, O. (2023). Colorectal Cancer: Disease Process, Current Treatment Options, and Future Perspectives. Pharmaceutics, 15(11), 2620. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112620

2. Ahmed, A., & Tait, S. W. G. (2020). Targeting immunogenic cell death in cancer. Molecular Oncology, 14(12), 2994–3006. https://doi.org/10.1002/1878-0261.12851

3. Allard, B., Allard, D., Buisseret, L., & Stagg, J. (2020). The adenosine pathway in immuno-oncology. Nature Reviews Clinical Oncology, 17(10), 611–629. https://doi.org/10.1038/s41571-020-0382-2

4. Amores-Iniesta, J., Barberà-Cremades, M., Martínez, C. M., Pons, J. A., Revilla-Nuin, B., Martínez-Alarcón, L., Di Virgilio, F., Parrilla, P., Baroja-Mazo, A., & Pelegrín, P. (2017). Extracellular ATP Activates the NLRP3 Inflammasome and Is an Early Danger Signal of Skin Allograft Rejection. Cell Reports, 21(12), 3414–3426. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.079

5. Andersson, U., & Tracey, K. J. (2011). HMGB1 Is a Therapeutic Target for Sterile Inflammation and Infection. Annual Review of Immunology, 29(1), 139–162. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101323

6. Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M. C., Ullrich, E., Saulnier, P., Yang, H., Amigorena, S., Ryffel, B., Barrat, F. J., Saftig, P., Levi, F., Lidereau, R., Nogues, C., Mira, J.-P., … Zitvogel, L. (2007). Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. Nature Medicine, 13(9), 1050–1059. https://doi.org/10.1038/nm1622

7. Arnold, D., Lueza, B., Douillard, J.-Y., Peeters, M., Lenz, H.-J., Venook, A., Heinemann, V., Van Cutsem, E., Pignon, J.-P., Tabernero, J., Cervantes, A., &

Ciardiello, F. (2017). Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials. Annals of Oncology, 28(8), 1713–1729. https://doi.org/10.1093/annonc/mdx175

8. Ballal, D. S., & Saklani, A. P. (2024). Colon cancer: feeling the imbalance? Colorectal Disease, 26(5), 1059–1060. https://doi.org/10.1111/codi.16945

9. Baugh, E. H., Ke, H., Levine, A. J., Bonneau, R. A., & Chan, C. S. (2017). Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers? Cell Death & Differentiation, 25(1), 154–160. https://doi.org/10.1038/cdd.2017.180

10. Bell, C. W., Jiang, W., Reich, C. F., III, & Pisetsky, D. S. (2006). The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 291(6), C1318–C1325. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00616.2005

11. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A., & Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. The Journal of Chemical Physics, 81(8), 3684–3690. https://doi.org/10.1063/1.448118

12. Berg, K. C. G., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Johannessen, B., Bruun, J., Danielsen, S. A., Bjørnslett, M., Meza-Zepeda, L. A., Eknæs, M., Lind, G. E., Myklebost, O., Skotheim, R. I., Sveen, A., & Lothe, R. A. (2017). Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines – a resource for biomedical studies. Molecular Cancer, 16(1). https://doi.org/10.1186/s12943-017-0691-y

13. Bergh, J., Norberg, T., Sjögren, S., Lindgren, A., & Holmberg, L. (1995). Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer. Journal of Clinical Oncology, 13(4), 1143–1150. https://doi.org/10.1200/JCO.1995.13.4.1143

14. Berman, H. M. (2000). The Protein Data Bank. Nucleic Acids Research, 28(1), 235–242. https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235

15. Bernini, A., De Angelis, L. H., Morandi, E., Spiga, O., Santucci, A., Assfalg, M., Molinari, H., Pillozzi, S., Arcangeli, A., & Niccolai, N. (2014). Searching for protein binding sites from Molecular Dynamics simulations and paramagnetic fragment-based NMR studies. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics, 1844(3), 561–566. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.12.012

16. Boeckler, F. M., Joerger, A. C., Jaggi, G., Rutherford, T. J., Veprintsev, D. B., & Fersht, A. R. (2008). Targeted rescue of a destabilized mutant of p53 by an in silico screened drug. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(30), 10360–10365. https://doi.org/10.1073/pnas.0805326105

17. Bormio Nunes, J. H., Hager, S., Mathuber, M., Pósa, V., Roller, A., Enyedy, É. A., Stefanelli, A., Berger, W., Keppler, B. K., Heffeter, P., & Kowol, C. R. (2020). Cancer Cell Resistance Against the Clinically Investigated Thiosemicarbazone COTI-2 Is Based on Formation of Intracellular Copper Complex Glutathione Adducts and ABCC1-Mediated Efflux. Journal of Medicinal Chemistry, 63(22), 13719–13732. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01277

18. Braselmann, H., Michna, A., Heß, J., & Unger, K. (2015). CFAssay: statistical analysis of the colony formation assay. Radiation Oncology, 10(1). https://doi.org/10.1186/s13014-015-0529-y

19. Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 74(3), 229–263. https://doi.org/10.3322/caac.21834

20. Bugnon, M., Goullieux, M., Röhrig, U. F., Perez, M. A. S., Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2023). SwissParam 2023: A Modern Web-Based Tool for Efficient

Small Molecule Parametrization. Journal of Chemical Information and Modeling, 63(21), 6469–6475. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c01053

21. Burnstock, G. (2007). Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission. Physiological Reviews, 87(2), 659–797. https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2006

22. Bussi, G., Donadio, D., & Parrinello, M. (2007). Canonical sampling through velocity rescaling. The Journal of Chemical Physics, 126(1). https://doi.org/10.1063/1.2408420

23. Byrne, J. C., Ní Gabhann, J., Stacey, K. B., Coffey, B. M., McCarthy, E., Thomas, W., & Jefferies, C. A. (2013). Bruton's Tyrosine Kinase Is Required for Apoptotic Cell Uptake via Regulating the Phosphorylation and Localization of Calreticulin. The Journal of Immunology, 190(10), 5207–5215. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300057

24. Chen, G. Y., & Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. Nature Reviews Immunology, 10(12), 826–837. https://doi.org/10.1038/nri2873

25. Chen, X., Zhang, T., Su, W., Dou, Z., Zhao, D., Jin, X., Lei, H., Wang, J., Xie, X., Cheng, B., Li, Q., Zhang, H., & Di, C. (2022). Mutant p53 in cancer: from molecular mechanism to therapeutic modulation. Cell Death & Disease, 13(11). https://doi.org/10.1038/s41419-022-05408-1

26. Choi, M., Shin, J., Lee, C.-E., Chung, J.-Y., Kim, M., Yan, X., Yang, W.-H., & Cha, J.-H. (2023). Immunogenic cell death in cancer immunotherapy. BMB Reports, 56(5), 275–286. https://doi.org/10.5483/bmbrep.2023-0024

27. Cisterna, B. A., Kamaly, N., Choi, W. I., Tavakkoli, A., Farokhzad, O. C., & Vilos, C. (2016). Targeted Nanoparticles for Colorectal Cancer. Nanomedicine, 11(18), 2443–2456. https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0194

28. Cock, P. J. A., Antao, T., Chang, J. T., Chapman, B. A., Cox, C. J., Dalke, A., Friedberg, I., Hamelryck, T., Kauff, F., Wilczynski, B., & de Hoon, M. J. L. (2009). Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. Bioinformatics, 25(11), 1422–1423. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp163

29. D. Lootsik, M., M. Lutsyk, M., & S. Stoika, R. (2013). Nemeth-Kellner Lymphoma Is a Valid Experimental Model in Testing Chemical Agents for Anti-Lymphoproliferative Activity*. Open Journal of Blood Diseases, 03(03), 1–6. https://doi.org/10.4236/ojbd.2013.33a001

30. Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2019). SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. Nucleic Acids Research, 47(W1), W357–W364. https://doi.org/10.1093/nar/gkz382

31. Danter, W. R., Brown, M., & Lepifre, F. (2011). Compounds and method for treatment of cancer (U.S. Patent No. 8,034,815 B2). Critical Outcome Technologies, Inc.

32. Das, T., & Mukhopadhyay, C. (2023). Molecular dynamics simulations suggest Thiosemicarbazones can bind p53 cancer mutant R175H. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics, 1871(3), 140903. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2023.140903

33. Dolma, L., & Muller, P. A. J. (2022). GOF mutant p53 in cancers: A therapeutic challenge. Cancers, 14(20), 5091. https://doi.org/10.3390/cancers14205091

34. Durairaj, G., Demir, Ö., Lim, B., Baronio, R., Tifrea, D., Hall, L. V., DeForest, J. C., Lauinger, L., Jebril Fallatah, M. M., Yu, C., Bae, H., Lin, D. W., Kim, J. K., Salehi, F., Jang, C., Qiao, F., Lathrop, R. H., Huang, L., Edwards, R., Rychnovsky, S., … Kaiser, P. (2022). Discovery of compounds that reactivate p53 mutants in vitro and in vivo. Cell chemical biology, 29(9), 1381–1395.e13. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2022.07.003

35. Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., & Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. Journal of Chemical Information and Modeling, 61(8), 3891–3898. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203

36. Ebrahimi, N., Afshinpour, M., Fakhr, S. S., Kalkhoran, P. G., Shadman-Manesh, V., Adelian, S., Beiranvand, S., Rezaei-Tazangi, F., Khorram, R., Hamblin, M. R., & Aref, A. R. (2023). Cancer stem cells in colorectal cancer: Signaling pathways involved in stemness and therapy resistance. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 182, 103920. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2023.103920

37. Elliott, M. R., Chekeni, F. B., Trampont, P. C., Lazarowski, E. R., Kadl, A., Walk, S. F., Park, D., Woodson, R. I., Ostankovich, M., Sharma, P., Lysiak, J. J., Harden, T. K., Leitinger, N., & Ravichandran, K. S. (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. Nature, 461(7261), 282–286. https://doi.org/10.1038/nature08296

38. Fallatah, M. M. J., Law, F. V., Chow, W. A., & Kaiser, P. (2023). Small-molecule correctors and stabilizers to target p53. Trends in Pharmacological Sciences, 44(5), 274–289. https://doi.org/10.1016/j.tips.2023.02.007

39. Farooqi, M. A., Mahnoor, M., Delgado, K. M., Dahlgren, W. T.-T., Kang, C.-U., & Farooqi, H. M. U. (2024). Focused Ultrasound as Targeted Therapy for Colorectal

Cancer: A Comprehensive Review. Gastrointestinal Disorders, 6(2), 380–401. https://doi.org/10.3390/gidisord6020026

40. Fucikova, J., Kasikova, L., Truxova, I., Laco, J., Skapa, P., Ryska, A., & Spisek, R. (2018). Relevance of the chaperone-like protein calreticulin for the biological behavior and clinical outcome of cancer. Immunology Letters, 193, 25–34. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.11.006

41. Fucikova, J., Kepp, O., Kasikova, L., Petroni, G., Yamazaki, T., Liu, P., Zhao, L., Spisek, R., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2020). Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy. Cell Death & Disease, 11(11). https://doi.org/10.1038/s41419-020-03221-2

42. Fucikova, J., Spisek, R., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2020). Calreticulin and cancer. Cell Research, 31(1), 5–16. https://doi.org/10.1038/s41422-020-0383-9

43. Galluzzi, L., Aaronson, S. A., Abrams, J., Alnemri, E. S., Andrews, D. W., Baehrecke, E. H., Bazan, N. G., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D. E., Brenner, C., Castedo, M., Cidlowski, J. A., Ciechanover, A., Cohen, G. M., De Laurenzi, V., De Maria, R., Deshmukh, M., … Kroemer, G. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. Cell Death & Differentiation, 16(8), 1093–1107. https://doi.org/10.1038/cdd.2009.44

44. Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2016). Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. Nature Reviews Immunology, 17(2), 97–111. https://doi.org/10.1038/nri.2016.107

45. Galluzzi, L., Vitale, I., Warren, S., Adjemian, S., Agostinis, P., Martinez, A. B., Chan, T. A., Coukos, G., Demaria, S., Deutsch, E., Draganov, D., Edelson, R. L., Formenti, S. C., Fucikova, J., Gabriele, L., Gaipl, U. S., Gameiro, S. R., Garg, A. D., Golden, E., … Marincola, F. M. (2020). Consensus guidelines for the definition,

detection and interpretation of immunogenic cell death. Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 8(1), e000337. https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000337

