

14 ВЕР 2021

Вх. №

120/03-07/1/каб  
Н.Т. Карлова

## ВІДГУК

**офіційного опонента на дисертаційну роботу Т.О. Векліч «Механізми дії каліксаренів на катіон-транспортувальні АТР-гідролази та кальцієвий гомеостаз в міометрії», представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія**

Відомо, що деякі розлади скоротливої функції гладеньких м'язів пов'язані з порушенням кальцієвого гомеостазу в міоцитах, куди іони кальцію потрапляють з позаклітинного простору через різноманітні кальцієві канали плазматичної мембрани або ж транспортуються з цитозоллю завдяки електрохімічному градієнту. Однак, механізми внутрішньоклітинного іонного гомеостазу і можливість їх корекції через вплив низькомолекулярних біоактивних агентів ще недостатньо вивчені, виключаючи лише окремі інгібітори неорганічної, органічної і протеїнової природи. При цьому є мало даних і щодо структур, здатних нормалізувати кальцій-залежну скоротливу функцію міометрія у випадку її порушення при патологічних станах. Очевидно, такі сполуки повинні проникати через плазматичну мембрану і з високою спорідненістю і селективністю змінювати ензиматичну чи транспортну активність внутрішньоклітинних мембранозв'язаних і цитоплазматичних білків. Не в останню чергу це стосується активності  $Mg^{2+}$ -залежних АТРаза, функції яких є незамінними і досить специфічними. До таких електроензимів належать, зокрема, транспортна  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТРаза (транспорт  $Ca^{2+}$  з клітини у позаклітинне середовище), убаїнчутлива  $Na^+, K^+$ -АТРаза (перенесення іонів  $Na$  та  $K$  із клітини та в клітину, відповідно), убаїнрезистентна "базальна"  $Mg^{2+}$ -АТРаза (регуляція концентрації протонів у позаклітинному та внутрішньоклітинному просторах).

Підхід, що використаний у дисертаційній роботі Т.О. Векліч, є новим і оригінальним. Він заснований на можливості пошуку і створення нових інгібіторів катіон-транспортувальних АТР-гідролаз на основі макроциклічних сполук, які привертають все більшу увагу як можливі регулятори біологічних перетворень. Перевагами таких молекул у порівнянні, наприклад, із циклічними пептидами можуть полягати у їх стійкості в процесі біологічного транспорту при проникненні в клітину. До того ж варто зазначити і широкі можливості для конструювання нових молекул з прийнятними замісниками і, як правило, низьку токсичність та імуногенність таких речовин. Зважаючи на широкий обсяг інформації про біоактивність каліксаренів на сьогодні, слід, однак, підкреслити, що дані про їх використання як модуляторів енергозалежних  $Ca^{2+}$ -транспортувальних систем та АТР-гідролаз раніше були відсутні в літературі. З огляду на це важливість теми дисертаційного дослідження «Механізми дії каліксаренів на катіон-транспортувальні АТР-гідролази та кальцієвий гомеостаз в міометрії», так само як і його актуальність не викликають сумнівів.

У представленій дисертаційній роботі Т.О. Векліч досліджено вплив калікс[4]аренів на  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазну,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРазну та  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активності у плазматичній мембрані і  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність саркоплазматичного ретикулула клітин міомеріа, а також на  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортну активність  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани,  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз у міоцитах матки, а також на неензиматичний гідроліз АТР.

Метою дисертаційної роботи Т.О. Векліч було з'ясування біохімічних та фізико-хімічних механізмів дії калікс[4]аренів на мембранозв'язані катіон-транспортувальні  $\text{Mg}^{2+}$ , АТР-залежні електроензими гладеньком'язових клітин та кальцієвий гомеостаз в міомерії. Цій меті було підпорядковано завдання, які включали дослідження мембранотропних властивостей калікс[4]аренів, вивчення впливу калікс[4]аренів на ензиматичну та транспортну активність  $\text{Mg}^{2+}$ , АТР-залежних кальцієвих помп плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулула, дослідження впливу калікс[4]аренів на ензиматичну активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази та  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани, а також з'ясування закономірностей дії калікс[4]аренів на неензиматичний гідроліз АТР.

Дисертаційна робота має класичну структуру і складається зі вступу, огляду літератури (розділ 1), експериментальної частини (матеріали та методи досліджень, розділ 2), результатів та їх обговорення (розділи 3-6), заключного розділу, висновків і переліку цитованої літератури (537 джерел). Загальний об'єм рукопису складає 403 сторінки.

