



“ЗАТВЕРДЖУЮ”
Директор Інституту біохімії
ім. О. В. Палладіна НАН України
академік НАН України,
доктор біологічних наук, професор.
С. В. Комісаренко
25 серпня 2021 р.

ВИСНОВОК

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України
щодо дисертаційної роботи Яворовської Вікторії Ігорівни на тему:
«Тіакалікс[4]арени – протектори АТР-гідролазної активності міозину міометрія
від впливу катіонів важких металів», поданої на здобуття ступеня доктора
філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

ВИТЯГ

з протоколу №3 розширеного засідання відділу біохімії ліпідів із залученням
співробітників відділу біохімії м'язів та хімії та біохімії ферментів
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України
від «16» червня 2021 року

ПРИСУТНІ: головуєча, рецензент, в. о. зав. відділу біохімії ліпідів, к.б.н. Косякова Г.В., секретар засідання, к.б.н., м.н.с. Кіндрок Н.Л., співробітники відділів інституту: біохімії м'язів – акад. НАНУ, д. б. н., проф. Костерін С.О., д. б. н., пр. н. с. Бабіч Л. Г., д. б. н., пр. н. с. Шликов С.Г., д. б. н., рецензент, пр. н. с. Данилович Ю.В., к. б. н., с. н. с. Данилович Г. В., к. б. н., с. н. с. Векліч Т. О., с. н. с., к. х. Карахін С.О. н.к.б., н. н.с. Бевза О.В., к. т. н., с. н. с. Чуніхін О. Ю.; інж I кат. Пугач А.Я., біохімії ліпідів: д.б.н., ст.н.с. Горідько Т.Н., к.б.н, н.с. Мегедь О.Ф., к.б.н., с.н.с. Клімашевський В.М., к.б.н., с.н.с. Бердишев А.Г., в.о. зав. відділу хімії та біохімії ферментів, к.б.н., с.н.с. Тихомиров А.О., д.б.н, пр.н.с. Гриненко Т.В., д.б.н., с.н.с. Кібірев В.К.

З доповіддю виступила аспірантка відділу біохімії м'язів 2016-2020 рр. Яворовська Вікторія Ігорівна:

Шановні колеги, хочу представити вашій увазі доповідь за темою дисертаційної роботи на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю біологія. Тема роботи: «Тіакалікс[4]арени – протектори АТР-гідролазної активності міозину міометрія від впливу катіонів важких металів».

Важкі метали викликають низку порушень репродуктивної системи жінки. Зокрема, вони викликають викидні, безпліддя, пердчасні пологи, а також викликають гормональні порушення та онкологічні захворювання репродуктивної

властивості тіакаліксаренів при шкідливих впливах катіонів важких металів на АТР-гідролазну активність субфрагмента-1 міозину та функціонування дихального ланцюга мітохондрій у клітинах міометрія, а також показана можливість застосування тіакаліксарена С-800 в якості селективного та чутливого хемосенсора до катіонів цинку.

В роботі досліджувались властивості двох тіакаліксаренів тетрасульфонаттетрагідрокситіакалікс[4]арену (сполуки С-798) та тетракіс[(гідрокси-етоксифосфоніл)метил]-тетрагідрокситіакалікс[4]арену (сполуки С-800). Ці сполуки були синтезовані, охарактеризовані та люб'язно надані нам колегами з інституту органічної хімії.

Першим завданням було дослідити захисні властивості тіакаліксаренів за шкідливого впливу катіонів важких металів на АТР-гідролазну активність субфрагмента -1 міозину. Було показано, що катіони кадмію, плюмбуму та нікелю концентраційнозалежно інгібують АТР-гідролазну активність субфрагмента-1 міозину. Також, було продемонстровано, що катіони цинку також концентраційнозалежно інгібують активність АТРази міозину. Катіони цинку в 1,5 рази інгібують гідроліз АТР каталізований міозином. Надлишок катіонів магнію, а саме підвищення їх концентрації у середовищі інкубації не знімає інгібування АТР-гідролазної активності субфрагмента-1, викликане іонами цинку. Було показано, що тіакаліксарен С-800 здатен відновлювати АТР-гідролазну активність субфрагмента-1 міозину за її інгібування катіонами кадмію та плюмбуму. Також було встановлено, що тіакаліксарен С-800 відновлює до нормального рівня АТР-гідролазну активність субфрагмента -1 міозину за її інгібування катіонами нікелю.

