ВІДГУК

офіційного опонента, члена-кореспондента НАН України,

доктора біологічних наук, професора, головного наукового співробітника

відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

КОЛИБИ ДЕНИСА ВОЛОДИМИРОВИЧА

на дисертаційну роботу

КЛІЩА МИКОЛИ ВАСИЛЬОВИЧА

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

Актуальність роботи

Онкологічні захворювання залишаються глобальною проблемою охорони здоров'я. У 2022 році зареєстровано близько 20 млн нових випадків раку та 9,7 млн смертей. Колоректальний рак посідає третє місце за поширеністю та друге за смертністю. Незважаючи на прогрес у скринінгу та лікуванні, ефективність сучасних терапевтичних підходів, включно з дорогими моноклональними антитілами та інгібіторами протеїнкіназ, залишається обмеженою, а середня тривалість життя пацієнтів збільшується лише на 2–5%. Основними проблемами залишаються селективність і розвиток резистентності. Тому пошук нових стратегій адресного націлювання на пухлиноспецифічні вразливості та комбінованої дії препаратів є надзвичайно актуальним.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана у відділі Регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини НАН України в рамках низки наукових тем, зокрема:

«Роль імуномодуляторної активності у протипухлинній дії традиційних та експериментальних медикаментозних препаратів…» (0122U002240, 2022–2026);

українсько-австрійського проєкту «Подвійна дія на специфічні вразливості злоякісних клітин новими похідними тіосемікарбазону» (0124U003513, 2022–2024);

інших досліджень нових похідних тіазолу і 4-тіазолідинону та тіопірано[2,3-d]тіазолу (2020–2026).

Робота відповідає стратегічним пріоритетам фундаментальної та прикладної онкології в Україні.

Мета і завдання дослідження

Мета роботи: дослідити цитотоксичні властивості нових гетероциклічних сполук *in vitro*, моделювати механізми їх дії *in silico* та оцінити здатність клітинних вакцин на їх основі протидіяти росту пухлин *in vivo*.

Завдання включали:

1. Вивчення цитотоксичності похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу та передбачення механізмів дії *in silico*.
2. Верифікацію механізмів дії за допомогою клоногенного аналізу та проточної цитометрії.
3. Порівняння ефектів COTI-NMe_2 з іншими α-N-гетероциклічними похідними тіосемікарбазону.
4. Молекулярне докінгування і симуляцію молекулярної динаміки для оцінки активації мутантних форм p53.
5. Підтвердження активації p53 методами імунофлюоресцентної мікроскопії та Вестерн-блоту.
6. Оцінку імуногенних наслідків загибелі пухлинних клітин *in vivo*.
7. Дослідження впливу COTI-NMe_2 на фагоцитарну активність макрофагів *in vitro*.

Об'єкт і предмет дослідження

Об'єкт: протипухлинна дія α-N-гетероциклічних похідних тіосемікарбазону та похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу.

Предмет: механізми дії та молекулярні мішені, включно з реактивацією мутантних форм p53 і індукцією імуногенної загибелі клітин.

Методи дослідження

Використано: некротичні тести та МТТ, молекулярний докінг і симуляцію молекулярної динаміки, клоногенний аналіз, проточну цитометрію, імунофлюоресцентну мікроскопію, Вестерн-блот, фагоцитарні тести з макрофагами J774.2, клітинні вакцини на моделях B16F10 та мишей C57BL/6, автоматизований гематологічний аналіз. Статистична обробка – GraphPad Prism 9, Matplotlib 3.10.1 (Python 3.10).

Наукова новизна результатів

1. Вперше запропоновано механізм цитотоксичної дії COTI-NMe_2 через реактивацію мутантних форм p53.
2. Запропоновано механізм дії похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу на клітинний цикл через взаємодію з CDK2.
3. Продемонстровано цитотоксичну дію COTI-NMe_2 на різні лінії карцином, зокрема колоректальної.
4. Показано розвиток імунної резистентності до трансплантованих пухлин та посилення фагоцитозу за умов їх попередньої обробки досліджуваними речовинами.
5. Встановлено здатність низьких доз COTI-NMe_2 індукувати імуногенну загибель пухлинних клітин.

