

15 ВЕР 2021

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу **Т.О. Векліч** 12/1/03-07
Н.П. Карлова
«**Механізми дії калікс[4]аренів на катіон-транспортувальні АТР-гідролази та кальцієвий гомеостаз в міомерії**»,
подану на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04– біохімія.

Актуальність теми.

Незважаючи на досягнення з розробки нових методів та схем лікування захворювань, які є наслідками патології скоротливої функції гладеньких м'язів і пов'язані з порушенням кальцієвого гомеостазу в міоцитах, наприклад, гіпо- та гіпертонус матки, невиношування плоду, гіпо- та гіпертензія, атонія кишкового тракту та інші патології його моторики, астма, пошук більш досконалої та своєчасної діагностики таких станів, розробка й удосконалення первинної і вторинної профілактики та лікування цих хвороб мають велике соціальне та практичне значення.

Протягом останніх років активну увагу дослідників привертають калікс[4]арени – циклічні олігомери фенолу, які володіють широким спектром біологічної активності та мають низьку токсичність. Важливо, що деякі калікс[4]арени виступають ефективними модуляторами субклітинних катіон-транспортувальних протеїнів міоцитів матки. Ці речовини є перспективними щодо подальшого дослідження їхнього впливу на Ca^{2+} -транспортувальні системи клітин гладеньких м'язів.

Опонована робота присвячена вивченню біохімічних властивостей та фізико-хімічних закономірностей функціонування АТРазних систем в гладеньких м'язах матки та особливостей модуляції їхньої активності К[4]А. Значення цієї роботи полягає у тому, що в ній наведені докази доцільності використання каліксаренових платформ для спрямованої модуляції активності катіон-транспортувальних Mg^{2+} -АТР-залежних електроензимів.

Створення нових вискоєфективних малотоксичних селективних інгібіторів та активаторів ензимів є вкрай необхідним, зокрема, для подальшого дослідження іонних, молекулярних і мембранних механізмів внутрішньоклітинної сигналізації. У галузі біохімії та біофізики м'язів це істотно для з'ясування закономірностей та механізмів такого унікального біологічного феномену, як електро- та фармакомеханічне спряження, вивчення ролі Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , а також протонів H^+ у його забезпеченні. В практичному ж аспекті такі розробки є основою для пошуку нових фармакологічних засобів, здатних ефективно модифікувати функціональну активність конкретних білків у випадку її порушення за патологічних станів.

Є велика кількість даних, які підтверджують можливість створення на основі каліксаренів рецепторів, іонних каналів, ДНК-чипів, штучних ензимів тощо. Щодо блокуючої дії каліксаренів, в науковій літературі є приклади, які доводять ефективність інгібування каліксаренами потенціалозалежних аніонних каналів, або активності лужної фосфатази. Спрямований синтез і вивчення властивостей ефекторів, які здатні проникати через ПМ та оборотно з високою спорідненістю і селективністю змінювати ензиматичну чи транспортну активність окремих внутрішньоклітинних мембранозв'язаних і цитоплазматичних білків – одне з найважливіших завдань сучасної біологічної, біофізичної та біоорганічної хімії.

Виходячи із вищесказаного, вважаю, що тема дисертації Т.О. Векліч «Механізми дії калікс[4]аренів на катіон-транспортувальні АТР-гідролази та кальцієвий гомеостаз в міометрії», є актуальною і має не лише значний теоретичний інтерес, але й практичну цінність.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими програмами.

Експериментальна частина роботи виконувалась у 2004-2021 рр.

Дисертація відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (зав. – академік НАН України, професор Костерін С.О.), проблема “Біохімія тварин та людини”: тема № 5, № держреєстрації 0104U003281, “Вивчення властивостей та регуляції АТР-залежних кальцієвих pomp мембранних структур ГМ” (2004-2008 рр.); тема № 5, № держреєстрації 0109U001589, “Вивчення біохімічних механізмів регуляції концентрації іонів Са в ГМК” (2009-2013 рр.); тема № 5, № держреєстрації 0114U003213, “Вивчення біохімічних механізмів спряження збудження та скорочення в гладеньком'язових клітинах” (2014-2018 рр.); тема № 5, № держреєстрації 0119U002508, “Вивчення біохімічних механізмів функціонування ГМК як Са²⁺-залежної тензоелектрохімічної рецепторної системи” (2019-2023 рр.).