Вступ містить обґрунтування актуальності теми дисертації, сформульовану мету і завдання роботи, розкриває предмет та об'єкт дослідження. Тут же викладено наукову новизну одержаних результатів та їх практичне значення і визначено особистий внесок дисертанта у виконане дослідження.

Огляд літератури включає необхідний аналіз відомих даних щодо мембранних механізмів регуляції концентрації іонів кальцію в гладеньком'язових клітинах, структурної організації, властивостей та регуляції  $\text{Mg}^{2+}$ , АТР-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин, інших  $\text{Mg}^{2+}$ -залежних АТР-гідролазних систем плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулула гладеньком'язових клітин. При цьому розглядається сучасний стан досліджень каліксаренів як потенційних модуляторів біохімічних процесів. Приведені в літературному огляді дані підтверджують актуальність теми дослідження, а також забезпечують подальшу інтерпретацію результатів дисертаційної роботи.

В експериментальній частині (розділ 2) розкриваються методи і методики, що застосовувались під час виконання дисертаційної роботи. Було використано методи препаративної біохімії, методи ензимології, біохімічної мембранології, кінетичного аналізу, фізико-хімічні методи (флуоресцентні, спектрофотометричні, лазерно-кореляційної спектроскопії), світлової та електронної мікроскопії, методи комп'ютерного моделювання, математичного

моделювання і статистичного аналізу та інші. Використані підходи застосовано коректно у повній відповідності до завдань дисертаційного дослідження.

Наукові положення, що обговорюються в дисертації, є обґрунтованими. Вони детально викладені у чотирьох розділах. У розділі 3 подано результати дослідження мембранотропних властивостей калікс[4]аренів, у розділах 4 і 5 розглядається вплив калікс[4]аренів на ензиматичну активність  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази і  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія, а розділ 6 репрезентує результати дослідження дії калікс[4]аренів на неензиматичний гідроліз АТФ. Отримані дані щодо особливостей біохімічних механізмів в присутності калікс[4]аренів узагальнюються в заключному розділі та висновках, які логічно узгоджуються з отриманими результатами.

Всі авторські формулювання щодо наукової новизни дисертаційної роботи є об'єктивними. Зокрема, в дисертації Т.О. Векліч вперше сформульовано концепцію і продемонстровано доцільність використання каліксаренових похідних для спрямованої модуляції активності катіон-транспортувальних  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-залежних електроензимів. Вперше отримані дані стосуються описаної в роботі високоафінної взаємодії фрагментів плазматичних мембран з каліксаренами з утворенням комплексів з мембранними везикулами, а також локалізації в мембранній структурі та проникнення через неї. Вперше знайдено низькомолекулярний селективний (на рівні плазматичних мембран) органічний інгібітор  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-залежної  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи – каліксарен С-90 з коефіцієнтом інгібування солюбілізованої  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази в мікромольному діапазоні та встановлено біохімічні механізми його дії як неконкурентного інгібітора, що не впливає на уявну константу Міхаеліса за АТФ і коефіцієнти активації для іонів кальцію та магнію. Вперше показано, що ця сполука підвищує концентрацію іонів кальцію у міоцитах матки, зменшує ефективний гідродинамічний діаметр клітин міометрія, пригнічує швидкість релаксації м'язового скорочення, а також збільшує нормовану швидкість скорочення міометрія у відповідь на його стимуляцію окситоцином. Вперше встановлено, що каліксарени С-97, С-99 та С-107 селективно та значно ефективніше, ніж убаїн, пригнічують активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази плазматичних мембран, не впливаючи на коефіцієнт активації для іонів  $\text{Mg}$ , уявну константу Міхаеліса за АТФ та зменшуючи спорідненість до іонів натрію. Крім того, вперше показано, що деякі з досліджених сполук стимулюють неензиматичний гідроліз АТФ.