Практичне значення

1. Продемонстровано вищі показники цитотоксичного ефекту (зниження IC_{50}) по відношенню до досліджуваних пухлинних клітин нових вітчизняних препаратів - похідних тіопірано[2,3-d]тіазолу - Les-6547 та Les-6557 в порівнянні з класичним доксорубіцином, що вказує на перспективність цих сполук для таргетної терапії пухлин
2. Результати дисертаційної роботи сприятимуть потенційній розробці нової стратегії комбінованої таргетної терапії, що поєднує активацію мутантних

(неактивних) форм p53 та інгібування CDK2, а також стимуляцію імунною відповіді шляхом індукції імуногенної загибелі клітин.

3. Запропонована стратегія терапії сприятиме мінімізації ризику розвитку резистентності до препаратів і продовженню часу ремісії.
4. Також результати роботи відкривають можливість впровадження нових підходів до лікування пухлин із надекспресією мутантного *TP53* та імунологічною толерантністю.

Оцінка змісту дисертації

Дисертація – 169 сторінок, 23 рисунки, 13 таблиць, 148 джерел літератури. Структура логічна: вступ, огляд літератури, матеріали та методи, результати та обговорення, висновки. Результати чітко ілюстровані, висновки відповідають завданням. 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.

Зауваження та запитання до здобувача

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

1. Які форми загибелі клітин, розглянуті автором у літературному огляді, віднесено до імуногенної загибелі, а які – до неімуногенної, і де проходить межа між ними? Чи належить класичний некроз до імуногенної загибелі клітин, чи ні? Якщо так, то чим можна пояснити, що у якості негативного контролю використовували некротичні пухлинні клітини, що піддавалися повторюваним циклам заморожування- розморожування (від –196 до +20 °С, 3х), і ці клітини вважаються такими, що загинули без індукції ІЗК?
2. Які механізми, на думку автора, пояснюють вищу чутливість пухлинних клітин до COTI-NMe_2 порівняно з нормальними клітинами?
3. Чи можлива участь α-N-гетероциклічних похідних тіосемікарбазону в регуляції системи синтезу інтерферонів через, наприклад, внутрішньоклітинні рецептори у пухлинних клітинах?

4. Яким чином COTI-NMe_2 може впливати на імуногенність загиблих клітин і розвиток стійкості до трансплантованих пухлин? Які показники імунітету у досліджуваних тварин можуть про це свідчити?
5. Чи планується подальше поєднання COTI-NMe_2 з іншими таргетними або хіміотерапевтичними агентами для синергічного ефекту?
6. Чи існують потенційні ризики, що можуть виникати за умов гіперактивації імунної відповіді *in vivo* при застосуванні запропонованих схем активації імуногенної загибелі клітин?

Висновок

Дисертація Кліща М.В. «Механізми протипухлинного впливу нових гетероциклічних сполук: моделювання *in silico*, цитотоксична та імуномодулююча дія *in vitro* та *in vivo*» є завершеною, самостійною науковою роботою з новими експериментально обґрунтованими положеннями, що мають фундаментальне і прикладне значення. Робота відповідає вимогам Наказу МОН України від 12.01.2017 №40 та Постанови КМУ від 12.01.2022 №44 (зі змінами №341 від 21.03.2022, №502 від 19.05.2023 та №507 від 03.05.2024). Автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент

член-кореспондент НАН України, доктор біологічних наук,

головний науковий співробітник відділу молекулярної імунології

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,

професор Денис КОЛИБО

Підпис Денис Колибо
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна
національної академії наук України
"12" 09 2025 р.

Національна академія наук України
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна
Ідентифікаційний код 05417288
м. Київ