Фінансова підтримка роботи відбувалась також за рахунок проектів ДФФД України за темами: – тема № 18, № держреєстрації 0104U006073, “Розроблення біохімічних технологій для пошуку, вивчення властивостей та механізму дії нових біологічно-активних речовин – регуляторів скорочення-розслаблення ГМ” (2004-2006 рр.); – тема № 18, № держреєстрації 0107U007194, “Вивчення впливу та механізмів дії каліксаренів на системи іонного транспорту в субклітинних мембранних структурах ГМ” (2007-2009 рр.); – тема № 14, № держреєстрації 0110U000988 “Супрамолекулярні системи в хімії та біології. Каліксарени як модулятори активності ензиматичних та транспортних білків ГМ” (2010-2012 рр.); – тема № 22, №

держреєстрації 0110U005970, “З’ясування закономірностей та біофізикохімічних механізмів дії каліксаренів на функціонування каталітичних і транспортних білків біологічних мембран” (2010-2014 рр.); – тема № 15, № держреєстрації 0112U002624, “Вивчення біохімічних механізмів Ca^{2+} -залежного контролю скоротливої активності ГМК як складної кооперативної тензоелектрохімічної рецепторної системи. Розробка молекулярно-динамічної моделі регуляції концентрації іонізованого Ca в міоцитах” (2012-2016 рр.); – тема № 22, № держреєстрації 0115U003638, “Об’єднаний проект: Фізико-хімічні та біологічні властивості каліксаренів. Розділ 2. Розробка нових нанорозмірних каліксаренових ефекторів АТР-залежних ензиматичних та катіон-транспортуючих систем” (2015-2019 рр.).

Наукова новизна дослідження та одержаних результатів.

Новизна дослідження та одержаних результатів визначається системністю дослідження, що дозволило провести комплексний аналіз змін біохімічних показників. В представленій роботі наведено результати комплексних досліджень закономірностей функціонування АТР-залежних систем в ГМ матки та особливостей модуляції їхньої активності К[4]А. К[4]А С-107 здатний до високоафінної взаємодії з фрагментами ПМ і, формуючи комплекси з мембранними везикулами, сприяє їхній агрегації між собою або з мікрочастинками К[4]А. Встановлено, що К[4]А С-90 може не лише вбудовуватись в мембрану, але й проникати крізь неї.

Вперше встановлено, що калікс[4]арени С-90 та С-107 проявляють мембранотропні ефекти і опосередковано впливають на мембранні ензими. Вперше знайдено низькомолекулярний селективний органічний афінний інгібітор Mg^{2+} -АТР-залежної Ca^{2+} -помпи ПМ - К[4]А С-90. Цей К[4]А селективно інгібує активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у випадку як ПМ міометрію, так і препарата очищеної солюбілізованої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази, коефіцієнти інгібування $I_{0,5}$ складають $20,2 \pm 0,5$ і $34,6 \pm 6,4$ мкМ відповідно. Встановлено, що структурний фрагмент С-150 (суто «калікс[4]аренова чаша») та модельна сполука М-1 (у складі молекули К[4]А С-90 маємо 4 фрагменти М-1) незначно пригнічують $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-залежну активність ПМ. Ефективність інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази К[4]А залежить від кількості та розташування фенілсульфоніламідинних груп на верхньому вінці даних К[4]А. Модифікація нижнього вінця калікс[4]аренової «чаші» двома октанольними залишками (С-956), замість залишків пропанолу (С-90), призводить до незначного збільшення ефективності інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ.

Доведено, що К[4]А С-90 діє як повний неконкурентний інгібітор

Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ, він не впливав на коефіцієнти активації для іонів Ca та Mg, але у всіх випадках зменшував максимальну початкову швидкість V_{\max} реакції гідролізу АТР.

Під дією K[4]A C-90 пригнічується Mg^{2+} , АТР-залежна акумуляція Ca^{2+} у везикулах ПМ міометрію. Результати математичного моделювання передбачили, що K[4]A C-90 має збільшувати концентрацію Ca^{2+} в незбуджених міоцитах. Дані конфокальної мікроскопії підтверджують це припущення: з використанням Ca^{2+} -чутливого флуоресцентного зонда fluo-4 AM вперше показано, що K[4]A C-90 транзійтно підвищує $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у міоцитах матки. K[4]A C-90 зменшує ефективний гідродинамічний діаметр клітин міометрія. Він пригнічує швидкість релаксації м'язевого скорочення. Ця сполука також збільшує нормовану швидкість скорочення міометрію у відповідь на стимуляцію його утеротоніком окситоцином.