Одержані результати є перспективними в практичному плані для подальшого з'ясування фізико-хімічних та біологічних властивостей каліксаренів як потенційно біоактивних сполук для створення ефективних лікарських засобів нового покоління – селективних модуляторів АТФ-залежних мембранозв'язаних систем катіонного ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ) транспорту, що може бути використано для лікування таких захворювань як гіпертензія, діабет, ішемія і гіпоксія, різні нейропатії, викидні тощо. Результати дисертаційного дослідження, зокрема, низька токсичність і властивості каліксарену С-90

підвищувати рівень іонів кальцію та зменшувати швидкість релаксації міометрія можуть розглядатися як перспективні для застосування у клінічній практиці для стимуляції пологової активності та/або для підвищення базального тону гладеньких м'язів матки, зокрема, після пологів. Сполуки С-97 і С-107 (інгібітори  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази плазматичних мембран), а також С-90 (інгібітор транспортної  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази) можуть бути корисними у біохімічній лабораторній практиці, а комплексоутворення з каліксаренами та гідроліз АТР відкриває можливість розроблення способу його кількісного визначення.

Принципових зауважень щодо дисертаційної роботи Т.О. Векліч немає. Робота видається змістовною і досконалою, виклад матеріалу добре продумано. При цьому можна підняти наступні питання.

1. Два типи каліксаренових молекул виявились активними щодо  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази у плазматичній мембрані, не впливаючи на активність  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази. Це похідні (С-97, С-99 та С-107), які відрізняються структурою біоізостерного фосфонатного фрагменту (або двох), і відповідно, ліпофільністю, кількістю іоногенних залишків тощо. Чи можна оцінити особливості, що спостерігалися для кожної із сполук в системах, що вивчалися?

2. Не можна не погодитись, що як інгібування, так і активація  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази є важливими для регуляції функцій плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. У цьому зв'язку результати, що стосуються активаційного впливу сполуки ІФТ-35 вдало доповнюють наукове висвітлення проблеми. Проте варто було б зазначити можливий механізм такої активації цього ензиму.

3. Частина дисертаційної роботи, що оформлена в окремий розділ і стосується закономірностей дії каліксаренів на неензиматичний гідроліз АТР, є важливою складовою цієї дисертації. Однак деякі питання заслуговують на увагу, наприклад, щодо припинення гідролізу АТР, індукованого калікс[4]ареном С-107, що не може бути пов'язаним з можливим повним вичерпанням субстрату в ході реакції, а обмежується якимось іншим фактором.

4. Дисертація добре оформлена, проілюстрована необхідними рисунками і таблицями. Не зовсім вдалі вирази або незначні помилки зустрічаються рідко, наприклад, на стор. 16, 62, 184, 238, 314, 332 дисертації і на стор. 5, 15, 17, 18, 23 автореферату.

Однак, такі зауваження не є суттєвими. Вони не мають загального характеру і є швидше рекомендаційними та жодною мірою не впливають на високу позитивну оцінку дисертаційної роботи Т.О. Векліч.

Дисертаційна робота є оригінальним і завершеним дослідженням з новими науково обґрунтованими результатами в області біохімії, що стосуються закономірностей і механізмів впливу каліксаренів на каталітичну та транспортувальну активності  $\text{Mg}^{2+}$ -АТР-залежних електроензимів плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин та кальцієвий гомеостаз в міометрії. Представлена до захисту дисертація виконана на сучасному методологічному рівні, має наукове та практичне значення, що підтверджується відповідними

публікаціями. Робота добре оформлена, а зроблені висновки виважені, послідовні і логічні. За результатами дисертаційної роботи було опубліковано 102 наукові праці, з них 36 статей (у тому числі 2 монографії, 2 статті у колективній монографії, 6 статей у міжнародних наукових журналах та 1 патент) у фахових наукових журналах, які включені до міжнародних наукометричних баз, та 66 тез доповідей на міжнародних та всеукраїнських наукових конференціях. Наукові публікації повністю відображають зміст представленої роботи. Наукові положення дисертації і автореферату ідентичні.

З огляду на вищевикладене вважаю, що дисертаційна робота Векліч Тетяни Олександрівни «Механізми дії каліксаренів на катіон-транспортувальні АТР-гідролази та кальцієвий гомеостаз в міометрії» є самостійним дослідженням, яке за актуальністю, обсягом і змістом проведених досліджень, науковою новизною та практичним значенням одержаних результатів відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. зі змінами, внесеними згідно постанови Кабінету Міністрів України № 656 від 10.08.2015 р. та № 1159 від 30.12.2015 р., щодо дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора наук, а її авторка заслуговує на присудження їй наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Доктор хімічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України,  
завідувач відділу механізмів  
біоорганічних реакцій  
Інституту біоорганічної хімії та  
нафтохімії ім. В. П. Кухаря  
НАН України



А.І. Вовк