Зроблено наступні висновки: виявлено інгібувальний вплив катіонів кадмію, плюмбуму, нікелю та цинку на АТР-гідролазну активність субфрагмента-1 міозину. Вона відновлювалась до контрольного рівня при додаванні в середовище інкубації тіакалікс[4]арену С-800. Тіакалікс[4]арен С-798 також відновлював до контрольного рівня АТР-гідролазну активність субфрагменту-1 міозину після її інгібування катіонами Zn. За допомогою методу комп'юторного моделювання встановлені можливі ділянки зв'язування катіонів кадмію, плюмбуму та цинку з амінокислотними залишками в субфрагменті-1 міозину поблизу активного центру. Зроблено припущення, що тіакалікс[4]арен С-800 здатен послаблювати взаємодію між катіонами Cd/Pb та амінокислотними залишками у субфрагменті-1 міозину.

Встановлено, що тіакаліксарени С-800 та С-798 відновлюють АТР-гідролазну активність субфрагмента -1 за її інгібування катіонами цинку. Було також ідентифіковано за допомогою комп'ютерного моделювання можливі ділянки зв'язування кадмію та плюмбуму поблизу активного центра міозину. А також ідентифіковані амінокислоти, які беруть у цьому участь. А також зроблено припущення, що тіакаліксарен С-800 здатен послаблювати цю взаємодію з амінокислотними залишками у структурі субфрагменту-1. Другим завданням було дослідити захисний вплив тіакаліксаренів на біохімічні показники функціонування дихального ланцюга мітохондрій за дії катіонів важких металів. Було показано, що тіакаліксарен С-800 нівелює порушення

активності дихального ланцюга мітохондрій, що було викликано катіонами кадмію та плумбуму. При цьому тіакаліксарен сам не впливав на активність дихального ланцюга мітохондрій в клітинах міометрія за концентрації 60-250 мкМ. Досліджувались також вибрані показники функціонування дихального ланцюга мітохондрій міометрія. Було встановлено підвищення рівня флуоресценції НАДН в ізольованих мітохондріях за інкубації з катіонами кадмію та плумбуму в 2,5 та 1,5 рази відповідно, а також НАДН-флуоресценція в ізольованих мітохондріях підвищувалась за дії катіонів цинку. В той час, як катіони магнію та кальцію не впливали на неї. Катіони кадмію підвищували автофлуоресценцію ФАД⁺ в ізольованих мітохондріях. А також було продемонстровано, що фізіологічнозначущі катіони такі, як магній, кальцій та цинк не впливають на автофлуоресценцію ФАД⁺ ізольованих мітохондріях. Було показано, що катіони кадмію, плумбуму та цинку підвищують утворення активних форм кисню в клітинах міометрія. Однак при додаванні тіакаліксарену С-800 з клітинами гладенького м'яза матки було показано, що вони не запобігають стимулюючому впливу катіонів кадмію на продукування активних форм кисню. Було зроблено наступні висновки при дослідженні дії кадмію, плумбуму, кальцію, магнію та цинку на рівень автофлуоресценції нікотинамідних та флавінових коферментів в ізольованих мітохондріях гладенького м'яза матки. Показано, рівень автофлуоресценції НАДН зростає в ізольованих мітохондріях при їх інкубації з катіонами кадмію, плумбуму та цинку. Водночас катіони кальцію та магнію не впливали на автофлуоресценцію НАДН в ізольованих мітохондріях. Продемонстровано також підвищення рівня автофлуоресценції ФАД⁺ в ізольованих мітохондріях за їхньої інкубації з катіонами кадмію. Фізіологічно значущі катіони двовалентних металів магнію, кальцію та цинку на автофлуоресценцію ФАД⁺ в ізольованих мітохондріях не впливають.

