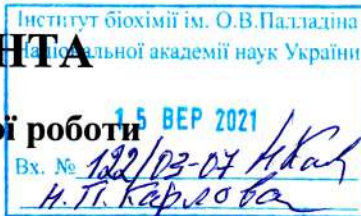


# ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

про науково-практичну цінність дисертаційної роботи

Векліч Тетяни Олександрівни



## **“МЕХАНІЗМИ ДІЇ КАЛІКСАРЕНІВ НА КАТІОН-ТРАНСПОРТУВАЛЬНІ АТР-ГІДРОЛАЗИ ТА КАЛЬЦІЄВИЙ ГОМЕОСТАЗ В МІОМЕТРІЇ”**

на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю

**03.00.04 – біохімія**

### **Актуальність проблематики дисертаційного дослідження**

Гладеньком’язові клітини міометрію забезпечують такі важливі функції як підтримання певного тону та спокою протягом вагітності та сильні повторні скорочення під час пологів. Функція міоцитів значною мірою залежить від їх здатності реагувати на різні регуляторні сигнали (нейронні, гормональні, механічні та інші) шляхом зміни мембранного потенціалу та проникності мембрани для різних іонів, серед яких найбільш важливе значення має проникність для іонів кальцію – ключового регулятора скоротливої активності гладеньких м’язів. Проблема передчасних пологів внаслідок неправильної регуляції або дисфункції клітин міометрію залишається не вирішеною, адже 10% всіх новонароджених залишаються недоношеними. З іншого боку, слабе нерегулярне скорочення міометрію, відоме як гіпоконтракільність матки, є найпоширенішим ускладненням пологів, яке може призвести до дистресу плоду та післяпологової кровотечі. В обох випадках арсенал лікувальних засобів залишається досить обмеженим, і основною причиною є недостатнє розуміння механізмів порушення скоротливої функції міометрію як багатофакторного феномену. Таким чином, дослідження у цьому напрямку є важливим і актуальним напрямком сучасної біомедицинської науки.

Дисертаційна робота Векліч Т.О. присвячена з’ясуванню механізмів дії каліксаренів на активний транспорт кальцію та інших катіонів як через плазматичну мембрану міоцитів, так і через мембрану саркоплазматичного

ретикулуму, а також на неензиматичний гідроліз АТФ. Ці процеси забезпечують кальцієвий гомеостаз клітини, а також регулюють кальцієву динаміку у процесі спряження збудження і скорочення, і отже їх можна вважати центральними для вищезазначених функцій міометрію, а саме забезпечення певного тонусу у стані спокою протягом вагітності та генерації потужних ритмічних скорочень під час пологів.

Іншим не менш актуальним аспектом роботи, якому присвячена значна її частина, є визначення молекулярних мішеней для дії каліксаренів – макроциклічних сполук, які зараз знаходять все більше біомедичних застосувань і не тільки як потенційні лікарські препарати (зокрема ці молекули мають противірусні, антибактеріальні та протипухлинні властивості), але зважаючи на їх унікальні структурні та фізико-хімічні властивості і в якості макромолекулярних наноплатформ для контрольованої, таргетної доставки ліків, зокрема протипухлинних препаратів у формі міцел, гідрогелей, везикул та надмолекулярних наноклапанів на мезопористих наноматеріалах кремнезему. Таким чином, дослідження ефектів калікс[4]аренів на ензиматичну активність  $Mg^{2+}$ , АТФ-залежних кальцієвих pomp плазматичної мембрани і саркоплазматичного ретикулума,  $Na^+/K^+$  насосу,  $Mg^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани і на неензиматичний гідроліз АТФ має також і важливе практичне значення.

### **Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретичне та практичне значення**

В процесі виконання дисертаційного дослідження автор отримала цілий ряд нових даних, або таких, що суттєво доповнюють та розвивають існуючі уявлення щодо біологічних ефектів калікс[4]аренів на іонний (і особливо важливо - кальцієвий) гомеостаз і скоротливу активність міоцитів міометрію.

Зокрема Векліч Т.О. було доведено, що:

- калікс[4]арен С-107 може вбудовуватись в мембрану і проникати через мембрану;



- калікс[4]арен С-90 ефективно ( $IC_{50} \sim 20$  мкМ) блокує  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФазу плазматичної мембрани і не впливає (принаймні у цих концентраціях) на активність  $Na^+, K^+$  насосу,  $Mg^{2+}$ -АТФази і  $Ca^{2+}$  АТФазу плазматичної мембрани;
- калікс[4]арен С-90 діє як повний неконкурентний інгібітор  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани;
- калікс[4]арен С-90 зменшує гідродинамічний діаметр міоцитів міометрію, що свідчить про активацію скорочення міоцитів при його дії. Подальші дослідження довели це положення шляхом прямих реєстрацій змін внутрішньоклітинної концентрації іонів Са з використанням лазерної конфокальної мікроскопії та *in vitro* тензометричних реєстрацій скоротливої активності смужок міометрію;
- калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107 блокують  $Na^+, K^+$ -АТФазу плазматичної мембрани, навіть ефективніше, ніж убаїн – класичний інгібітор цього насосу, та не впливають на активність  $Mg^{2+}$ -АТФази;
- калікс[4]арени С-107, С-91 та С-106 здатні стимулювати неензиматичний гідроліз АТФ, визначені кінетичні та концентраційні залежності цих реакцій.