46. Gardai, S. J., McPhillips, K. A., Frasch, S. C., Janssen, W. J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J. E., Bratton, D. L., Oldenborg, P.-A., Michalak, M., & Henson, P. M. (2005). Cell-Surface Calreticulin Initiates Clearance of Viable or Apoptotic Cells through trans-Activation of LRP on the Phagocyte. Cell, 123(2), 321–334. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.032

47. Garg, A. D., & Agostinis, P. (2017). Cell death and immunity in cancer: From danger signals to mimicry of pathogen defense responses. Immunological Reviews, 280(1), 126–148. https://doi.org/10.1111/imr.12574

48. Garg, A. D., Dudek, A. M., Ferreira, G. B., Verfaillie, T., Vandenabeele, P., Krysko, D. V., Mathieu, C., & Agostinis, P. (2013). ROS-induced autophagy in cancer cells assists in evasion from determinants of immunogenic cell death. Autophagy, 9(9), 1292–1307. https://doi.org/10.4161/auto.25399

49. Gay, N. J., Symmons, M. F., Gangloff, M., & Bryant, C. E. (2014). Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. Nature Reviews Immunology, 14(8), 546–558. https://doi.org/10.1038/nri3713

50. Ge, Y., Huang, M., & Yao, Y. (2021). The Effect and Regulatory Mechanism of High Mobility Group Box-1 Protein on Immune Cells in Inflammatory Diseases. Cells, 10(5), 1044. https://doi.org/10.3390/cells10051044

51. Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., Perfettini, J.-L., Schlemmer, F., Tasdemir, E., Uhl, M., Génin, P., Civas, A., Ryffel, B., Kanellopoulos, J., Tschopp, J., … Zitvogel, L. (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1β–dependent adaptive immunity against tumors. Nature Medicine,

15(10), 1170–1178. https://doi.org/10.1038/nm.2028

52. Gomes, A. S., Ramos, H., Soares, J., Saraiva, L., & Gomes, C. M. (2021). p53 and cancer: New aspects in molecular biology. Biochemical Pharmacology, 193, 114766. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114766

53. Green, D. R., Ferguson, T., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2009). Immunogenic and tolerogenic cell death. Nature Reviews Immunology, 9(5), 353–363. https://doi.org/10.1038/nri2545

54. Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. Journal of Cheminformatics, 4, 17. https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17

55. Hasbullah, H. H., & Musa, M. (2021). Gene Therapy Targeting p53 and KRAS for Colorectal Cancer Treatment: A Myth or the Way Forward? International Journal of Molecular Sciences, 22(21), 11941. https://doi.org/10.3390/ijms222111941

56. Hassin, O., & Oren, M. (2022). Drugging p53 in cancer: one protein, many targets. Nature Reviews Drug Discovery, 22(2), 127–144. https://doi.org/10.1038/s41573-022-00571-8

57. He, Y., Wang, X., Zhang, J., & Chen, Y. (2017). Restoration of wild-type p53 function in cancer by small-molecule drugs. Pharmacology & Therapeutics, 178, 92–104. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.04.003

58. Hermanowicz, J. M., Szymanowska, A., Sieklucka, B., Czarnomysy, R., Pawlak, K., Bielawska, A., Bielawski, K., Kalafut, J., Przybyszewska, A., Surazynski, A., Rivero-Muller, A., Mojzych, M., & Pawlak, D. (2021). Exploration of novel heterofused 1,2,4-triazine derivative in colorectal cancer. Journal of Enzyme

Inhibition and Medicinal Chemistry, 36(1), 535–548. https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1879803

59. Hernández Borrero, L. J., & El-Deiry, W. S. (2021). Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer, 1876(2), 188556. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188556

60. Hu, Y., Liu, L., Jiang, Q., Fang, W., Chen, Y., Hong, Y., & Zhai, X. (2023). CRISPR/Cas9: a powerful tool in colorectal cancer research. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 42(1). https://doi.org/10.1186/s13046-023-02901-z

61. Ivasechko, I., Lozynskyi, A., Senkiv, J., Roszczenko, P., Kozak, Y., Finiuk, N., Klyuchivska, O., Kashchak, N., Manko, N., Maslyak, Z., Lesyk, D., Karkhut, A., Polovkovych, S., Czarnomysy, R., Szewczyk, O., Kozytskiy, A., Karpenko, O., Khyluk, D., Gzella, A., … Lesyk, R. (2023). Molecular design, synthesis and anticancer activity of new thiopyrano[2,3-d]thiazoles based on 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone). European Journal of Medicinal Chemistry, 252, 115304. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115304

62. Jain, S., Pattnaik, S., Pathak, K., Kumar, S., Pathak, D., Jain, S., & Vaidya, A. (2018). Anticancer Potential of Thiazole Derivatives: A Retrospective Review. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 18(8), 640–655. https://doi.org/10.2174/1389557517666171123211321

63. Joerger, A. C., Bauer, M. R., Wilcken, R., Baud, M. G. J., Harbrecht, H., Exner, T. E., Boeckler, F. M., Spencer, J., & Fersht, A. R. (2015). Exploiting Transient Protein States for the Design of Small-Molecule Stabilizers of Mutant p53. Structure, 23(12), 2246–2255. https://doi.org/10.1016/j.str.2015.10.016

64. Johnson, S. (2001). The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. Trends in Cell Biology, 11(3), 122–129. https://doi.org/10.1016/s0962-8924(01)01926-2

65. Kagawa, Y., Wang, C., Piao, Y., Jin, L., Tanizawa, Y., Cai, Z., & Sunakawa, Y. (2024). Real-World Evidence of FOLFIRI Combined with Anti-Angiogenesis Inhibitors or Anti-EGFR Antibodies for Patients with Early Recurrence Colorectal Cancer After Adjuvant FOLFOX/CAPOX Therapy: A Japanese Claims Database Study. Targeted Oncology, 19(4), 575–585. https://doi.org/10.1007/s11523-024-01063-y

66. Kanani, A., Veen, T., & Søreide, K. (2021). Neoadjuvant immunotherapy in primary and metastatic colorectal cancer. British Journal of Surgery, 108(12), 1417–1425. https://doi.org/10.1093/bjs/znab342

67. Kazama, H., Ricci, J.-E., Herndon, J. M., Hoppe, G., Green, D. R., & Ferguson, T. A. (2008). Induction of Immunological Tolerance by Apoptotic Cells Requires Caspase-Dependent Oxidation of High-Mobility Group Box-1 Protein. Immunity, 29(1), 21–32. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.013

68. Kepp, O., Bezu, L., Yamazaki, T., Di Virgilio, F., Smyth, M. J., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2021). ATP and cancer immunosurveillance. The EMBO Journal, 40(13). https://doi.org/10.15252/embj.2021108130

69. 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

70. Klune, J. R., Dhupar, R., Cardinal, J., Billiar, T. R., & Tsung, A. (2008). HMGB1: Endogenous Danger Signaling. Molecular Medicine, 14(7–8), 476–484. https://doi.org/10.2119/2008-00034.klune

71. 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

72. Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., & Zitvogel, L. (2013). Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. Annual Review of Immunology, 31(1), 51–72. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100008

73. Krombach, J., Hennel, R., Brix, N., Orth, M., Schoetz, U., Ernst, A., Schuster, J., Zuchtriegel, G., Reichel, C. A., Bierschenk, S., Sperandio, M., Vogl, T., Unkel, S., Belka, C., & Lauber, K. (2018). Priming anti-tumor immunity by radiotherapy: Dying tumor cell-derived DAMPs trigger endothelial cell activation and recruitment of myeloid cells. OncoImmunology, 8(1). https://doi.org/10.1080/2162402x.2018.1523097

74. Krysko, D. V., Garg, A. D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Agostinis, P., & Vandenabeele, P. (2012). Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. Nature Reviews Cancer, 12(12), 860–875. https://doi.org/10.1038/nrc3380

75. Legenchuk, O. V., & Nemyrovych, Y. P. (2022). Phagocytic activity of neutrophilic granulocytes of oral fluid in children with acute forms of leukemia. Medical Science of Ukraine (MSU), 18(1), 30–34. https://doi.org/10.32345/2664-4738.1.2022.05

76. Li, L., & Lu, Y.-Q. (2021). The Regulatory Role of High-Mobility Group Protein 1 in Sepsis-Related Immunity. Frontiers in Immunology, 11. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.601815

77. Li, X., Zhang, X., Lin, Y., Xu, X., Li, L., & Yang, J. (2019). Virtual Screening Based on Ensemble Docking Targeting Wild-Type p53 for Anticancer Drug Discovery.

Chemistry & Biodiversity, 16(7). https://doi.org/10.1002/cbdv.201900170

78. Lindemann, A., Patel, A. A., Silver, N. L., Tang, L., Liu, Z., Wang, L., Tanaka, N., Rao, X., Takahashi, H., Maduka, N. K., Zhao, M., Chen, T. C., Liu, W., Gao, M., Wang, J., Frank, S. J., Hittelman, W. N., Mills, G. B., Myers, J. N., & Osman, A. A. (2019). COTI-2, A Novel Thiosemicarbazone Derivative, Exhibits Antitumor Activity in HNSCC through p53-dependent and -independent Mechanisms. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 25(18), 5650–5662. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0096

79. Lingas, E. C. (2023). Early-Onset Colon Cancer: A Narrative Review of Its Pathogenesis, Clinical Presentation, Treatment, and Prognosis. Cureus. https://doi.org/10.7759/cureus.45404

80. Liu, Q., Huang, Y., Luo, D., Zhang, S., Cai, S., Li, Q., Ma, Y., & Li, X. (2019). Evaluating the Guiding Role of Elevated Pretreatment Serum Carcinoembryonic Antigen Levels for Adjuvant Chemotherapy in Stage IIA Colon Cancer: A Large Population-Based and Propensity Score-Matched Study. Frontiers in Oncology, 9. https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00037

81. Liu, Z., Xu, X., Liu, K., Zhang, J., Ding, D., & Fu, R. (2023). Immunogenic Cell Death in Hematological Malignancy Therapy. Advanced Science, 10(13). https://doi.org/10.1002/advs.202207475

82. Ma, Z., Shen, Q., & Zhou, J. (2025). Rezatapopt (PC14586): A First-in-Class Small Molecule p53 Y220C Mutant Protein Stabilizer in Clinical Trials. Journal of Medicinal Chemistry. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c00670

83. Maleki Vareki, S., Salim, K. Y., Danter, W. R., & Koropatnick, J. (2018). Novel anti-cancer drug COTI-2 synergizes with therapeutic agents and does not induce

resistance or exhibit cross-resistance in human cancer cell lines. PLOS ONE, 13(1), e0191766. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191766

84. Martins, I., Wang, Y., Michaud, M., Ma, Y., Sukkurwala, A. Q., Shen, S., Kepp, O., Métivier, D., Galluzzi, L., Perfettini, J.-L., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2013). Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death. Cell Death & Differentiation, 21(1), 79–91. https://doi.org/10.1038/cdd.2013.75

85. Menger, L., Vacchelli, E., Adjemian, S., Martins, I., Ma, Y., Shen, S., Yamazaki, T., Sukkurwala, A. Q., Michaud, M., Mignot, G., Schlemmer, F., Sulpice, E., Locher, C., Gidrol, X., Ghiringhelli, F., Modjtahedi, N., Galluzzi, L., André, F., Zitvogel, L., … Kroemer, G. (2012). Cardiac Glycosides Exert Anticancer Effects by Inducing Immunogenic Cell Death. Science Translational Medicine, 4(143). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003807

86. Menon G, Cagir B. Colon Cancer. [Updated 2025 Feb 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470380/

87. Metwally, N. H., & El-Desoky, E. A. (2023). Novel Thiopyrano[2,3-d]thiazole-pyrazole Hybrids as Potential Nonsulfonamide Human Carbonic Anhydrase IX and XII Inhibitors: Design, Synthesis, and Biochemical Studies. ACS Omega, 8(6), 5571–5592. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c06954

88. Metwally, N. H., Badawy, M. A., & Okpy, D. S. (2022). Synthesis, biological evaluation of novel thiopyrano[2,3-d]thiazoles incorporating arylsulfonate moiety as potential inhibitors of tubulin polymerization, and molecular modeling studies. Journal of Molecular Structure, 1258, 132648. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132648

89. Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L. I., & Opas, M. (2009). Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic

reticulum. Biochemical Journal, 417(3), 651–666. https://doi.org/10.1042/bj20081847

90. Morton, D., Seymour, M., Magill, L., Handley, K., Glasbey, J., Glimelius, B., Palmer, A., Seligmann, J., Laurberg, S., Murakami, K., West, N., Quirke, P., & Gray, R. (2023). Preoperative Chemotherapy for Operable Colon Cancer: Mature Results of an International Randomized Controlled Trial. Journal of Clinical Oncology, 41(8), 1541–1552. https://doi.org/10.1200/jco.22.00046

91. Müller, S., Ronfani, L., & Bianchi, M. E. (2004). Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. Journal of Internal Medicine, 255(3), 332–343. https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2003.01296.x

92. Nayagom, B., Amara, I., Habiballah, M., Amrouche, F., Beaune, P., & de Waziers, I. (2019). Immunogenic cell death in a combined synergic gene- and immune-therapy against cancer. OncoImmunology, 8(12), e1667743. https://doi.org/10.1080/2162402x.2019.1667743

93. Núñez, J. G., Pinheiro, J. S., Padilha, G. L., Garcia, H. O., Porta, V., Apel, M. A., & Bruno, A. N. (2020). Antineoplastic potential and chemical evaluation of essential oils from leaves and flowers of Tagetes ostenii Hicken. Anais Da Academia Brasileira de Ciências, 92(suppl 2). https://doi.org/10.1590/0001-3765202020191143

94. O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., & Hutchison, G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. Journal of Cheminformatics, 3(1). https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33

95. Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G. M., Apetoh, L., Perfettini, J.-L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., Métivier, D., Larochette, N., van Endert, P., Ciccosanti, F., Piacentini, M., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2006).

Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. Nature Medicine, 13(1), 54–61. https://doi.org/10.1038/nm1523

96. Ohta, A., & Sitkovsky, M. (2001). Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. Nature, 414(6866), 916–920. https://doi.org/10.1038/414916a

97. Panaretakis, T., Kepp, O., Brockmeier, U., Tesniere, A., Bjorklund, A.-C., Chapman, D. C., Durchschlag, M., Joza, N., Pierron, G., van Endert, P., Yuan, J., Zitvogel, L., Madeo, F., Williams, D. B., & Kroemer, G. (2009). Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. The EMBO Journal, 28(5), 578–590. https://doi.org/10.1038/emboj.2009.1

98. Pandya, U. M., Egbuta, C., Abdullah Norman, T. M., Chiang, C.-Y. (Edward), Wiersma, V. R., Panchal, R. G., Bremer, E., Eggleton, P., & Gold, L. I. (2019). The Biophysical Interaction of the Danger-Associated Molecular Pattern (DAMP) Calreticulin with the Pattern-Associated Molecular Pattern (PAMP) Lipopolysaccharide. International Journal of Molecular Sciences, 20(2), 408. https://doi.org/10.3390/ijms20020408

99. Parrinello, M., & Rahman, A. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. Journal of Applied Physics, 52(12), 7182–7190. https://doi.org/10.1063/1.328693

100. Petrou, A., Fesatidou, M., & Geronikaki, A. (2021). Thiazole Ring – A Biologically Active Scaffold. Molecules, 26(11), 3166. https://doi.org/10.3390/molecules26113166

101. Phatak, P., Huang, X., & Ahmad, N. (2021). p53 as a therapeutic target in cancer: Progress and challenges. Molecular Cancer Therapeutics, 20(3), 379–391. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-0624

102. Pósa, V., Stefanelli, A., Nunes, J. H. B., Hager, S., Mathuber, M., May, N. V., Berger, W., Keppler, B. K., Kowol, C. R., Enyedy, É. A., & Heffeter, P. (2022). Thiosemicarbazone Derivatives Developed to Overcome COTI-2 Resistance. Cancers, 14(18), 4455. https://doi.org/10.3390/cancers14184455

103. Pucci, B., Kasten, M., & Giordano, A. (2000). Cell Cycle and Apoptosis. Neoplasia, 2(4), 291–299. https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900101

104. Radomska, D., Czarnomysy, R., Szymanowska, A., Radomski, D., Domínguez-Álvarez, E., Bielawska, A., & Bielawski, K. (2022). Novel Selenoesters as a Potential Tool in Triple-Negative Breast Cancer Treatment. Cancers, 14(17), 4304. https://doi.org/10.3390/cancers14174304

105. Ramos, P., Carvalho, M. R., Chen, W., Yan, L.-P., Zhang, C.-H., He, Y., Reis, R. L., & Oliveira, J. M. (2023). Microphysiological systems to study colorectal cancer: state-of-the-art. Biofabrication, 15(3), 032001. https://doi.org/10.1088/1758-5090/acc279

106. Rangel, L. P., Ferretti, G. D. S., Costa, C. L., Andrade, S. M. M. V., Carvalho, R. S., Costa, D. C. F., & Silva, J. L. (2019). p53 reactivation with induction of massive apoptosis-1 (PRIMA-1) inhibits amyloid aggregation of mutant p53 in cancer cells. The Journal of biological chemistry, 294(10), 3670–3682. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004671

107. Righetti, S. C., Della Torre, G., Pilotti, S., et al. (1996). A comparative study of p53 mutations and protein overexpression in ovarian carcinomas: Correlation with chemotherapy response. Cancer Research, 56(3), 689–693.

108. Rodriguez-Ruiz, M. E., Vitale, I., Harrington, K. J., Melero, I., & Galluzzi, L. (2019). Immunological impact of cell death signaling driven by radiation on the tumor microenvironment. Nature Immunology, 21(2), 120–134. https://doi.org/10.1038/s41590-019-0561-4

109. Sabry, M. A., Ghaly, M. A., Maarouf, A. R., & El-Subbagh, H. I. (2022). New thiazole-based derivatives as EGFR/HER2 and DHFR inhibitors: Synthesis, molecular modeling simulations and anticancer activity. European Journal of Medicinal Chemistry, 241, 114661. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114661

110. Saenz, R., Futalan, D., Leutenez, L., Eekhout, F., Fecteau, J. F., Sundelius, S., Sundqvist, S., Larsson, M., Hayashi, T., Minev, B., Carson, D., Esener, S., Messmer, B., & Messmer, D. (2014). TLR4-dependent activation of dendritic cells by an HMGB1-derived peptide adjuvant. Journal of Translational Medicine, 12(1). https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-211

111. Salim, K. Y., Maleki Vareki, S., Danter, W. R., San-Marina, S., & Koropatnick, J. (2016). COTI-2, a novel small molecule that is active against multiple human cancer cell linesin vitroandin vivo. Oncotarget, 7(27), 41363–41379. https://doi.org/10.18632/oncotarget.9133

112. Sanner M. F. (1999). Python: a programming language for software integration and development. Journal of molecular graphics & modelling, 17(1), 57–61.

113. Scaffidi, P., Misteli, T., & Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. Nature, 418(6894), 191–195. https://doi.org/10.1038/nature00858

114. Schcolnik-Cabrera, A., Oldak, B., Juárez, M., Cruz-Rivera, M., Flisser, A., & Mendlovic, F. (2019). Calreticulin in phagocytosis and cancer: opposite roles in immune response outcomes. Apoptosis, 24(3–4), 245–255. https://doi.org/10.1007/s10495-019-01532-0

115. Serrano-del Valle, A., Anel, A., Naval, J., & Marzo, I. (2019). Immunogenic Cell Death and Immunotherapy of Multiple Myeloma. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 7. https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00050

116. Siegel, R. L., Wagle, N. S., Cercek, A., Smith, R. A., & Jemal, A. (2023). Colorectal cancer statistics, 2023. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 73(3), 233–254. https://doi.org/10.3322/caac.21772

117. Sims, G. P., Rowe, D. C., Rietdijk, S. T., Herbst, R., & Coyle, A. J. (2010). HMGB1 and RAGE in Inflammation and Cancer. Annual Review of Immunology, 28(1), 367–388. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132603

118. Stagg, J., Beavis, P. A., Divisekera, U., Liu, M. C. P., Möller, A., Darcy, P. K., & Smyth, M. J. (2012). CD73-Deficient Mice Are Resistant to Carcinogenesis. Cancer Research, 72(9), 2190–2196. https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-12-0420

119. Stoffel, E. M., & Murphy, C. C. (2020). Epidemiology and Mechanisms of the Increasing Incidence of Colon and Rectal Cancers in Young Adults. Gastroenterology, 158(2), 341–353. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.07.055

120. Stoll, G., Iribarren, K., Michels, J., Leary, A., Zitvogel, L., Cremer, I., & Kroemer, G. (2016). Calreticulin expression: Interaction with the immune infiltrate and impact on survival in patients with ovarian and non-small cell lung cancer. OncoImmunology, 5(7), e1177692. https://doi.org/10.1080/2162402x.2016.1177692

121. Suski, J. M., Braun, M., Strmiska, V., & Sicinski, P. (2021). Targeting cell-cycle machinery in cancer. Cancer Cell, 39(6), 759–778. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.03.010

122. Swanson, K. V., Deng, M., & Ting, J. P.-Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. Nature Reviews Immunology, 19(8), 477–489. https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0

123. Synnott, N. C., Bauer, M. R., Madden, S., Murray, A., Klinger, R., O'Donovan, N., O'Connor, D., Gallagher, W. M., Crown, J., Fersht, A. R., & Duffy, M. J. (2018). Mutant p53 as a therapeutic target for the treatment of triple-negative breast cancer: Preclinical investigation with the anti-p53 drug, PK11007. Cancer Letters, 414, 99–106. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.09.053

124. Synnott, N. C., O'Connell, D., Crown, J., & Duffy, M. J. (2019). COTI-2 reactivates mutant p53 and inhibits growth of triple-negative breast cancer cells. Breast Cancer Research and Treatment, 179(1), 47–56. https://doi.org/10.1007/s10549-019-05435-1

125. Szychowski, K. A., Skóra, B., Kryshchyshyn-Dylevych, A., Kaminskyy, D., Tobiasz, J., Lesyk, R. B., & Gmiński, J. (2021). 4-Thiazolidinone-based derivatives do not affect differentiation of mouse embryo fibroblasts (3T3-L1 cell line) into adipocytes. Chemico-Biological Interactions, 345, 109538. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109538

126. Tatsuno, K., Yamazaki, T., Hanlon, D., Han, P., Robinson, E., Sobolev, O., Yurter, A., Rivera-Molina, F., Arshad, N., Edelson, R. L., & Galluzzi, L. (2019). Extracorporeal photochemotherapy induces bona fide immunogenic cell death. Cell Death & Disease, 10(8). https://doi.org/10.1038/s41419-019-1819-3

127. Tofthagen, C. (2010). Surviving Chemotherapy for Colon Cancer and Living with the Consequences. Journal of Palliative Medicine, 13(11), 1389–1391. https://doi.org/10.1089/jpm.2010.0124

128. Trott, O., & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. Journal of Computational Chemistry, 31(2), 455–461. https://doi.org/10.1002/jcc.21334

129. Truxova, I., Kasikova, L., Salek, C., Hensler, M., Lysak, D., Holicek, P., Bilkova, P., Holubova, M., Chen, X., Mikyskova, R., Reinis, M., Kovar, M., Tomalova, B., Kline, J. P., Galluzzi, L., Spisek, R., & Fucikova, J. (2019). Calreticulin exposure on malignant blasts correlates with improved natural killer cell-mediated cytotoxicity in acute myeloid leukemia patients. Haematologica, 105(7), 1868–1878. https://doi.org/10.3324/haematol.2019.223933

130. Van Cutsem, E., Lang, I., Folprecht, G., Nowacki, M., Barone, C., Shchepotin, I., Maurel, J., Cunningham, D., Celik, I., & Kohne, C. (2010). Cetuximab plus FOLFIRI: Final data from the CRYSTAL study on the association of KRAS and BRAF biomarker status with treatment outcome. Journal of Clinical Oncology, 28(15_suppl), 3570–3570. https://doi.org/10.1200/jco.2010.28.15_suppl.3570

131. Varley, J. M., McGown, G., Thorncroft, M., James, L. A., Margison, G. P., Forster, G., Evans, D. G., Harris, M., Kelsey, A. M., & Birch, J. M. (1999). Are there low-penetrance TP53 Alleles? evidence from childhood adrenocortical tumors. American journal of human genetics, 65(4), 995–1006. https://doi.org/10.1086/302575

132. Venereau, E., Casalgrandi, M., Schiraldi, M., Antoine, D. J., Cattaneo, A., De Marchis, F., Liu, J., Antonelli, A., Preti, A., Raeli, L., Shams, S. S., Yang, H., Varani, L., Andersson, U., Tracey, K. J., Bachi, A., Uguccioni, M., & Bianchi, M. E. (2012). Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. Journal of Experimental Medicine, 209(9), 1519–1528. https://doi.org/10.1084/jem.20120189

133. Venereau, E., Ceriotti, C., & Bianchi, M. E. (2015). DAMPs from Cell Death to New Life. Frontiers in Immunology, 6. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00422