Встановлено, що під впливом катіонами кадмію та плумбуму порушувалось функціонування дихального ланцюга мітохондрій. Показано, що тіакалікс[4]арен С-800 нівелював порушення активності дихального ланцюга мітохондрій, викликане катіонами кадмію та плумбуму. При цьому сам тіакалікс[4]арен С-800 суттєво не впливав на функціонування дихального ланцюга мітохондрій.

Третім завданням було з'ясувати механізми взаємодії тіакаліксаренів з катіонами цинку, а також можливість їх застосування в якості внутрішньоклітинних флуоресцентних зондів до катіонів цинку. Було продемонстровано, що катіони цинку на відміну від катіонів інших металів посилюють флуоресценцію тіакаліксарену С-800. Було також продемонстровано, що флуоресценцію тіакаліксарену С-800 збільшується при підвищенні концентрації катіонів цинку, а також самого тіакаліксарену. За допомогою докінг-аналізу було показано, що катіони цинку здатні зв'язуватися з вернім вінцем, а саме з фосфонілметильними групами на верхньому вінці, а також катіони цинку зв'язуються з нижнім вінцем макроциклу в цьому беруть участь атоми сіри та атоми кисню гідроксильних груп. Таке зв'язування характерне для тетрагідрокситіакаліксаренів загалом. На клітинах міометрія

було показано, що тіакаліксарен C-800 може використовуватись, як селективний внутрішньоклітинний флуоресцентний зонд до катіонів цинку. Було показано, що катіони цинку посилюють флуоресценцію клітин попередньо навантажених тіакаліксареном C-800. Отже були зроблені наступні висновки: флуоресценція тіакаліксарену C-800 підвищується під впливом катіонів цинку. Вона є селективною до них і практично не змінюється за присутності катіонів інших двовалентних металів. Тіакаліксарен також демонструє концентраційнозалежне зростання своєї флуоресценції за присутності катіонів цинку. Також було показано, що флуоресценція тіакаліксарену збільшувалась в клітинах гладенького м'язу матки при інкубуванні з катіонами цинку. Отже зазначений тіакаліксарен може розглядатися, як селективний флуоресцентний зонд до внутрішньоклітинних катіонів цинку. Також методом комп'ютерного моделювання було показано, що катіони цинку зв'язуються на верхньому та нижньому вінці макроциклу з фосфоновими групами, а також атомами сіри та кисню на нижньому вінці.

Висновки дозволять не зачитувати. Оскільки вони були раніше озвучені. За матеріалами дисертаційної роботи було опубліковано дві статті та глава в монографії, а також прийнята до друку стаття.

Я вдячна співробітникам відділу біохімії м'язів Раїсі Дмитрівні Лабинцевій, кандидату біологічних наук Ганні Вікторівні Данилович, кандидату хімічних наук Сергію Олександровичу Карахіму, а також Олександрю Васильовичу Бевзі, а також Черенку з інституту органічної хімії за участь у експериментах, обговоренню результатів та цінні поради.

Із запитаннями виступили:

Гриненко Т.В. д.б.н, пр.н.с. :

Як здійснювалось виділення субфрагмента -1 міозину?

Яворовська В.І.:

Спочатку із міометрія свині здійснювалось виділення актоміозинового комплексу, а потім за допомогою папаїну проводили розщеплення міозину із наступним відщепленням субфрагмента-1.

Тихоміров хімії та біохімії ферментів в.о. зав. Відділу, к.б.н, с.н.с. :

У вас виходить, що катіони важких металів підвищують активність дегідрогеназ мітохондрій. І можливо це добре? Отже може вам краще переглянути отримані вами результати.

Яворовська В.І.:

Я вважаю, що катіони важких металів по-різному можуть впливати на активність дихального ланцюга мітохондрій. Так кадмій може посилювати окиснення ФАДН₂ сукцинатдегідрогеназою.

Данилович Г.В., к. б. н., с. н. с.

Поверніться до слайду мети та завдання. Не можна так формулювати мету та завдання. У вас виходить , що результати були відомі заздалегідь.