Слід підкреслити, що значна частина цих положень крім експериментального їх обґрунтування також аналізувалась методами математичного аналізу і молекулярного докінгу. У дисертаційній роботі також наведені дані щодо залежності між структурою і біологічною активністю калікс[4]аренів, що дозволило виявити конкретну роль тих чи інших структурних елементів (SAR аналіз). Такий аналіз широко використовується у фармацевтичній індустрії у процесі розробки лікарських препаратів з метою оптимізації їх ефективності та селективності.

Ці нові наукові положення фундаментального характеру мають також вагоме практичне значення, адже вони визначають можливості фармакологічної корекції скоротливої активності міометрію з використанням калікс[4]аренів – потенційних уретоніків наступного покоління.

## **Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи**

Наукові положення дисертаційної роботи базуються на значній кількості різнопланових експериментальних даних, які були отримані з використанням комплексу сучасних методів, у тому числі біохімічних, біофізичних, фармакологічних, молекулярно-біологічних та фізіологічних, а також молекулярного моделювання і докінгу, математичного та статистичного аналізу. Робота є міждисциплінарною, різні методичні підходи вдало доповнюють один одного, а у своїй сукупності вони відповідають широкому спектру досліджуваних питань. Дані отримані різними методами та їх статистичний аналіз дозволяють зробити висновок щодо високого ступеню обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи.

В цьому контексті також слід відмітити значну кількість проведених експериментів в кожній їх серії та наявність великої кількості ілюстрацій, що дає повне уявлення щодо великого обсягу і високої якості проведених досліджень.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, де виконувалась робота Векліч Т.Щ., є одним із відомих наукових центрів –лідерів у дослідженні даної проблематики. Дане дисертаційне дослідження виконувалось згідно з тематичними планами відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України протягом 2004-2021 рр., зокрема у рамках проектів за фінансової підтримки ДФФД України.

### **Зміст дисертаційної роботи**

У вступній частині дисертаційної роботи Векліч Т.О. обґрунтовані актуальність теми дослідження, чітко сформульовані його мета і чотири основних завдання, зазначені об'єкт і предмет дослідження, наведені методи



дослідження, підкреслена наукова новизна отриманих результатів та їх практичне значення, пояснений зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та особистий внесок автора, наведена інформація щодо публікації та апробації отриманих результатів, структури та об'єму дисертації.

В огляді літератури розглядається широке коло питань, які стосуються мембранних механізмів кальцієвого гомеостазу та динаміки у контексті регуляції спряження збудження і скорочення гладеньком'язових клітин міометрію та ролі катіон-транспортувальних ензимів – АТФ-гідролаз плазматичної мембрани і внутрішньоклітинних Са депо, а також каліксаренам, їх молекулярним мішеням, біологічним та токсичним ефектам. Підкреслюється значення АТФ-гідролаз у патогенезі скоротливої активності гладеньких м'язів та аналізуються ефекти відомих фармакологічних засобів регуляції їх активності. Ця частина роботи добре проілюстрована 13 рисунками.

Основна увага в експериментальній частині роботи (Розділ 3) була приділена дослідженню закономірностей дії калікс[4]аренів на АТФазні системи плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулуму гладеньком'язових клітин міометрію, а також на неензиматичний гідроліз АТФ.

У логічній послідовності представлені дані, які характеризують:

- мембранотропні властивості калікс[4]аренів з використанням везикул плазматичної мембрани міоцитів, а також проникність мембрани клітин для калікс[4]арену С-107;
- вплив калікс[4]арену С-90 на активність  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулуму (концентраційні залежності, кінетика, SAR, математичне і молекулярне моделювання та докінг) та скоротливу активність міометрію;
- дію калікс[4]аренів на активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФази та  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази;

- стимулюючу дію калікс[4]аренів на неензиматичний гідроліз АТФ, у тому числі можливість утворення комплексів між калікс[4]ареном С-107 та молекулами АТФ.