134. Veremieva, M. V., Malysheva, T. A., Zozulya, Y. P., Rozumenko, V. D., Sidorik, L. L., Kavsan, V. M., Negrutskii, B. S., & El'skaya, A. V. (2010). Multisubunit

complex eEF1H in human glial tumors: from mRNA to protein. Biopolymers and Cell, 26(4), 317–321. https://doi.org/10.7124/bc.000166

135. Vigneron, C., Mirouse, A., Merdji, H., Rousseau, C., Cousin, C., Alby-Laurent, F., Mira, J.-P., Chiche, J.-D., Llitjos, J.-F., & Pène, F. (2019). Sepsis inhibits tumor growth in mice with cancer through Toll-like receptor 4-associated enhanced Natural Killer cell activity. OncoImmunology, 8(11), e1641391. https://doi.org/10.1080/2162402x.2019.1641391

136. Wassman, C. D., Baronio, R., Demir, Ö., Wallentine, B. D., Chen, C. K., Hall, L. V., Salehi, F., Lin, D. W., Chung, B. P., Hatfield, G. W., & Lathrop, R. H. (2013). Computational identification of a transiently open L1/S3 pocket for reactivation of mutant p53. Nature Communications, 4, 1407. https://doi.org/10.1038/ncomms2361

137. Wattel, E., Preudhomme, C., Hecquet, B., et al. (1994). p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. Blood, 84(9), 3148–3157. https://doi.org/10.1182/blood.V84.9.3148.bloodjournal8493148

138. Wilke, H., Glynne-Jones, R., Thaler, J., Adenis, A., Preusser, P., Aguilar, E. A., Aapro, M. S., Esser, R., Loos, A. H., & Siena, S. (2008). Cetuximab Plus Irinotecan in Heavily Pretreated Metastatic Colorectal Cancer Progressing on Irinotecan: MABEL Study. Journal of Clinical Oncology, 26(33), 5335–5343. https://doi.org/10.1200/jco.2008.16.3758

139. Yang, H., Wang, H., Chavan, S. S., & Andersson, U. (2015). High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1): The Prototypical Endogenous Danger Molecule. Molecular Medicine, 21(S1), S6–S12. https://doi.org/10.2119/molmed.2015.00087

140. Yu, X., Blanden, A., Tsang, A. T., Zaman, S., Liu, Y., Gilleran, J., Bencivenga, A. F., Kimball, S. D., Loh, S. N., & Carpizo, D. R. (2017). Thiosemicarbazones

Functioning as Zinc Metallochaperones to Reactivate Mutant p53. Molecular Pharmacology, 91(6), 567–575. https://doi.org/10.1124/mol.116.107409

141. Zdrazil, B., Felix, E., Hunter, F., Manners, E. J., Blackshaw, J., Corbett, S., de Veij, M., Ioannidis, H., Lopez, D. M., Mosquera, J. F., Magarinos, M. P., Bosc, N., Arcila, R., Kizilören, T., Gaulton, A., Bento, A. P., Adasme, M. F., Monecke, P., Landrum, G. A., & Leach, A. R. (2023). The ChEMBL Database in 2023: a drug discovery platform spanning multiple bioactivity data types and time periods. Nucleic Acids Research, 52(D1), D1180–D1192. https://doi.org/10.1093/nar/gkad1004

142. Zhang, L., Qiao, L., Zhang, M., Xue, Y., Zhang, X., & Gao, X. (2022). Comparison of prognosis among patients with colorectal cancer liver metastases treated by surgical resection, radiofrequency ablation and HIFU: A protocol for network meta-analysis. Medicine, 101(33), e27915. https://doi.org/10.1097/md.0000000000027915

143. Zhang, W., Liu, Y., Jang, H., & Nussinov, R. (2024). CDK2 and CDK4: Cell Cycle Functions Evolve Distinct, Catalysis-Competent Conformations, Offering Drug Targets. JACS Au, 4(5), 1911–1927. https://doi.org/10.1021/jacsau.4c00138

144. Zhong, L., Li, Y., Xiong, L., Wang, W., Wu, M., Yuan, T., Yang, W., Tian, C., Miao, Z., Wang, T., & Yang, S. (2021). Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. Signal Transduction and Targeted Therapy, 6(1). https://doi.org/10.1038/s41392-021-00572-w

145. Zhou, J., Wang, G., Chen, Y., Wang, H., Hua, Y., & Cai, Z. (2019). Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 23(8), 4854–4865. https://doi.org/10.1111/jcmm.14356

146. Zhu, X., Messer, J. S., Wang, Y., Lin, F., Cham, C. M., Chang, J., Billiar, T. R., Lotze, M. T., Boone, D. L., & Chang, E. B. (2015). Cytosolic HMGB1 controls the

cellular autophagy/apoptosis checkpoint during inflammation. Journal of Clinical Investigation, 125(3), 1098–1110. https://doi.org/10.1172/jci76344

147. Zitvogel, L., Kepp, O., Senovilla, L., Menger, L., Chaput, N., & Kroemer, G. (2010). Immunogenic Tumor Cell Death for Optimal Anticancer Therapy: The Calreticulin Exposure Pathway. Clinical Cancer Research, 16(12), 3100–3104. https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-09-2891

148. Zoete, V., Cuendet, M. A., Grosdidier, A., & Michielin, O. (2011). SwissParam: A fast force field generation tool for small organic molecules. Journal of Computational Chemistry, 32(11), 2359–2368. https://doi.org/10.1002/jcc.21816

ДОДАТОК 1. СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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**.
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). The juglone-bearing thiopyrano[2,3-d]thiazoles induced apoptosis in colorectal adenocarcinoma cells. *Cells*, 14(6), 465. https://doi.org/10.3390/cells14060465 **Q1, IF = 5.1.**

ДОДАТОК 2. РЕЗУЛЬТАТИ АНАЛІЗУ *IN SILICO*

Таблиця S1. Результат SwissTargetPrediction для Les-6557. Пояснення методології обчислення значень у колонці «Оцінка імовірності» (Probability) доступне на веб-сайті SwissTargetPrediction (http://www.swisstargetprediction.ch/faq.php)

Скорочена назва білка	**Іденти-фікатор Uniprot**	**Ідентифікатор ChEMBL**	**Клас**	**Оцінка імовірності**
MMP3	P08254	CHEMBL283	Протеази	0,1157366748
MMP8	P22894	CHEMBL4588	Протеази	0,1157366748
BMP1	P13497	CHEMBL3898	Протеази	0,1157366748
IMPDH1	P20839	CHEMBL1822	Оксидоредуктази	0,1157366748
IMPDH2	P12268	CHEMBL2002	Оксидоредуктази	0,1157366748
MAPK8	P45983	CHEMBL2276	Кінази	0,1157366748
MMP13	P45452	CHEMBL280	Протеази	0,1157366748
MMP9	P14780	CHEMBL321	Протеази	0,1157366748
MMP1	P03956	CHEMBL332	Протеази	0,1157366748
HSP90AA1	P07900	CHEMBL3880	Інші цитозольні білки	0,1157366748
MMP2	P08253	CHEMBL333	Протеази	0,1157366748
NR1H4	Q96RI1	CHEMBL2047	Ядерні рецептори	0,1157366748
BACE1	P56817	CHEMBL4822	Протеази	0,1157366748
AURKB	Q96GD4	CHEMBL2185	Кінази	0,1157366748

AURKA	O14965	CHEMBL4722	Кінази	0,1157366748
CDK2	P24941	CHEMBL2094128	Інші цитозольні	0,1157366748
CCNA1	P78396		білки	
CCNA2	P20248			
JAK1	P23458	CHEMBL2835	Кінази	0,1157366748
JAK2	O60674	CHEMBL2971	Кінази	0,1157366748
MKNK2	Q9HBH9	CHEMBL4204	Кінази	0,1157366748
PDE5A	O76074	CHEMBL1827	Фосфодіестерази	0,1157366748
EPHB4	P54760	CHEMBL5147	Кінази	0,1157366748
TNF	P01375	CHEMBL1825	Секретовані білки	0,1157366748
ADAM17	P78536	CHEMBL3706	Протеази	0,1157366748
ADORA1	P30542	CHEMBL226	Рецептори, спряжені з G-білками	0,1157366748
GSK3B	P49841	CHEMBL262	Кінази	0,1157366748
GSK3A	P49840	CHEMBL2850	Кінази	0,1157366748
ALOX5	P09917	CHEMBL215	Оксидоредуктази	0,1157366748
MMP7	P09237	CHEMBL4073	Протеази	0,1157366748
MMP14	P50281	CHEMBL3869	Протеази	0,1157366748
ADAM10	O14672	CHEMBL5028	Протеази	0,1157366748
CDK2	P24941	CHEMBL301	Кінази	0,1157366748
CDK4	P11802	CHEMBL331	Кінази	0,1157366748
MAPK1	P28482	CHEMBL4040	Кінази	0,1157366748
HDAC6	Q9UBN7	CHEMBL1865	Гістондеацетилази	0,1157366748

HDAC1	Q13547	CHEMBL325	Гістондеацетилази	0,1157366748
HDAC3	O15379	CHEMBL1829	Гістондеацетилази	0,1157366748
HDAC2	Q92769	CHEMBL1937	Гістондеацетилази	0,1157366748
HDAC8	Q9BY41	CHEMBL3192	Гістондеацетилази	0,1157366748
MMP16	P51512	CHEMBL2200	Протеази	0,1157366748
MMP15	P51511	CHEMBL2963	Протеази	0,1157366748
MMP12	P39900	CHEMBL4393	Протеази	0,1157366748
MMP26	Q9NRE1	CHEMBL4707	Протеази	0,1157366748
CDK1	P06493	CHEMBL1907602	Інші цитозольні	0,1157366748
CCNB1	P14635		білки	
CCNE1	P24864	CHEMBL1907605	Кінази	0,1157366748
CDK2	P24941			
ESR1	P03372	CHEMBL206	Ядерні рецептори	0,1157366748
PIM1	P11309	CHEMBL2147	Кінази	0,1157366748
OPRM1	P35372	CHEMBL233	Рецептори, спряжені з G-білками	0,1157366748
OPRD1	P41143	CHEMBL236	Рецептори, спряжені з G-білками	0,1157366748
OPRK1	P41145	CHEMBL237	Рецептори, спряжені з G-білками	0,1157366748
ESR2	Q92731	CHEMBL242	Ядерні рецептори	0,1157366748

NTRK1	P04629	CHEMBL2815	Кінази	0,1157366748
HTR7	P34969	CHEMBL3155	Рецептори, спряжені з G-білками	0,1157366748
PIM2	Q9P1W9	CHEMBL4523	Кінази	0,1157366748
PIM3	Q86V86	CHEMBL5407	Кінази	0,1157366748
PTGS2	P35354	CHEMBL230	Оксидоредуктази	0,1157366748
TRPM8	Q7Z2W7	CHEMBL1075319	Потенціал-залежні іонні канали	0,1157366748
MMP25	Q9NPA2	CHEMBL1795103	Інші ферменти	0,1157366748
CA2	P00918	CHEMBL205	Ліази	0,1157366748
PTGS1	P23219	CHEMBL221	Оксидоредуктази	0,1157366748
HDAC4	P56524	CHEMBL3524	Гістондеацетилази	0,1157366748
CA9	Q16790	CHEMBL3594	Ліази	0,1157366748
MET	P08581	CHEMBL3717	Кінази	0,1157366748
SLC5A2	P31639	CHEMBL3884	Електрохімічні транспортери	0,1157366748
ANPEP	P15144	CHEMBL1907	Протеази	0,1157366748
CYP19A1	P11511	CHEMBL1978	Цитохром P450	0,1157366748
SLC5A1	P13866	CHEMBL4979	Електрохімічні транспортери	0,1157366748
AKR1B1	P15121	CHEMBL1900	Інші ферменти	0,1157366748
SGK1	O00141	CHEMBL2343	Кінази	0,1157366748
PDK1	Q15118	CHEMBL4766	Кінази	0,1157366748