Яворовська В.І.:

Це були слухне зауваження я обов'язково врахую їх у подальшому.

Данилович Г.В., к. б. н., с. н. с.

Поверніться до слайду з впливом катіонів магнію на АТР-гідролазну активність. Чому ці результати ніяк не відображені у висновках?

Яворовська В.І.:

Це буде обов'язково враховано в подальшому.

Данилович Г.В., к. б. н., с. н. с.

Чи визначали ви характер дії катіонів цинку на АТР-гідролазу?

Яворовська В.І.:

Так. ми встановили, що характер інгібування АТР-гідролази катіонами цинку був неконкурентним.

Данилович Г.В., к. б. н., с. н. с.

Якою є дія саме катіонів кадмію на дихальний ланцюг мітохондрій?

Яворовська В.І.:

За даними наших досліджень виходить, що катіони кадмію інгібують комплекс I ЕТЛ та водночас посилюють функціонування комплексу II. За літературними даними відомо, що катіони кадмію порушують функціонування ферментів циклу трикарбонових кислот ізоцитрат дегідрогенази та малат дегідрогенази, що може викликати нестачу функціонування комплексу I мітохондрій завдяки зниження утворення НАДН.

Шликов С.Г. д. б. н., пр. н. с.:

Відомо, що від 30-70% населення України страждає від дефіциту цинку. Чи доречним було включати цей катіон у ваше дослідження?

Яворовська В.І.:

По-перше цинк відноситься також до важких металів, хоча це дуже важливий мікроелемент для нормального функціонування організму. Однак в надлишкових кількостях він може бути дуже токсичним для організму. Були випадки інтоксикації катіонами цинку, наприклад при прийманні препаратів та вітамінних комплексів до яких входив цинк. Отже потрібно розробляти препарати для усунення надлишку цинку в організмі.

Шлаков С.Г. д. б. н., пр. н. с.:

У вагітних жінок потреба у цинку зростає чи слухним є використання

тіакаліксаренів та інших хелаторів щодо них?

Яворовська В.І.:

До кожного медичного випадку, я вважаю, потрібно підходити індивідуально. У деяких жінок буде дефіцит цинку і їм потрібні будуть препарати з цинком. А іноді може бути навпаки інтоксикація цинком при довготривалому прийомі препаратів з цинком. В цьому випадку треба розглядати, що потрібно вагітній жінці. Який комплекс вітамінів чи мінералів. Якщо має місце гостре отруєння, то потрібно приймати хелатуючі ліки. Це моя думка.

Косякова Г.В. в. о. зав. відділу біохімії ліпідів, к.б.н.:

Вікторіє, потрібно навести дані про внутрішньоклітинні концентрації цинку та вказати коли цинк можна розглядати, як токсичний.

Яворовська В.І.:

LD₅₀ для цинку вважається 3 г на кг маси. Це вже летальна доза.

Косякова Г.В. в. о. зав. відділу біохімії ліпідів, к.б.н.:

Коли я дивилась презентацію у мене виникали деякі питання. Скільки потрібно з'їсти цинку, щоб отримати летальну дозу. Чи можете ви сказати, яка концентрація цинку в організмі?

Яворовська В.І.:

В організмі людини наявно 30 мМ. Він розподілений нерівномірно в організмі. Найбільша концентрація цинку у скелетних м'язах, де його концентрація доходить до 3 мМ.

Косякова Г.В. в. о. зав. відділу біохімії ліпідів, к.б.н.:

В основному вміст металів вимірюється в мг. Ви обов'язково подивіться ГДК по всім металам.

Яворовська В.І.:

Слушне зауваження.

Косякова Г.В. в. о. зав. відділу біохімії ліпідів, к.б.н.:

Ви використали не 10 мМ у дослідженні. У мене запитання, як ви вийшли на концентрацію цинку, яку ви вказали в у своєму дослідженні.