Вперше встановлено, що K[4]A C-97, C-99 та C-107 селективно та значно ефективніше, ніж убаїн, пригнічують активність Na^+ , K^+ -АТРази ПМ. Ефективність їхнього інгібування залежить від взаємного розташування амінофосфонових груп та від хімічної модифікації верхнього та нижнього вінців молекули калікс[4]арену. K[4]A C-97 та C-107 не впливають на коефіцієнт активації для іонів Mg, уявну константу Міхаеліса K_m за АТР, але зменшують спорідненість Na^+ , K^+ -АТРази до іонів Na.

Вперше показано, що деякі K[4]A (C-107 та C-106) стимулюють неензиматичний гідроліз АТР. Калікс[4]арен-індукований гідроліз АТР характеризується складною кінетикою та не підпорядковується закономірностям реакцій низьких порядків (нульового, першого).

Практичне значення одержаних результатів.

Одержані результати є перспективними для подальшого з'ясування фізико-хімічних та біологічних властивостей каліксаренів як потенційних молекулярних “наноплатформ” для створення високоефективних ліків нового покоління – селективних модуляторів функціонування АТР-залежних мембранозв'язаних систем катіонного (Ca^{2+} , Na^+) транспорту: це є необхідним для подальшого прогресу у боротьбі з небезпечними патологіями, пов'язаними із порушенням внутрішньоклітинного іонного, перш за все кальцієвого гомеостазу. Зокрема, мова йде про гіпертонічну хворобу, діабет, ішемію/гіпоксію, різні нейропатії, слабкість пологової діяльності, викидні тощо.

Такі властивості K[4]A C-90, як здатність підвищувати $[\text{Ca}^{2+}]_i$, зменшувати швидкість релаксації міометрію, свідчать про те, що ця сполука може бути використана у клінічній практиці у якості препарату для

стимуляції пологової активності та/або для підвищення базального тонусу ГМ матки, зокрема, на етапі виведення посліду після пологів. К[4]А С-90 може бути перспективним фармакологічним препаратом у медичній практиці з огляду на його низьку токсичність.

К[4]А С-97 і С-107 (інгібітори Na^+ , K^+ -АТРази ПМ), а також К[4]А С-90 (інгібітор транспортної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази) можуть бути корисними у біохімічній лабораторній практиці при експериментальному дослідженні функціонування катіон-транспортувальних Mg^{2+} -АТФ-залежних електроензимів та іонного гомеостазу у ГМ.

Одержані в роботі експериментальні докази можливості деяких К[4]А утворювати комплекси з АТФ та гідролізувати цей нуклеозидтрифосфат можуть бути основою для подальших розробок нових аналітичних методів кількісного визначення вмісту АТФ.

За матеріалами експериментальних досліджень дії К[4]А С-956 був отриманий патент на винахід № 24293/ЗА/18 від 10.10.2018 «5,11,17,23-тетра(трифтор)-метил(фенілсульфоніліміно)-метиламіно-25,27-діоктилокси-26,28-дипропоксикалікс[4]арен (К[4]А С-956) як селективний інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ клітин міометрія».

Апробація результатів дисертації.

Результати досліджень, що викладені в дисертації, були представлені та обговорені на таких наукових форумах: ІХ-му Українському біохімічному з'їзді (Харків, Україна, 2006); Львівсько-Люблінській конференції „Сучасні аспекти експериментальної та клінічної біохімії” (Люблін, Польща, 2006, 2008); 6th Parnas Conference “Molecular Mechanisms of Cellular Signalling” (Krakow, Poland, 2007); Vth International symposium “Supramolecular Systems in Chemistry and Biology” (Kyiv, Ukraine, 2009); Научно-практическая конференция “Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения” (Новый Свет, Украина, 2009, 2011, 2013); VII Parnas Conference on biochemistry and molecular biology (Yalta, Ukraine, 2009); международной научно-практической конференции „Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии” (Севастополь, Украина, 2010, 2012), X-му Українському біохімічному з'їзді (Одеса, Україна, 2010); III International Summer School “Supramolecular Systems in Chemistry and Biology” (Lviv, Ukraine, 2010); 8th Parnas Conference (Warsaw, Poland, 2011); IV International Summer School “Supramolecular Systems in Chemistry and Biology” (Regensburg, Germany, 2011, 2012); International Symposium “Biological motility: Fundamental and Applied Science” (Pushchino, Russia, 2012); III International Symposium