У заключному розділі шляхом критичного аналізу та співставлення отриманих різнопланових результатів, а також літературних даних, підводяться підсумки дисертаційного дослідження, наводяться дві узагальнюючі схеми дії калікс[4]аренів на АТФ-гідролази гладеньком'язових клітин. Ці результати високо ймовірно стосуються і інших типів гладеньких м'язів (кишечник, дихальні шляхи, січковий міхур, судини та ін.), але такі узагальнення очевидно потребують подальшої експериментальної перевірки.

Висновки роботи сформульовані чітко, вони відповідають поставленим завданням і повністю ґрунтуються на отриманих результатах.

Представлені у дисертаційній роботі результати були опубліковані у 36 статтях та 66 тезах конференцій. Результати дисертаційного дослідження були апробовані на багатьох фахових національних та міжнародних форумах, таких як конгреси Українського біохімічного товариства, Українського біофізичного товариства, Українського товариства клітинної біології, Parnas Conference "Molecular Mechanisms of Cellular Signalling", "Supramolecular Systems in Chemistry and Biology", "Muscle Research in Health and Disease", FEBS EMBO та інших.

В авторефераті дисертаційної роботи по кожному розділу викладені, проілюстровані і обговорені основні результати, зроблені висновки, а в анотації роботи стисло викладена її суть.

При ознайомленні з роботою виникли деякі **запитання та зауваження:**

1. Оцінка статистичної достовірності за *t*-критерієм Стьюдента передбачає нормальний розподіл даних, тому виникає питання чи у всіх випадках перевірялась та виконувалась ця умова.
2. На Рис. 3.1 розподіл розміру везикул плазматичної мембрани у присутності С-107 (червона лінія) має два піки. Перший з них для



- везикул меншого розміру очевидно свідчить про агрегацію везикул. Виникає питання, як саме С-107 може спричинити такий ефект?
3. У методах, а також результатах, що наведені на Рис. 13, варто було б деталізувати просторово-часові параметри конфокального х-у сканування ГМК, і також навести калібровки щодо розмірів клітин.
  4. Середні величини тих чи інших ефектів ( $M \pm m$ ) потребують підтвердження їх достовірності шляхом відповідних статистичних тестів, але результати таких тестів (тобто величина  $P$ ) часто не наводяться.
  5. Для більш точної оцінки кількісних параметрів наведених концентраційних залежностей (Рис. 4.14, 4.15А, 4.16А, 4.17, 4.19, 4.20, 4.34, 4.35, 4.36, 5.4, 5.14, 5.16, 5.26, 5.30) варто було скористатись алгоритмами нелінійного фітування методом найменших квадратів з використанням відповідних програм, таких як Matlab або Origin.
  6. Згідно з результатами математичного моделювання калікс[4]арен С-90 (1-25 мкМ) має поступово збільшувати концентрацію  $Ca^{2+}$  в незбуджених міоцитах міометрію (Рис. 4.26), однак на Рис. 4.27 у присутності калікс[4]арену С-90 інтенсивність флуоресценції Fluo-4 після початкового зростання повертається до рівня, що не перевищує базальний рівень. Як можна пояснити таку розбіжність між модельними уявленнями і експериментальними даними?
  7. В авторефераті варто було б дещо деталізувати математичну модель впливу калікс[4]арену С-90 на вміст іонів Са у незбуджених гладенько-м'язових клітинах, принаймні пояснити її принцип і навести основні рівняння.
  8. Одним із застосувань каліксаренів у біомедичній галузі, що зараз широко обговорюється, є таргетна доставка лікарських препаратів. Після ознайомлення з цим дисертаційним дослідженням виникає питання дискусійного характеру – наскільки це перспективно зважаючи на значний спектр біологічних ефектів цих молекул?

Ці питання носять в основному дискусійний характер та не впливають суттєво на загалом високу оцінку даної дисертаційної роботи.

## Висновок

Вважаю, що згідно з пунктами 9, 11, 12, 13 "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24 липня 2013 р. (зі змінами), вважаю, що за своєю актуальністю, науковою новизною, високим методичним рівнем, теоретичною та практичною значністю, об'ємом проведених досліджень, обґрунтованістю та достовірністю зроблених узагальнень і висновків, а також перспективами наукового і практичного застосування дисертаційна робота Векліч Тетяни Олександрівни на тему "Механізми дії каліксаренів на катіон-транспортувальні АТР-гідролази та кальцієвий гомеостаз в міометрії" відповідає всім вимогам до дисертації на здобуття наукового ступеня доктора наук, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія.

Офіційний опонент

завідувач кафедри біофізики та медичної інформатики

ІНЦ "Інститут біології та медицини"

Київського національного університету

імені Тараса Шевченка,

доктор біологічних наук, професор

Жолос О.В.

Підпис Жолоса О.В. засвідчую

Засиришук зуремшара  
підпис/прізвище та ініціали посадової особи, що засвідчує підпис



М.В. Марченко