Яворовська В.І.:

У нас також були попередні дослідження на субфрагменті -1. Ми брали різні концентрації та визначали концентраційну залежність впливу катіонів цинку на субфрагмент-1 міозину. Найбільше інгібування спостерігалось при 5 мМ. Я вважаю, що підвищувати концентрацію катіонів цинку для експериментів не потрібно.

д.х.н., с.н.с. Кібірев В.К.:

Ви показали, що іони цинку зв'язуються каліксареном по верхній та нижній частині молекули. Які є константи, які може не ви визначали, щоб визначити інші найбільш стійкі комплекси крім наведених?

Яворовська В.І.:

Ми провели докінг-аналіз та виявили, що існує три найбільш енергетично вигідні конформації тіакаліксарену. Надалі ми вже використовували їх, як моделі та каркас для визначення взаємодії з катіонами цинку. Комплекс показаний у роботі є найбільш енергетично вигідним при зв'язуванні катіонів. Були інші конформації, але вони менш енергетично вигідні.

д.х.н., с.н.с. Кібірев В.К

Чи ви визначали константи зв'язування для цих комплексів?

Яворовська В.І.:

Ні, константи зв'язування ми не визначали. Лише провели комп'юторне моделювання для визначення комплексів з мінімумом енергії.

Горидько Т.Н. д.б.н., ст.н.с.:

Які ви вбачаєте подальші перспективи використання досліджених тіакаліксаренів?

Яворовська В.І.:

Ми вважаємо, що тіакаліксарени можна використовувати в медицині в якості засобів при отруєнні катіонами важких металів. А також оскільки катіон цинку є надзвичайно важливими в організмі, тому можливе використання тіакаліксаренів, як флуоресцентних зондів у фундаментальних та медичних дослідженнях.

У обговоренні взяли участь:

Костерін С.О. акад. НАНУ, д. б. н., проф.:

Варто відзначити, що Вікторія зазнавала багато труднощів на своєму шляху у тому числі технічного характеру. Вона має вже три публікації та четверту прийняту до друку. Тому прошу підтримати її.

Коли ми тільки почали займатися каліксаренами ми вважали, що все буде досить просто, але все виявилось дуже складним.

Косякова Г.В., в. о. зав. відділу біохімії ліпідів, к.б.н., рецензент

Дисертаційна робота Яворовської Вікторії Ігорівни присвячена дослідженню захисних властивостей тіакалікс[4]аренів на АТР-гідролазну активність міозину та функціонування дихального ланцюга мітохондрій клітин міометрія за умов шкідливого впливу катіонів важких металів — кадмію, свинцю, цинку та нікелю.

Актуальність обраної теми. Катіони важких металів, традиційно, вважаються одними з найбільш токсичних забруднювачів довкілля.

Потрапляючи до організму людини та тварин в кількостях, що перевищують гранично допустимі концентрації, вони здатні до накопичення та прояву системної токсичної дії на організм. З даних літератури відомо, що катіони важких металів, також, викликають зниження АТФ-гідролазної активності міозину та активності актоміозинового комплексу міометрія, що зменшує скоротливу активність міометрію матки та може негативно впливати на перебіг пологів у породіль. Тому пошук біологічно активних сполук - хелаторів важких металів є перспективним та актуальним. З цієї точки зору особливий інтерес представляють калікс[4]арени та їх похідні – тіакалікс[4]арени, які здатні до комплексоутворення з іонами важких металів, володіють низькою токсичністю та імуногенністю. Тому, дослідження механізмів протекторного впливу тіакалікс[4]аренів на АТФ-гідролазну активність міозину є актуальним і має перспективи практичного застосування. Таким чином, актуальність обраної теми дисертаційної роботи В.І. Яворовської не викликає сумнівів.

Ознайомлення з матеріалами підготовленої дисертаційної роботи дає підстави вважати дану роботу закінченим науковим дослідженням. Дисертація складається з традиційних розділів: вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів та їх обговорення, заключного розділу, висновків та списку використаних джерел. Дисертаційна робота викладена на 147 сторінках тексту і проілюстрована 32 рисунками та 1 таблицею. Список літератури включає 307 найменувань. Текст роботи написаний науковою українською мовою, хоча і не позбавлений помилок та невдалих висловів. За темою дисертації опубліковано 2 статті, глава у монографії та 5 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях.