“Intracelular Signaling and Bioactive Molecules Design” (Lviv, Ukraine, 2012); Наукова звітна сесія „Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва” (Київ, Україна, 2012); 9th Parnas Conference (Jerusalem, Israel, 2013); Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми біофізики» (Львів, Україна, 2014); 1 st Congress of the Polish Biochemistry, Cell Biology, Biophysics and Bioinformatics (Warsaw, Poland, 2014); з'їзді Українського товариства клітинної біології (Україна, 2014, 2016, 2019); XI-му Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 2014), 10-тій конференції «Bridges in Life Sciences» (Wroclaw, Poland, 2015); VI-му з'їзді Українського біофізичного товариства (Луцьк, Україна, 2015); 44-тій конференції «Muscle Research in Health and Disease» (Warsaw, Poland, 2015); 10th Parnas Conference (Wroclaw, Poland, 2016); VIII-й національний з'їзд фармацевтів України (Харків, Україна, 2016); 7th TriNet Meeting – RECOOP (Budapest, Hungary, 2016); науковій конференції «Нанорозмірні системи: будова, властивості, технології» (Київ, Україна, 2016, 2019); науковій конференції «Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи» (Житомир, Україна, 2017, 2018, 2019, 2020; 2021); 4-ій міжнародній науковій конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології” (Дніпро, Україна, 2017); VII-му з'їзді Українського біофізичного товариства (Київ-Луцьк, Україна, 2018); FEBS3+Meeting-XI Parnas conference on Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine (Київ, Україна, 2018); міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (Львів, Україна, 2018); XXV українській конференції з органічної та біоорганічної хімії (Луцьк, Україна, 2019); XII-му Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, Україна, 2019); International Meeting «Clusters and nanostructured materials” (Ужгород, Україна, 2020).

Результати експериментів систематично доповідались та обговорювались на наукових семінарах відділу біохімії м'язів, наукових семінарах та засіданнях Вченої Ради Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (2004-2021 рр.).

Повнота викладу результатів у наукових публікаціях.

За результатами дисертації опубліковано **102** наукові праці, у тому числі 2 монографії, 2 статті у колективній монографії, 6 статей у міжнародних наукових журналах, 24 статті у фахових наукових журналах, які включені до міжнародних наукометричних баз, та **66** тез доповідей у матеріалах міжнародних та всеукраїнських наукових конференцій та з'їздів.

Монографію «Калікс[4]арени як модулятори АТР-гідролазних систем гладеньком'язових клітин» було визнано кращою за результатами конкурсу на краще книжкове видання НАН України у 2020 р. за хіміко-біологічним напрямом.

Структура дисертації.

Дисертація складається зі Вступу, Огляду літератури, Розділів, в яких описані основні методи досліджень, експериментальні результати та їхнє обговорення, Заключного розділу, Висновків та Списку використаних джерел (537 найменувань). Роботу викладено на 403 сторінках (основна частина на 314 сторінках), ілюстрована 114 рисунками та 9 таблицями.

У «**Вступі**» автор обґрунтовує актуальність власного дослідження. Сформульовані завдання повністю відповідають поставленій меті і розкривають її. Перелік положень, які мають наукову новизну та практичне значення, відповідає суті виконаної роботи.

Розділ 1 «Огляд літератури» складається з 4 підрозділів, які містять фундаментальні відомості про предмет дослідження і необхідні для подальшого кваліфікованого обговорення результатів. Подано аналіз мембранних механізмів регуляції концентрації Ca^{2+} в гладеньком'язових клітинах. Описано структурну організацію, властивості та регуляцію Mg^{2+} , АТР-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин та інші Mg^{2+} -залежні АТР-гідролазні системи плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулуму гладеньком'язових клітин. Значну увагу приділено каліксаренам та їхній біологічній активності. Охарактеризовані їхні основні функції, фізико-хімічні властивості, токсичність та імуногенність, а також перспективи використання каліксаренів у фізико-хімічній біології, біотехнології та фармакології. Зроблено узагальнення до кожного підрозділу і до Огляду літератури в цілому.

Розділ 2 «Матеріали та методи досліджень» свідчить про те, що використано коректні умови постановки експерименту, які дозволяють реалізувати поставлені завдання.