PTPN1	P18031	CHEMBL335	Фосфатази	0,1157366748
PLA2G2A	P14555	CHEMBL3474	Інші ферменти	0,1157366748
IGF1R	P08069	CHEMBL1957	Кінази	0,1157366748
KDR	P35968	CHEMBL279	Кінази	0,1157366748
EGFR	P00533	CHEMBL203	Кінази	0,1157366748
CHRNA7	P36544	CHEMBL2492	Ліганд-залежні іонні канали	0,1157366748
SPHK2	Q9NRA0	CHEMBL3023	Інші ферменти	0,1157366748
SPHK1	Q9NYA1	CHEMBL4394	Інші ферменти	0,1157366748
P2RX7	Q99572	CHEMBL4805	Ліганд-залежні іонні канали	0,1157366748
BRAF	P15056	CHEMBL5145	Кінази	0,1157366748
EHMT2	Q96KQ7	CHEMBL6032	Метилтрансферази	0,1157366748
TAAR1	Q96RJ0	CHEMBL5857	Рецептори, спряжені з G-білками	0,1157366748
ABCG2	Q9UNQ0	CHEMBL5393	Первинноактивні транспортери	0,1157366748
SLC29A1	Q99808	CHEMBL1997	Електрохімічні транспортери	0,1157366748
F2	P00734	CHEMBL204	Протеази	0,1157366748
PLAT	P00750	CHEMBL1873	Протеази	0
MAOA	P21397	CHEMBL1951	Оксидоредуктази	0
MAOB	P27338	CHEMBL2039	Оксидоредуктази	0

F10	P00742	CHEMBL244	Протеази	0
DUSP3	P51452	CHEMBL2635	Фосфатази	0
MCL1	Q07820	CHEMBL4361	Інші цитозольні білки	0
CDC7	O00311	CHEMBL5443	Кінази	0
AKR1B10	O60218	CHEMBL5983	Інші ферменти	0
ADAMTS5	Q9UNA0	CHEMBL2285	Протеази	0
CTSK	P43235	CHEMBL268	Протеази	0
PDE10A	Q9Y233	CHEMBL4409	Фосфодіестерази	0
ADORA2A	P29274	CHEMBL251	Рецептори, спряжені з G-білками	0
FCER2	P06734	CHEMBL2940	Мембранні рецептори	0
CTSL	P07711	CHEMBL3837	Протеази	0
PLG	P00747	CHEMBL1801	Протеази	0
TAS2R31	P59538	CHEMBL2034804	Рецептори, спряжені з G-білками	0

Таблиця S2. Результати докінгу лігандів до CDK2. PDB ID – ідентифікатор PDB структури цільового білка з ко-кристалізованим лігандом (ККЛ). Ідентифікатор ККЛ – комбінація ідентифікатора PDB, назви залишку та номера залишку, яка ідентифікує структуру ККЛ у вихідному файлі PDB. R, S – енантіомери Les-6547 і Les-6557 відповідно. Значення в стовпці «ККЛ» представляють індивідуальні оцінки Vina для різних ККЛ, зв'язаних із відповідною конформацією цільового білка, оцінені AutoDock Vina в режимі оцінювання без проведення докінгу. Інші чотири колонки містять індивідуальні оцінки Vina докінгу енантіомерів Les-6547 і Les-6557, зв'язаних із тими самими конформаціями білка-мішені, які зв'язують ККЛ. Для кожної з n цільових конформацій було обрано найбільш сприятливу оцінку докінгу. Структури ККЛ були видалені з білкових структур в процесі їх підготовки до докінгу.

Цільовий білок	PDB ID	Ідентифікатор ККЛ	Показники Vina, ккал/моль				
			ККЛ	Les-6547		Les-6557	
				R	S	R	S
CDK2	1AQ1	1AQ1-STU-299	-11.92	-9.22	-8.91	-9.98	-9.62
CDK2	1B38	1B38-ATP-381	-7.43	-9.42	-9.05	-9.44	-9.13
CDK2	1B39	1B39-ATP-381	-6.36	-9.81	-8.86	-9.80	-9.07
CDK2	1DI8	1DI8-DTQ-500	-6.07	-8.90	-8.59	-8.92	-9.64
CDK2	1E1V	1E1V-CMG-401	-5.52	-7.32	-3.95	-7.45	-5.72
CDK2	1E1X	1E1X-NW1-401	-4.90	-8.21	-7.53	-8.65	-8.81
CDK2	1E9H	1E9H-INR-1298	-9.90	-8.95	-10.30	-10.54	-10.71
CDK2	1FIN	1FIN-ATP-299	-3.04	-9.64	-9.41	-9.51	-9.62
CDK2	1FQ1	1FQ1-ATP-381	-5.57	-9.19	-9.51	-9.43	-9.58

CDK2	1FVT	1FVT-106-299	-7.38	-8.37	-9.18	-9.85	-10.50
CDK2	1FVV	1FVV-107-501	-8.77	-8.63	-9.10	-9.55	-9.04
CDK2	1G5S	1G5S-I17-400	-9.24	-9.62	-9.40	-10.19	-9.20
CDK2	1GIH	1GIH-1PU-501	-9.95	-7.78	-8.28	-9.01	-9.68
CDK2	1GII	1GII-1PU-501	-8.77	-8.67	-8.99	-9.07	-8.74
CDK2	1GIJ	1GIJ-2PU-501	-9.94	-7.77	-8.53	-8.93	-8.09
CDK2	1GY3	1GY3-ATP-1297	-2.64	-9.48	-9.26	-9.62	-9.40
CDK2	1H08	1H08-BWP-300	-6.49	-8.50	-7.98	-9.28	-8.48
CDK2	1H1P	1H1P-CMG-1298	-6.97	-6.05	-7.71	-7.91	-8.35
CDK2	1H1Q	1H1Q-2A6-1298	-7.50	-9.04	-9.46	-9.51	-9.28
CDK2	1H1R	1H1R-6CP-1298	-7.61	-9.32	-8.10	-8.83	-9.55
CDK2	1H1S	1H1S-4SP-1298	-6.84	-8.32	-8.43	-8.47	-9.83
CDK2	1JST	1JST-ATP-300	-5.92	-10.91	-10.90	-10.97	-10.96
CDK2	1JSV	1JSV-U55-400	-4.15	-8.05	-7.73	-7.98	-8.25
CDK2	1KE5	1KE5-LS1-299	-8.80	-7.83	-7.43	-7.96	-7.85
CDK2	1KE6	1KE6-LS2-299	-8.34	-7.24	-8.34	-9.08	-9.60
CDK2	1KE7	1KE7-LS3-299	-8.08	-7.47	-7.29	-8.24	-10.06
CDK2	1KE8	1KE8-LS4-299	-8.44	-7.87	-7.63	-8.23	-7.70
CDK2	1KE9	1KE9-LS5-299	-7.95	-7.83	-8.40	-8.57	-9.19
CDK2	1OIQ	1OIQ-HDU-1299	-6.17	-8.31	-7.88	-8.36	-8.22
CDK2	1OIR	1OIR-HDY-1298	-7.58	-9.58	-8.63	-10.20	-9.12
CDK2	1OIT	1OIT-HDT-1299	-7.91	-9.35	-9.23	-8.98	-9.32
CDK2	1P2A	1P2A-5BN-301	-8.67	-7.95	-8.39	-9.47	-8.05
CDK2	1P5E	1P5E-TBS-301	-4.58	-8.62	-9.39	-9.74	-9.48

CDK2	1PF8	1PF8-SU9-500	-7.96	-6.25	-4.98	-8.63	-7.14
CDK2	1PKD	1PKD-UCN-410	-11.54	-9.53	-9.94	-9.78	-10.05
CDK2	1PYE	1PYE-PM1-700	-7.53	-9.72	-10.09	-9.33	-10.03
CDK2	1QMZ	1QMZ-ATP-381	-5.86	-10.15	-10.02	-10.10	-9.62
CDK2	1VYW	1VYW-292-2300	-8.03	-10.40	-9.44	-9.39	-9.69
CDK2	1VYZ	1VYZ-N5B-300	-7.18	-8.44	-8.33	-9.60	-7.82
CDK2	1W0X	1W0X-OLO-1299	-6.30	-9.15	-9.31	-8.90	-9.28
CDK2	1Y8Y	1Y8Y-CT7-401	-6.97	-8.33	-9.65	-8.23	-9.32
CDK2	1Y91	1Y91-CT9-401	-8.99	-9.28	-9.09	-10.72	-9.21
CDK2	1YKR	1YKR-628-299	-7.37	-9.60	-9.23	-10.29	-9.92
CDK2	2A0C	2A0C-CK9-500	-6.91	-9.91	-9.05	-10.36	-9.18
CDK2	2A4L	2A4L-RRC-300	-6.95	-9.80	-8.53	-10.18	-8.92
CDK2	2B52	2B52-D42-299	-9.14	-8.91	-9.85	-9.80	-9.46
CDK2	2B53	2B53-D23-299	-7.78	-9.75	-9.96	-10.05	-9.75
CDK2	2B54	2B54-D05-300	-9.14	-7.97	-8.33	-8.03	-8.20
CDK2	2B55	2B55-D31-299	-10.19	-9.39	-10.49	-10.42	-10.65
CDK2	2BHE	2BHE-BRY-1299	-8.45	-7.59	-7.28	-8.88	-7.78
CDK2	2BHH	2BHH-RYU-1299	-9.45	-8.43	-8.53	-9.20	-9.40
CDK2	2BKZ	2BKZ-SBC-1298	-7.88	-9.64	-10.47	-9.99	-9.77
CDK2	2BPM	2BPM-529-1299	-7.62	-9.80	-9.44	-9.28	-9.66
CDK2	2BTR	2BTR-U73-300	-6.28	-9.16	-7.74	-9.89	-8.51
CDK2	2BTS	2BTS-U32-1299	-7.03	-9.82	-9.46	-9.68	-10.03
CDK2	2C4G	2C4G-514-306	-8.03	-9.45	-9.79	-9.68	-9.38
CDK2	2C5N	2C5N-CK8-1297	-5.61	-9.34	-9.16	-9.67	-10.84

CDK2	2C5X	2C5X-MTW-1297	-5.35	-10.50	-10.11	-10.16	-9.74
CDK2	2C68	2C68-CT6-1297	-7.71	-5.27	-4.60	-6.54	-4.38
CDK2	2C69	2C69-CT8-1299	-7.06	-7.59	-5.42	-7.16	-5.78
CDK2	2C6I	2C6I-DT1-1299	-7.96	-8.56	-8.93	-8.97	-8.68
CDK2	2C6K	2C6K-DT2-1299	-7.21	-9.48	-9.06	-8.81	-9.01
CDK2	2C6L	2C6L-DT4-1299	-7.87	-8.84	-9.44	-9.42	-9.29
CDK2	2C6M	2C6M-DT5-1297	-7.80	-8.23	-8.20	-8.24	-8.36
CDK2	2C6O	2C6O-4SP-1297	-7.66	-8.72	-9.28	-8.77	-9.01
CDK2	2C6T	2C6T-DT5-1297	-8.30	-8.44	-9.56	-8.90	-8.60
CDK2	2CCI	2CCI-ATP-1297	-5.96	-9.01	-9.98	-9.34	-10.01
CDK2	2CJM	2CJM-ATP-1294	-5.32	-9.32	-9.74	-9.77	-9.88
CDK2	2DS1	2DS1-1CD-501	-12.86	-9.77	-9.89	-10.18	-10.15
CDK2	2DUV	2DUV-371-501	-8.27	-9.09	-8.98	-9.22	-9.88
CDK2	2EXM	2EXM-ZIP-400	-4.77	-8.72	-8.82	-8.72	-8.54
CDK2	2FVD	2FVD-LIA-299	-8.70	-9.77	-9.20	-9.51	-9.84
CDK2	2G9X	2G9X-NU5-299	-6.31	-7.75	-7.76	-8.35	-7.94
CDK2	2IW6	2IW6-QQ2-1296	-7.97	-9.03	-8.55	-9.09	-8.61
CDK2	2R64	2R64-740-500	-4.95	-10.00	-8.67	-10.03	-8.88
CDK2	2UUE	2UUE-GVC-1433	4.00	-7.26	-7.39	-7.35	-6.91
CDK2	2UZD	2UZD-C85-1297	-6.45	-9.15	-9.01	-9.90	-9.42
CDK2	2UZE	2UZE-C95-1297	-7.92	-8.55	-8.91	-8.85	-10.04
CDK2	2UZL	2UZL-C94-1297	-7.87	-8.07	-8.73	-8.11	-9.77
CDK2	2UZN	2UZN-C96-1299	-6.27	-8.21	-8.66	-9.66	-9.41
CDK2	2UZO	2UZO-C62-1297	-6.73	-8.37	-8.65	-8.52	-8.70