Автором дисертаційної роботи повною мірою обґрунтована актуальність обраної теми, сформульовані мета та завдання досліджень, обрані адекватні методи їх вирішення.

В огляді літератури автор узагальнює сучасні дані щодо функціонування актоміозинового комплексу, особливостей регуляції процесу скорочення гладеньких м'язів, зосереджує увагу на питанні негативного впливу іонів важких металів на жіночу репродуктивну систему, а також наводить детальну інформацію про фізико-хімічні, біологічні властивості калікс[4]аренів, окреслює перспективи їх застосування в медицині. Слід відзначити, що кожний підрозділ огляду літератури закінчується підсумковою частиною, в якій автор робить наголос на найбільш вагомих моментах викладеного матеріалу.

Розділ «Матеріали та методи» містить детальний опис методів та методичних прийомів, в ньому наведені також структурні формули калікс[4]аренів та перелік хімічних реагентів, що були використані в дослідженнях. Варто відзначити, що в роботі використано широкий спектр методів дослідження, як то, електрофоретичні методи, препаративної біохімії, конфокальної мікроскопії, протокової цитофлуориметрії, комп'ютерного моделювання.

Розділ «Експериментальні дослідження» складається з 8 підрозділів в яких автор наводить результати досліджень захисного впливу тіакалікс [4] арени С-800 від інгібуючої дії катіонів кадмію, свинцю та нікелю на АТФазу

активність субфрагмента-1 міозину міометрія, відновлювальної дії тіакалік[4]аренів С-798 та С-800 на АТРазну активність субфрагмента-1 міозину міометрія за інгібувального впливу Zn^{2+} ; виявлення можливих ділянок зв'язування катіонів кадмію, свинцю та цинку в структурі субфрагмента-1 міозину; впливу катіонів кадмію, свинцю окремо та разом з тіалікс[4]ареном С-800 на метаболічну активність мітохондрій клітин міометрія; флуоресцентних властивостей тіакалік[4]аренів С-798 та С-800, а також можливості використання тіакалік[4]арену С-800 як селективного та чутливого зонду до катіонів Zn.

Автором отримано переконливі дані, що механізм захисної дії тіакалік[4]арену С-800 полягає у його здатності хелатувати свинцю, кадмію та нікелю за допомогою гідроксильних груп та атомів двохвалентного сульфуру на нижньому вінці макроциклу. Було також зроблено припущення, що тіакалік[4]арен С-800 може відтягувати катіони важких металів з їх сайтів зв'язування у субфрагменті-1 міозину. З допомогою методів комп'ютерного моделювання виявлені можливі сайти зв'язування катіонів досліджуваних важких металів та тіакалік[4]аренів в структурі субфрагменту-1 міозину. Неабиякий інтерес викликають дані щодо впливу іонів важких металів та тіакалік[4]аренів на метаболічну активність клітин міометрію. Автор припускає, спираючись на результати досліджень, що тіакалік[4]арен С-800 нівелює порушення активності НАДН-дегідрогенази мітохондрій, що було викликано катіонами Pb та Cd і в такий спосіб сприяє відновленню метаболічної активності клітин міометрію. В той же час, в роботі показано, що тіакалік[4]арен С-800 не запобігає стимулюючому впливу катіонів кадмію на утворення активних форм кисню в клітинах міометрія. На особливу увагу заслуговують результати дослідження флуорисцентних властивостей тіакалік[4]аренів С-798 та С-800, на підставі яких автор стверджує про можливість застосування тіакалік[4]арену С-800 як селективного та чутливого зонд до катіонів Zn. Ці результати підвищують практичне значення роботи. Заключний розділ містить узагальнення отриманих результатів, висновки сформульовані у відповідності до отриманих результатів роботи.

Аналіз матеріалу проведених досліджень дозволяє зробити висновок про достатньо повне теоретичне та експериментальне обґрунтування положень, висунутих в роботі.