Розділ «Результати та їх обговорення», містить чомусь самостійні розділи 3, 4, 5 і 6, які описують результати роботи і мали б бути підрозділами в об'єднаному розділі.

Інтерпретація та узагальнення фактів, отриманих дослідником, є чи не найважливішим елементом експериментальної роботи. У даній дисертації їй присвячено «**Заключний розділ**».

За результатами дисертаційної роботи зроблено 11 **висновків**. Далі йде **Перелік цитованої літератури**.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій.

Сформульовані положення, висновки та рекомендації ґрунтуються на експериментальних даних, одержаних з дотриманням стандартних вимог до утримування тварин, на великій кількості повторностей в експерименті. Одержані результати піддавали статистичному аналізу. Отже ступінь обґрунтування та достовірності у більшості експериментів не викликають застереження.

Достовірність одержаних результатів підтверджується несуперечністю застосованих експериментальних методик, відтворюваністю одержаних даних, а також їхньою узгодженістю з існуючими експериментальними результатами інших авторів.

Окремі дискусійні питання і зауваження до дисертації.

Оцінюючи, в загальному, позитивно рецензовану роботу, у мене до неї є деякі зауваження. Крім того, при читанні роботи виникають питання дискусійного характеру, на які хотілось би почути відповідь автора. Так:

1. Чи можна розповсюдити одержані результати щодо дії калікс[4]аренів на Ca^{2+} -транспортувальні системи не лише на міометрій, а й на інші гладенькі м'язи?
2. Серед калікс[4]аренів - інгібіторів Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани, який є найбільш афінним до своєї мішені?
3. Бажано було б скоротити об'єм дисертації за рахунок зменшення об'єму літературного огляду.
4. Підпис до рисунку має починатися на тій же сторінці, що й рисунок (наприклад: рис 4.13, 4.23, 4.37, 5.23, 5.30).
5. Хочу звернути увагу автора на прецизійність наведення статистичної обробки даних. Так як для оцінки вірогідності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стюдента, то слід оперувати наступними величинами: наприклад, достовірною вважається різниця при показах вірогідності $p \geq 0,95$, а рівень значимості при цьому $P < 0,05$, які знаходяться після обчислення t за таблицею t -розподілу Стюдента. У авторефераті і дисертації не наведено жодного з цих показників.

6. У роботі зустрічаються граматичні і стилістичні помилки, а також невдалі вирази. Наприклад: українською мовою правильно писати “флЮоресцентні методи”, а не “флУоресцентні методи” і т.ін.

Однак, всі зазначені зауваження не зменшують цінності роботи і не впливають на загальну позитивну оцінку. Проблема, яку досліджує автор дисертації, надзвичайно важлива, а одержані нею дані вносять вагомий вклад у з'ясування ролі мітохондрій у контролі Ca^{2+} -гомеостазу в ГМК матки та їхнього значення у забезпеченні спряження між збудженням та скороченням в міометрії. Отримані у роботі дані мають важливе фундаментальне та практичне значення.

Висновок.

Враховуючи все сказане вище, вважаю, що опонована робота Тетяни Олександрівни Векліч « МЕХАНІЗМИ ДІЇ КАЛККС[4]АРЕНІВ НА КАТІОН-ТРАНСПОРТУВАЛЬНІ АТР-ГІДРОЛАЗИ ТА КАЛЬЦІЄВИЙ ГОМЕОСТАЗ В МІОМЕТРІЇ », присвячена важливій науковій і практичній проблемі, є завершеною науковою працею, що за актуальністю проблеми, теоретичним рівнем, методичним забезпеченням, науковою новизною та практичним значенням результатів досліджень відповідає вимогам МОН України до докторських дисертацій п.п. 9, 10, 12, 13 “Порядку присудження наукових ступенів”, затвердженого постановою Кабінету міністрів України №567 від 24.07.2013р. зі змінами, внесеними згідно з постановою Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015, а її автор Векліч Тетяна Олександрівна заслуговує присудження їй наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

**Завідувач кафедри біохімії
Львівського національного університету
імені Івана Франка,
доктор біологічних наук,
професор**

Н. Сибірна

Сибірна Н.О.

Підпис професора Сибірної Н.О. завіряю.
Вчений секретар Львівського національного
Університету імені Івана Франка, доцент



Г. Грабовецька

Грабовецька О.С.