CDK2	2V0D	2V0D-C53-1299	-3.81	-7.74	-6.90	-7.34	-8.40
CDK2	2V22	2V22-C35-1433	-6.01	-7.27	-7.16	-7.10	-7.27
CDK2	2VTH	2VTH-LZ2-1300	-6.30	-8.99	-8.99	-9.74	-8.76
CDK2	2VTI	2VTI-LZ3-1299	-8.15	-9.02	-8.81	-9.45	-9.94
CDK2	2VTJ	2VTJ-LZ4-1300	-5.35	-8.81	-8.30	-9.74	-8.83
CDK2	2VTN	2VTN-LZ7-1299	-5.29	-6.92	-7.99	-8.52	-8.88
CDK2	2VTQ	2VTQ-LZA-1299	-8.50	-9.62	-10.28	-10.23	-10.70
CDK2	2VTS	2VTS-LZC-1299	-7.12	-7.94	-9.01	-8.05	-8.50
CDK2	2VTT	2VTT-LZD-1299	-8.01	-10.09	-9.69	-10.45	-9.99
CDK2	2W05	2W05-FRT-1299	-7.52	-9.62	-9.06	-9.93	-9.19
CDK2	2W06	2W06-FRV-1300	-8.74	-9.70	-8.85	-9.82	-9.25
CDK2	2W1H	2W1H-L0F-1299	-8.29	-7.87	-7.97	-9.27	-8.56
CDK2	2WIH	2WIH-P48-1299	-10.81	-9.46	-9.05	-10.45	-9.91
CDK2	2WIP	2WIP-P49-1297	-9.59	-9.97	-9.06	-9.99	-8.95
CDK2	2WPA	2WPA-889-1301	-8.33	-9.52	-10.26	-10.20	-10.01
CDK2	2WXV	2WXV-WXV-1299	-9.52	-9.88	-9.78	-9.77	-9.28
CDK2	3EID	3EID-PO5-299	-8.14	-10.04	-10.04	-9.95	-10.28
CDK2	3EJ1	3EJ1-5BP-299	-6.69	-10.11	-9.92	-9.65	-10.18
CDK2	3EZR	3EZR-EZR-300	-8.81	-9.29	-9.75	-9.72	-9.77
CDK2	3EZV	3EZV-EZV-300	-9.30	-8.23	-9.17	-9.72	-8.76
CDK2	3F5X	3F5X-EZV-300	-10.40	-9.84	-9.89	-9.82	-10.25
CDK2	3FZ1	3FZ1-B98-299	-5.87	-9.55	-9.42	-10.05	-10.14
CDK2	3IG7	3IG7-EFP-999	-5.80	-8.38	-8.06	-7.29	-9.54
CDK2	3IGG	3IGG-EFQ-999	-6.71	-8.56	-9.35	-9.45	-10.54

CDK2	3LE6	3LE6-2BZ-299	-9.50	-9.67	-8.86	-9.66	-9.15
CDK2	3LFN	3LFN-A27-299	-10.17	-7.86	-7.92	-9.97	-8.33
CDK2	3LFQ	3LFQ-A28-299	-8.56	-8.96	-8.91	-10.10	-10.03
CDK2	3LFS	3LFS-A07-299	-8.02	-8.52	-8.90	-8.94	-9.70
CDK2	3NS9	3NS9-NS9-0	-7.76	-9.05	-8.75	-9.39	-8.97
CDK2	3PXF	3PXF-2AN-304	-6.05	-8.29	-8.51	-8.50	-7.29
CDK2	3PXQ	3PXQ-2AN-300	-8.79	-6.11	-5.13	-4.72	-4.47
CDK2	3PXZ	3PXZ-JWS-301	-7.53	-6.16	-4.45	-6.92	-5.44
CDK2	3QHR	3QHR-ADP-297	-7.52	-9.97	-11.94	-10.45	-11.91
CDK2	3QQF	3QQF-X07-543	-6.93	-7.95	-9.11	-8.61	-9.75
CDK2	3QQH	3QQH-X0A-303	-9.44	-5.57	-5.97	-6.33	-5.95
CDK2	3QQJ	3QQJ-X11-300	-7.41	-7.47	-10.98	-7.25	-7.93
CDK2	3QTS	3QTS-X46-299	-6.26	-8.95	-7.76	-8.54	-7.82
CDK2	3QTX	3QTX-X43-299	-6.41	-7.85	-8.14	-8.15	-7.97
CDK2	3QXO	3QXO-X65-668	-7.26	-8.59	-9.34	-9.15	-9.52
CDK2	3QZF	3QZF-X66-299	-8.01	-7.00	-6.02	-6.60	-7.01
CDK2	3QZH	3QZH-X69-839	-6.46	-10.22	-9.46	-9.87	-9.62
CDK2	3R7Y	3R7Y-Z04-484	-7.88	-9.45	-9.68	-9.71	-9.10
CDK2	3R8L	3R8L-Z30-423	-6.39	-8.84	-8.37	-9.90	-8.07
CDK2	3R8Z	3R8Z-Z63-440	-6.05	-7.82	-7.50	-7.44	-7.74
CDK2	3R9O	3R9O-Z71-401	-7.47	-7.35	-11.39	-8.84	-10.08
CDK2	3RAL	3RAL-04Z-499	-8.34	-8.24	-9.76	-8.50	-9.75
CDK2	3RK5	3RK5-07Z-436	-6.70	-7.71	-7.83	-8.64	-9.08
CDK2	3RK7	3RK7-08Z-467	-6.89	-7.54	-8.12	-8.94	-8.78

CDK2	3RMF	3RMF-20Z-496	-10.17	-8.34	-10.81	-8.50	-9.63
CDK2	3RNI	3RNI-21Z-424	-7.69	-9.73	-9.62	-10.53	-9.90
CDK2	3S0O	3S0O-50Z-446	-6.01	-7.34	-8.60	-8.91	-8.79
CDK2	3S1H	3S1H-56Z-479	-8.04	-8.63	-10.48	-8.22	-10.03
CDK2	3S2P	3S2P-PMU-500	-5.45	-8.92	-10.54	-9.92	-10.02
CDK2	3TI1	3TI1-B49-299	-6.90	-7.67	-6.82	-7.38	-7.65
CDK2	3TIZ	3TIZ-3TI-299	-6.58	-6.99	-6.89	-6.65	-6.23
CDK2	3UNJ	3UNJ-0BX-299	-9.04	-6.42	-6.56	-6.72	-5.64
CDK2	3UNK	3UNK-0BY-299	-7.90	-6.72	-6.84	-9.88	-8.41
CDK2	3WBL	3WBL-PDY-302	-7.31	-8.88	-8.75	-8.21	-8.90
CDK2	4BCK	4BCK-T3E-1295	-5.98	-8.97	-9.00	-8.84	-9.36
CDK2	4BCM	4BCM-T7Z-1295	-7.55	-9.48	-9.32	-9.45	-9.11
CDK2	4BGH	4BGH-3I6-1001	-6.89	-7.97	-7.65	-9.17	-7.79
CDK2	4CFM	4CFM-4QE-1297	-7.68	-9.35	-9.44	-9.95	-9.98
CDK2	4D1X	4D1X-ESJ-1299	-6.52	-6.53	-4.98	-7.06	-4.75
CDK2	4D1Z	4D1Z-WG8-1296	-8.63	-7.83	-8.66	-8.46	-7.49
CDK2	4EOI	4EOI-1RO-301	-7.91	-8.89	-8.92	-8.58	-9.34
CDK2	4EOK	4EOK-4SP-301	-8.34	-7.96	-8.20	-9.03	-10.08
CDK2	4EOP	4EOP-1RO-301	-7.99	-6.71	-6.35	-7.37	-7.62
CDK2	4ERW	4ERW-STU-301	-11.45	-9.04	-8.65	-9.45	-9.32
CDK2	4EZ3	4EZ3-0S0-301	-6.20	-8.39	-9.13	-8.16	-9.25
CDK2	4EZ7	4EZ7-2AN-302	-8.98	-8.64	-9.69	-7.60	-9.53
CDK2	4FKS	4FKS-46K-301	-10.67	-8.51	-8.88	-9.79	-8.73
CDK2	4FKT	4FKT-48K-301	-7.88	-8.41	-9.03	-10.64	-8.89

CDK2	4FKU	4FKU-60K-301	-2.83	-6.26	-5.04	-5.54	-4.95
CDK2	4FX3	4FX3-60K-301	-9.55	-8.11	-8.42	-8.63	-9.63
CDK2	4I3Z	4I3Z-ADP-301	-6.52	-9.98	-10.56	-9.89	-10.40
CDK2	4II5	4II5-ADP-301	-6.55	-8.96	-10.51	-9.49	-10.52
CDK2	4KD1	4KD1-1QK-302	-8.26	-6.72	-7.74	-7.04	-6.53
CDK2	4LYN	4LYN-1YG-301	-7.12	-9.45	-8.93	-9.52	-8.72
CDK2	4RJ3	4RJ3-3QS-302	-8.95	-9.87	-10.17	-10.21	-10.11
CDK2	5A14	5A14-LQ5-1297	-11.78	-6.60	-5.63	-6.26	-7.38
CDK2	5ANG	5ANG-WY3-1299	-7.14	-9.55	-9.16	-10.25	-9.12
CDK2	5ANJ	5ANJ-ZXC-1299	-5.16	-8.70	-7.82	-8.81	-7.81
CDK2	5ANK	5ANK-RJI-1299	-7.71	-6.45	-8.18	-7.22	-7.98
CDK2	5CYI	5CYI-55S-301	-3.19	-8.53	-8.82	-8.83	-10.18
CDK2	5D1J	5D1J-56H-4000	-7.47	-9.50	-9.12	-9.14	-9.53
CDK2	5FP6	5FP6-MFZ-1295	-6.98	-6.81	-7.25	-8.95	-8.37
CDK2	5JQ5	5JQ5-I74-302	-8.63	-9.51	-9.49	-9.95	-9.93
CDK2	5JQ8	5JQ8-I73-301	-7.12	-8.65	-7.89	-9.79	-8.10
CDK2	5L2W	5L2W-1QK-900	-8.51	-6.91	-8.70	-7.06	-9.44
CDK2	5NEV	5NEV-72L-301	-8.04	-9.44	-9.47	-9.21	-9.70
CDK2	5OO0	5OO0-9YZ-301	1.84	-6.57	-7.06	-6.35	-6.80
CDK2	5OO1	5OO1-9Z2-301	0.42	-7.88	-8.76	-8.71	-9.58
CDK2	5OO3	5OO3-9ZB-301	-1.72	-6.43	-8.64	-6.91	-8.26
CDK2	6GUB	6GUB-F9Z-301	-9.39	-8.34	-8.60	-9.39	-10.19
CDK2	6GUC	6GUC-SU9-301	-8.35	-7.92	-8.33	-8.58	-9.04
CDK2	6GUE	6GUE-FB8-301	-8.68	-8.94	-9.30	-8.62	-9.18

CDK2	6GUF	6GUF-23D-301	-8.37	-8.92	-9.81	-8.99	-10.33
CDK2	6GUK	6GUK-FC8-301	-8.79	-9.94	-9.31	-9.78	-9.55
CDK2	6GVA	6GVA-FCQ-301	-8.38	-8.96	-8.40	-9.07	-9.55
CDK2	6INL	6INL-AJR-900	-7.29	-8.41	-9.27	-8.61	-9.42
CDK2	6JGM	6JGM-AQG-900	-7.78	-8.31	-9.34	-8.68	-9.42
CDK2	6OQI	6OQI-N14-301	-8.80	-9.29	-8.25	-10.00	-9.19
CDK2	7KJS	7KJS-WG1-301	-10.09	-9.59	-9.05	-9.68	-9.63
CDK2	7MKX	7MKX-ZGY-301	-6.98	-8.20	-9.53	-9.02	-9.25
CDK2	7NVQ	7NVQ-STU-301	-13.63	-9.53	-8.89	-9.86	-9.27
CDK2	7RWE	7RWE-7TH-301	-6.88	-7.55	-7.67	-7.90	-7.46
CDK2	7RWF	7RWF-7TW-302	-10.68	3.37	1.78	-0.23	0.02
CDK2	7S4T	7S4T-88O-302	-10.84	6.84	-3.74	-0.68	3.55
CDK2	7S84	7S84-8IL-301	-11.10	6.31	05.03	1.88	5.16
CDK2	7S85	7S85-8IQ-303	-10.69	-1.97	-1.79	-2.88	-0.08
CDK2	7SA0	7SA0-8KQ-305	-9.59	-8.05	-7.56	-7.65	-7.85
CDK2	7UG1	7UG1-N5R-302	-5.68	-8.02	-8.50	-8.00	-7.61
CDK2	8B54	8B54-P2V-301	-9.10	-9.18	-9.11	-9.12	-9.19
CDK2	8ERD	8ERD-WQ6-301	-10.19	-9.94	-10.22	-9.45	-9.30
CDK2	8ERN	8ERN-WQK-402	-10.61	-9.57	-9.86	-9.42	-9.24
CDK2	8FP0	8FP0-7TW-304	-7.65	10.03	1.76	1.42	6.40
CDK2	8FP5	8FP5-ATP-302	-7.59	-9.11	-8.13	-9.56	-9.17
CDK2	8H6P	8H6P-WZU-301	-11.79	-9.02	-8.63	-9.76	-8.66
CDK2	8H6T	8H6T-WZZ-301	-8.18	-8.79	-9.55	-9.36	-9.91
CDK2	8OY2	8OY2-W5W-301	-8.32	-9.48	-9.77	-9.15	-9.80
CDK2	8UV0	8UV0-XKU-301	-9.31	-7.96	-8.54	-8.99	-8.75