В той же час до викладення експериментального матеріалу, оформлення дисертаційної роботи є наступні зауваження:

1. Розділ «Огляд літератури»: у підрозділ з інформацією щодо калікс[4]аренів бажано додати матеріал щодо їх проникності для клітини та шляхи елімінації з організму.

2. До розділу «Матеріали та методи» необхідно додати:

- методи статистичної обробки даних отриманих результатів;

-перелік сполук досліджуваних металів, які були використані як джерело іонів;

- обґрунтувати застосовані концентрації іонів важких металів та тіокалікс[4]аренів.

3. Розділ «Результати та обговорення», підрозділ 3.5:

- необхідно надати пояснення як пов'язані посилення метаболічної активності клітин міометрію за дії іонів важких металів із інгібуванням АТФазної активності, виявлене у ваших експериментах.

- Рис. 3.27 потребує доопрацювання.

5. «Висновки»: скоротити кількість висновків (допускається 4-5).

6. Необхідно ретельно вчитати текст роботи.

Приведені зауваження стосуються, переважно, оформлення дисертаційної роботи та інтерпретації її результатів і не впливають на якість роботи в цілому.

Вважаю, що дисертаційна робота В.І. Яворовської «Тіокалікс[4]арени – протектори АТР-гідролазної активності міозину міометрія від впливу катіонів важких металів» є завершеним науковим дослідженням, яке за актуальністю, вирішенням поставлених задач, адекватністю застосованих методів та експериментальних моделей, науковою новизною отриманих результатів, можливостями їх практичного застосування, висновками відповідає вимогам ДАК МОН України до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091-Біологія і може бути рекомендована до офіційного захисту.

Данилович Ю.В., д. б. н., пр. н. с., рецензент:

До речовин здатних порушувати скоротливу функцію гладенького м'яза матки належать катіони важких металів. У дисертаційній роботі Яворовської Вікторії Ігорівни представлені результати досліджень, спрямованих на з'ясування захисних властивостей тіокалікс[4]аренів С-798 та С-800 за умови впливу катіонів важких металів — кадмію, свинцю, цинку та нікелю на АТР-гідролазну активність субфрагмента-1 міозину та функціонування дихального ланцюга мітохондрій.

Тема роботи є актуальною, оскільки потрапляння в організм важких металів з навколишнього середовища чинить негативний вплив на АТР-гідролазну активність скоротливих протеїнів і енергетичні процеси в міоцитах. Водночас вивчення порушень скоротливої активності міометрія, викликаних різними факторами, наразі повинне зайняти важливе місце в біохімічних і молекулярно-біологічних студіях. Це обумовлено особливим його значенням серед інших гладеньких м'язів у зв'язку зі специфічною функцією за вагітності та пологів.

Необхідним є пошук потенційних фармакологічних сполук, здатних усувати негативні впливи важких металів на скоротливий апарат міометрія та спрямованих на нормалізацію порушень його контрактильної функції. Останнім часом значна увага дослідників приділяється калікс[4]аренам та їхнім похідним тіакалікс[4]аренам, які є малотоксичними, здатні проникати крізь плазматичну мембрану і спроможні утворювати супрамолекулярні комплекси з біологічно важливими молекулами та іонами.

Отже, з'ясування біохімічних механізмів негативного впливу іонів важких металів на скоротливу активність міометрія та пошук шляхів його корекції із застосуванням тіакалікс[4]аренів є актуальними питаннями сучасної біохімії.