Таблиця S3. Результати докінгу лігандів до CDK4. PDB ID – ідентифікатор PDB структури цільового білка з ко-кристалізованим лігандом (ККЛ). Ідентифікатор ККЛ – комбінація ідентифікатора PDB, назви залишку та номера залишку, яка ідентифікує структуру ККЛ у вихідному файлі PDB. R, S – енантіомери Les-6547 і Les-6557 відповідно. Значення в стовпці «ККЛ» представляють індивідуальні оцінки Vina для різних ККЛ, зв'язаних із відповідною конформацією цільового білка, оцінені AutoDock Vina в режимі оцінювання без проведення докінгу. Інші чотири колонки містять індивідуальні оцінки Vina докінгу енантіомерів Les-6547 і Les-6557, зв'язаних із тими самими конформаціями білка-мішені, які зв'язують ККЛ. Для кожної з n цільових конформацій було обрано найбільш сприятливу оцінку докінгу. Структури ККЛ були видалені з білкових структур в процесі їх підготовки до докінгу.

Цільовий білок	**PDB ID**	**Ідентифікатор ККЛ**	**Показники Vina, ккал/моль**				
			ККЛ	**Les-6547**		**Les-6557**	
				R	**S**	**R**	**S**
CDK4	5FWK	5FWK-ATP-725	-9.05	-9.28	-10.60	-8.79	-9.97
CDK4	5FWL	5FWL-ATP-1692	-9.04	-8.63	-10.72	-7.63	-9.57
CDK4	5FWM	5FWM-ATP-1691	-10.35	-7.48	-6.95	-7.51	-8.28
CDK4	5FWP	5FWP-ATP-1691	-10.45	-7.01	-6.70	-7.23	-8.09
CDK4	7SJ3	7SJ3-6ZV-401	-9.80	-7.93	-8.88	-9.25	-10.10

Таблиця S4. Результати докінгу лігандів до JAK2. PDB ID – ідентифікатор PDB структури цільового білка з ко-кристалізованим лігандом (ККЛ). Ідентифікатор ККЛ – комбінація ідентифікатора PDB, назви залишку та номера залишку, яка ідентифікує структуру ККЛ у вихідному файлі PDB. R, S – енантіомери Les-6547 і Les-6557 відповідно. Значення в стовпці «ККЛ» представляють індивідуальні оцінки Vina для різних ККЛ, зв'язаних із відповідною конформацією цільового білка, оцінені AutoDock Vina в режимі оцінювання без проведення докінгу. Інші чотири колонки містять індивідуальні оцінки Vina докінгу енантіомерів Les-6547 і Les-6557, зв'язаних із тими самими конформаціями білка-мішені, які зв'язують ККЛ. Для кожної з n цільових конформацій було обрано найбільш сприятливу оцінку докінгу. Структури ККЛ були видалені з білкових структур в процесі їх підготовки до докінгу.

Цільовий білок	**PDB ID**	**Ідентифікатор ККЛ**	**Показники Vina, ккал/моль**				
			ККЛ	**Les-6547**		**Les-6557**	
				R	**S**	**R**	**S**
JAK2	2B7A	2B7A-IZA-2002	-10.98	-8.51	-9.59	-9.40	-9.69
JAK2	2W1I	2W1I-L0I-2133	-7.05	-8.33	-8.40	-9.08	-8.08
JAK2	2XA4	2XA4-AZ5-2131	-7.73	-8.88	-8.70	-9.09	-8.58
JAK2	3FUP	3FUP-MI1-1	-6.53	-9.46	-8.53	-8.67	-9.27
JAK2	3IO7	3IO7-1P5-1	-7.85	-8.22	-9.19	-8.71	-9.60
JAK2	3JY9	3JY9-JZH-1	-11.16	-8.98	-8.91	-8.97	-8.94
JAK2	3KCK	3KCK-3KC-1	-9.13	-9.21	-9.40	-9.25	-9.58
JAK2	3LPB	3LPB-NVB-1133	-9.33	-10.17	-10.76	-9.77	-10.69
JAK2	3Q32	3Q32-J2I-1	-9.48	-8.84	-10.95	-8.99	-10.14
JAK2	3RVG	3RVG-17P-2000	-7.04	-8.30	-9.08	-9.56	-9.80

JAK2	3TJC	3TJC-0TP-1	-7.00	-9.39	-9.65	-8.92	-9.57
JAK2	3TJD	3TJD-6TP-1	-6.81	-9.63	-9.67	-9.46	-9.62
JAK2	4BBE	4BBE-3O4-2229	-8.98	-9.63	-9.91	-9.65	-9.95
JAK2	4BBF	4BBF-O19-2229	-9.49	-9.09	-8.96	-8.98	-8.76
JAK2	4C61	4C61-LMM-2133	-6.94	-8.91	-9.96	-8.97	-9.87
JAK2	4C62	4C62-XWW-2133	-6.74	-8.92	-9.72	-9.03	-9.40
JAK2	4E4M	4E4M-0NH-1201	-7.95	-7.52	-8.86	-10.56	-8.44
JAK2	4E6Q	4E6Q-0NV-1201	-8.80	-9.18	-11.46	-8.80	-11.17
JAK2	4F08	4F08-1RS-1201	-7.56	-9.02	-9.86	-9.13	-9.75
JAK2	4F09	4F09-JAK-1201	-7.72	-8.84	-9.60	-8.55	-9.35
JAK2	4FVQ	4FVQ-ATP-901	-7.51	-9.13	-10.11	-9.15	-10.52
JAK2	4FVR	4FVR-ATP-901	-7.75	-8.95	-9.94	-9.85	-10.44
JAK2	4GMY	4GMY-0X5-1201	-6.78	-9.61	-9.39	-9.24	-9.52
JAK2	4JI9	4JI9-1M3-1201	-8.68	-10.13	-10.71	-10.17	-10.52
JAK2	4P7E	4P7E-2HB-1201	-8.77	-9.04	-10.40	-9.71	-10.15
JAK2	4YTC	4YTC-4HW-4000	-8.40	-8.50	-8.66	-9.15	-8.71
JAK2	4YTF	4YTF-4HZ-4000	-8.08	-8.82	-10.12	-9.30	-10.15
JAK2	4YTH	4YTH-467-4000	-8.20	-9.22	-9.17	-9.20	-9.47
JAK2	4YTI	4YTI-VJK-4000	-8.16	-10.20	-10.75	-9.73	-10.32
JAK2	5CF4	5CF4-50Y-4000	-6.68	-9.28	-10.57	-9.60	-10.49
JAK2	5CF5	5CF5-50W-4000	-8.89	-9.17	-10.33	-9.24	-10.33
JAK2	5CF6	5CF6-50O-4000	-6.76	-9.59	-10.25	-9.32	-10.56
JAK2	5CF8	5CF8-50V-4000	-8.39	-9.38	-10.24	-9.18	-10.18

JAK2	5HEZ	5HEZ-1M3-1201	-8.41	-10.10	-10.89	-10.18	-10.65
JAK2	5I4N	5I4N-ATP-1000	-8.17	-9.47	-9.48	-9.81	-10.28
JAK2	5L3A	5L3A-6DP-1201	-5.57	-9.13	-10.33	-9.46	-10.22
JAK2	5TQ4	5TQ4-7GY-4000	-6.99	-8.99	-8.90	-8.51	-8.99
JAK2	5TQ5	5TQ5-7GX-4000	-9.99	-8.84	-9.66	-9.31	-9.66
JAK2	5TQ6	5TQ6-7GV-4000	-8.48	-8.88	-9.58	-9.01	-9.23
JAK2	5TQ7	5TQ7-7GT-4000	-8.95	-9.09	-10.18	-8.83	-10.00
JAK2	5TQ8	5TQ8-7GS-4000	-12.42	-9.51	-9.47	-8.94	-9.43
JAK2	5USY	5USY-SKE-1201	-7.59	-8.57	-9.38	-9.86	-9.28
JAK2	5UT0	5UT0-35R-903	-7.26	-8.75	-7.82	-9.36	-8.04
JAK2	5UT1	5UT1-7DZ-905	-6.42	-9.09	-8.23	-9.11	-8.85
JAK2	5UT2	5UT2-3YT-903	-7.75	-9.74	-9.85	-9.76	-9.81
JAK2	5UT3	5UT3-IK1-901	-6.13	-9.92	-8.73	-9.80	-9.82
JAK2	5UT4	5UT4-DQX-901	-9.53	-9.45	-9.71	-10.06	-9.44
JAK2	5WEV	5WEV-9ZS-1201	-8.00	-9.56	-9.62	-9.85	-9.93
JAK2	5WIJ	5WIJ-AQG-901	-5.71	-9.21	-9.07	-8.93	-8.81
JAK2	5WIK	5WIK-584-901	-7.29	-9.18	-9.48	-9.72	-8.10
JAK2	5WIL	5WIL-YDJ-901	-6.87	-8.99	-9.39	-9.45	-10.38
JAK2	5WIM	5WIM-35R-901	-7.22	-8.04	-8.58	-9.57	-8.20
JAK2	5WIN	5WIN-SKE-901	-7.43	-9.32	-8.17	-9.15	-8.57
JAK2	6AAJ	6AAJ-9T6-1201	-8.24	-8.73	-9.30	-9.08	-9.51
JAK2	6BBV	6BBV-D7D-1201	-7.20	-7.35	-8.53	-7.95	-8.54
JAK2	6BRW	6BRW-5BS-901	-6.84	-8.88	-9.10	-8.61	-8.52

JAK2	6BS0	6BS0-E4V-901	-5.54	-8.70	-8.87	-8.15	-9.50
JAK2	6BSS	6BSS-4SP-902	-6.57	-9.44	-9.60	-9.29	-10.08
JAK2	6D2I	6D2I-35R-901	-7.61	-7.90	-8.61	-8.39	-8.63
JAK2	6G3C	6G3C-EKT-901	-9.10	-9.51	-9.43	-9.17	-9.52
JAK2	6M9H	6M9H-J9D-901	-6.16	-8.53	-8.67	-8.15	-9.85
JAK2	6OAV	6OAV-M3A-901	-8.37	-9.01	-9.25	-9.87	-9.99
JAK2	6OBB	6OBB-M3Y-901	-7.90	-9.25	-9.37	-10.16	-10.30
JAK2	6OBF	6OBF-M4G-902	-8.63	-9.26	-9.16	-10.00	-10.37
JAK2	6OBL	6OBL-M4P-901	-8.76	-9.51	-10.66	-9.86	-10.73
JAK2	6OCC	6OCC-M57-1002	-9.74	-8.85	-8.79	-9.62	-9.89
JAK2	6TPD	6TPD-QZ8-1201	-7.65	-8.79	-8.54	-9.17	-9.13
JAK2	6VGL	6VGL-RXT-1201	-8.11	-9.38	-9.77	-8.92	-9.81
JAK2	6VN8	6VN8-3JW-1201	-8.33	-9.46	-9.02	-8.83	-9.58
JAK2	6VNB	6VNB-R6P-1201	-9.85	-8.93	-9.72	-8.92	-9.67
JAK2	6VNC	6VNC-R6V-1201	-10.00	-9.34	-9.89	-9.07	-9.60
JAK2	6VNE	6VNE-2TA-1201	-7.41	-9.67	-10.13	-9.22	-10.13
JAK2	6VNF	6VNF-R6S-1201	-8.45	-9.33	-9.71	-9.14	-9.54
JAK2	6VNG	6VNG-R6M-1201	-7.95	-9.60	-9.87	-8.96	-9.90
JAK2	6VNH	6VNH-XZS-1201	-9.04	-9.40	-9.14	-8.92	-9.15
JAK2	6VNI	6VNI-R61-1201	-8.19	-9.22	-9.88	-8.79	-10.29
JAK2	6VNJ	6VNJ-R5S-1201	-8.71	-9.17	-8.89	-8.86	-9.58
JAK2	6VNK	6VNK-RXT-1201	-8.13	-9.53	-10.26	-9.41	-9.71
JAK2	6VNL	6VNL-5W2-1201	-8.74	-9.46	-9.94	-8.76	-9.82

JAK2	6VNM	6VNM-R5Y-1201	-7.72	-9.22	-9.49	-9.06	-9.29
JAK2	6VS3	6VS3-R6V-1201	-10.25	-9.22	-10.05	-8.86	-10.06
JAK2	6VSN	6VSN-RG4-1201	-7.77	-9.38	-9.62	-8.40	-9.17
JAK2	6WTN	6WTN-RXT-1204	-8.29	-9.59	-9.18	-9.14	-9.91
JAK2	6X8E	6X8E-UWP-4000	-9.11	-8.70	-10.18	-9.44	-9.89
JAK2	6XJK	6XJK-V4D-901	-7.65	-9.37	-9.59	-9.32	-10.33
JAK2	7F7W	7F7W-36H-1000	-7.57	-7.51	-8.83	-7.80	-8.63
JAK2	7JYO	7JYO-VPS-901	-7.15	-9.33	-9.27	-9.09	-9.23
JAK2	7JYQ	7JYQ-VPJ-902	-3.63	-9.38	-9.63	-9.50	-8.93
JAK2	7LL5	7LL5-Y5G-1202	-10.63	-9.35	-9.70	-8.79	-9.75
JAK2	7REE	7REE-4LY-1201	-10.48	-9.29	-9.89	-8.87	-9.57
JAK2	7T0P	7T0P-E3W-901	-9.90	-8.29	-8.79	-9.22	-9.41
JAK2	7TEU	7TEU-I6C-1201	-12.85	-7.39	-8.67	-6.94	-8.82
JAK2	7UYW	7UYW-OV0-1201	-10.02	-8.19	-8.55	-9.28	-9.12
JAK2	8B8N	8B8N-AQG-904	-6.05	-9.31	-9.91	-9.69	-9.46
JAK2	8B8U	8B8U-T7I-902	-9.50	-9.73	-9.39	-9.50	-9.74
JAK2	8B99	8B99-SKE-1003	-8.49	-10.15	-9.75	-10.38	-9.62
JAK2	8B9E	8B9E-Q7F-1003	-7.19	-9.87	-9.76	-9.97	-10.25
JAK2	8B9H	8B9H-Q7F-901	-7.10	-9.44	-8.90	-9.62	-9.66
JAK2	8BA2	8BA2-Q9X-907	-6.88	-9.39	-9.65	-9.50	-10.03
JAK2	8BA3	8BA3-Q8U-901	-12.27	-7.99	-8.20	-8.56	-8.29
JAK2	8BA4	8BA4-Q8U-901	-10.44	-7.81	-8.25	-8.47	-9.77
JAK2	8BAB	8BAB-Q8N-908	-2.37	-9.77	-9.53	-9.79	-9.78

JAK2	8BAK	8BAK-AD5-906	-7.10	-10.22	-10.26	-10.60	-11.30
JAK2	8BM2	8BM2-QQC-1201	-10.02	-8.61	-10.31	-8.62	-10.28
JAK2	8BPV	8BPV-6T3-1201	-10.76	-9.47	-9.01	-10.30	-9.40
JAK2	8BPW	8BPW-2V9-1201	-12.99	-8.81	-10.43	-10.13	-9.72
JAK2	8BX6	8BX6-S5I-1201	-6.61	-8.84	-8.35	-10.37	-8.07
JAK2	8BX9	8BX9-S59-1201	-8.34	-9.87	-10.46	-9.25	-10.50
JAK2	8BXC	8BXC-S4R-1201	-11.32	-9.48	-10.27	-9.54	-9.94
JAK2	8BXH	8BXH-C87-1201	-8.67	-10.19	-11.06	-10.13	-11.43
JAK2	8C08	8C08-ATP-901	-7.04	-9.64	-10.36	-10.13	-10.56
JAK2	8C0A	8C0A-T7I-902	-9.86	-9.52	-8.71	-9.33	-8.70
JAK2	8EX0	8EX0-AQG-901	-6.82	-9.24	-10.19	-9.75	-9.91
JAK2	8EX1	8EX1-AD5-901	-7.30	-9.42	-9.43	-9.09	-9.02
JAK2	8EX2	8EX2-Q2Q-901	-9.52	-9.38	-8.57	-9.10	-8.52
JAK2	8G8O	8G8O-YT0-1201	-7.48	-8.90	-11.15	-9.55	-10.69
JAK2	8G8X	8G8X-YT8-1201	-7.04	-9.49	-10.73	-9.74	-10.50

Таблиця S5. Результати докінгу лігандів до MAPK8. PDB ID – ідентифікатор PDB структури цільового білка з ко-кристалізованим лігандом (ККЛ). Ідентифікатор ККЛ – комбінація ідентифікатора PDB, назви залишку та номера залишку, яка ідентифікує структуру ККЛ у вихідному файлі PDB. R, S – енантіомери Les-6547 і Les-6557 відповідно. Значення в стовпці «ККЛ» представляють індивідуальні оцінки Vina для різних ККЛ, зв'язаних із відповідною конформацією цільового білка, оцінені AutoDock Vina в режимі оцінювання без проведення докінгу. Інші чотири колонки містять індивідуальні оцінки Vina докінгу енантіомерів Les-6547 і Les-6557, зв'язаних із тими самими конформаціями білка-мішені, які зв'язують ККЛ. Для кожної з n цільових конформацій було обрано найбільш сприятливу оцінку докінгу. Структури ККЛ були видалені з білкових структур в процесі їх підготовки до докінгу.

Цільовий білок	PDB ID	Ідентифікатор ККЛ	Показники Vina, ккал/моль				
			ККЛ	Les-6547		Les-6557	
				R	S	R	S
MAPK8	1UKI	1UKI-537-0	-7.30	-9.18	-10.09	-9.45	-9.47
MAPK8	2G01	2G01-73Q-1001	-6.06	-9.40	-9.50	-9.77	-9.64
MAPK8	2GMX	2GMX-877-901	-6.03	-10.18	-9.20	-9.83	-9.77
MAPK8	2H96	2H96-893-901	-6.48	-9.05	-7.58	-9.04	-8.69
MAPK8	2NO3	2NO3-859-901	-5.24	-8.86	-7.53	-9.20	-8.12
MAPK8	2XS0	2XS0-ANP-1367	-7.13	-8.33	-7.46	-8.34	-9.32
MAPK8	3O2M	3O2M-46A-701	-7.35	-10.69	-9.47	-9.98	-9.51
MAPK8	3PZE	3PZE-CFK-1	-7.07	-8.12	-9.13	-9.02	-7.94
MAPK8	3V3V	3V3V-MYU-401	-8.10	-8.66	-7.36	-8.41	-9.09
MAPK8	4E73	4E73-0NR-401	-8.79	-9.09	-8.58	-9.36	-8.62

MAPK8	4G1W	4G1W-G1W-401	-8.02	-9.14	-9.12	-9.06	-8.68
MAPK8	4HYS	4HYS-1BJ-401	-6.35	-8.23	-8.63	-8.31	-8.59
MAPK8	4HYU	4HYU-1BK-401	-7.22	-8.57	-8.69	-8.55	-8.85
MAPK8	4IZY	4IZY-1J2-401	-8.51	-8.54	-8.64	-8.57	-9.02
MAPK8	4UX9	4UX9-ANP-1000	-5.70	-7.91	-7.42	-7.86	-7.25
MAPK8	5LW1	5LW1-ADN-401	-5.33	-9.54	-9.71	-10.12	-9.27
MAPK8	6ZR5	6ZR5-ANP-402	-6.81	-7.77	-9.82	-7.58	-8.44

Таблиця S6. Результати докінгу лігандів до MKNK2. PDB ID – ідентифікатор PDB структури цільового білка з ко-кристалізованим лігандом (ККЛ). Ідентифікатор ККЛ – комбінація ідентифікатора PDB, назви залишку та номера залишку, яка ідентифікує структуру ККЛ у вихідному файлі PDB. R, S – енантіомери Les-6547 і Les-6557 відповідно. Значення в стовпці «ККЛ» представляють індивідуальні оцінки Vina для різних ККЛ, зв'язаних із відповідною конформацією цільового білка, оцінені AutoDock Vina в режимі оцінювання без проведення докінгу. Інші чотири колонки містять індивідуальні оцінки Vina докінгу енантіомерів Les-6547 і Les-6557, зв'язаних із тими самими конформаціями білка-мішені, які зв'язують ККЛ. Для кожної з n цільових конформацій було обрано найбільш сприятливу оцінку докінгу. Структури ККЛ були видалені з білкових структур в процесі їх підготовки до докінгу.

Цільовий білок	**PDB ID**	**Ідентифікатор ККЛ**	**Показники Vina, ккал/моль**				
			ККЛ	**Les-6547**		**Les-6557**	
				R	**S**	**R**	**S**
MKNK2	2HW7	2HW7-STU-31	-11.14	-9.01	-9.77	-8.86	-9.52
MKNK2	6CJ5	6CJ5-F4G-402	-5.44	-9.31	-8.68	-8.91	-9.45
MKNK2	6CJE	6CJE-F4A-402	-5.82	-9.01	-9.45	-9.73	-8.82
MKNK2	6CJH	6CJH-ET8-402	-4.71	-9.11	-8.50	-10.05	-9.85
MKNK2	6CJY	6CJY-F4J-402	-5.61	-9.01	-10.19	-10.34	-10.08
MKNK2	6CK3	6CK3-F67-402	-5.92	-9.12	-8.04	-9.50	-9.10
MKNK2	6CK6	6CK6-N45-402	-7.24	-9.16	-7.61	-9.24	-7.32
MKNK2	6CKI	6CKI-FZJ-402	-7.67	-8.90	-6.98	-8.63	-7.73
MKNK2	6JLR	6JLR-BV9-401	-7.67	-8.86	-9.46	-8.53	-8.68
MKNK2	8P9B	8P9B-X8K-402	-10.69	-9.00	-8.81	-9.49	-8.44

Таблиця S7. Результати докінгу лігандів до MMP9. PDB ID – ідентифікатор PDB структури цільового білка з ко-кристалізованим лігандом (ККЛ). Ідентифікатор ККЛ – комбінація ідентифікатора PDB, назви залишку та номера залишку, яка ідентифікує структуру ККЛ у вихідному файлі PDB. R, S – енантіомери Les-6547 і Les-6557 відповідно. Значення в стовпці «ККЛ» представляють індивідуальні оцінки Vina для різних ККЛ, зв'язаних із відповідною конформацією цільового білка, оцінені AutoDock Vina в режимі оцінювання без проведення докінгу. Інші чотири колонки містять індивідуальні оцінки Vina докінгу енантіомерів Les-6547 і Les-6557, зв'язаних із тими самими конформаціями білка-мішені, які зв'язують ККЛ. Для кожної з n цільових конформацій було обрано найбільш сприятливу оцінку докінгу. Структури ККЛ були видалені з білкових структур в процесі їх підготовки до докінгу.

Цільовий білок	PDB ID	Ідентифікатор ККЛ	Показники Vina, ккал/моль				
			ККЛ	Les-6547		Les-6557	
				R	S	R	S
MMP9	1GKC	1GKC-NFH-1448	-5.13	-8.80	-7.77	-7.67	-7.85
MMP9	2OVX	2OVX-4MR-501	-10.55	-10.44	-9.98	-9.96	-9.99
MMP9	2OVZ	2OVZ-5MR-501	-9.00	-10.09	-8.12	-8.65	-8.62
MMP9	2OW0	2OW0-6MR-501	-8.54	-10.20	-9.20	-9.91	-8.99
MMP9	2OW1	2OW1-7MR-501	-8.55	-9.74	-8.06	-9.18	-7.95
MMP9	2OW2	2OW2-8MR-501	-5.78	-8.97	-9.59	-9.29	-9.51
MMP9	5UE4	5UE4-5XQ-307	-6.67	-8.44	-7.40	-8.09	-7.30
MMP9	8K5V	8K5V-VOC-306	-7.68	-7.70	-8.28	-7.38	-8.18
MMP9	8K5W	8K5W-VOO-306	-7.83	-9.07	-8.09	-8.58	-8.66
MMP9	8K5X	8K5X-VOZ-306	-4.38	-7.98	-6.31	-7.92	-4.63