В ході виконання дисертаційної роботи було показано, що катіони важких металів інгібують АТРази активність субфрагмента-1 міозину міометрія. Набільш помітний інгібувальний ефект спостерігався за дії свинцю та кадмію. Було встановлено, що тіакалікс[4]арен С-800 ефективно відновлював активність АТРази міозину за дії катіонів важких металів. Застосування засобів комп'ютерного моделювання дозволило зробити припущення, що механізм захисної дії тіакалікс[4]арену базується на його здатності хелатувати катіони важких металів із середовища інкубації. На підставі результатів застосування метода комп'ютерного докінгу було висунуто гіпотезу, що тіакалікс[4]арени можуть «відтягувати» катіони важких металів з їх сайтів зв'язування у субфрагменті 1 міозину. Надалі було з'ясовано вплив катіонів важких металів на енергетичне забезпечення клітин міометрія. Зроблено припущення, що посилене утворення клітинами гладенького м'язу матки формагану з солей тетразолію може бути пов'язаним з порушенням функціонування НАДН-дегідрогеназного комплексу мітохондрій за впливу важких металів. Було встановлено, що під впливом свинцю та кадмію відбувалось посилене утворення активних форм кисню в міоцитах та змінювалась аутофлуоресценція НАДН та ФАД в ізольованих мітохондріях. Виявлена можливість використання тіакалікс[4]арену С-800 в якості селективного та чутливого флуоресцентного зонда для цинку в живих клітинах.

Наукові завдання дисертації повністю відповідають меті роботи, їхнє формулювання коректне, що сприяло успішному виконанню досліджень. Слід особливо відмітити вдале поєднання дисертанткою класичних експериментальних підходів, а також засобів біоінформатики, комп'ютерного моделювання тощо.

Отримані Вікторією Ігорівною результати є принципово новими і, без сумніву, мають важливе як наукове, так і практичне значення. Зроблені Вікторією Ігорівною висновки повністю відображають основні результати її дисертаційної роботи, які опубліковані у відкритому друці в 3 статтях і були представлені на вітчизняних і міжнародних наукових форумах.

При розгляді дисертаційної роботи виникли окремі зауваження і запитання.

Зауваження

1. Зустрічається значна кількість описок, зокрема в розділі «Анотація».
2. Чи можна вважати каліксарени сенсорами катіонів металів через їхню

високоафінну взаємодію (С. 3)? Сенсори у біотехнологічному сенсі специфічно реагують на зміну концентрації якоїсь речовини і надалі трансформують цей сигнал у відповідь, яка може реєструватися.

3. Зміни флуоресценції аденінових нуклеотидів слід виражати у відносних одиницях, а не в умовних одиницях флуоресценції.

4. Перехід від дослідження субфрагмента-1 міозина до мітохондрійної біоенергетики слабо аргументований. Те ж зауваження стосується переходу до дослідження флуоресценції тіакалікс[4]арену за присутності цинку.

5. У задачах не варто використовувати скорочення, які загально не прийняті (ВМ).

6. Необхідно розшифровувати аббревіатури за першого використання (МТТ, ГМ на С. 5).

7. НСТ-тест використовується для оцінки інтенсивності фагоцитозу, а саме окисного вибуху. Посилення формування диформазану може бути пов'язане зі збільшенням генерації активних форм кисню за дії важких металів в мітохондріях, а не за рахунок інтенсифікації роботи мітохондрійних дегідрогеназ безпосередньо. Важко пояснити стимуляцію мітохондрійних ензимів та комплексів важкими металами. Відповідні розділи роботи слід доопрацювати.

8. При згадуванні величин коефіцієнтів інгібування (С. 54) необхідно зазначити кількість незалежних експериментів.

9. На початку підрозділу 3.1 необхідно зазначити середнє значення величини АТРазної активності субфрагменту-1 міозину міометрія і порівняти її з відповідним значенням для інших об'єктів.

10. Рисунки зі стовпчиками виглядають занадто яскраво і масивно.

Запитання.

1. Чи відповідає список Ваших публікацій формальним критеріям щодо захисту кандидатських дисертацій?

2. Як співвідносяться можливі ефекти тіакалікс[4]аренів як хелаторів іонів важких металів із безпосереднім впливом на АТР-гідролазну активність субфрагменту-1 або/і електронно-транспортний ланцюг мітохондрій?

3. Чи відповідають діючі концентрації іонів важких металів, що використовувались в Вашій роботі, тим, які можуть впливати на міозин за умови навіть важкого отруєння?

4. Як Ви пояснюєте результати рис. 3,9: два інгібітори при сумісній дії втрачають свій вплив?

Втім, відмічені зауваження не знижують високу науково-практичну цінність представленої дисертації. Враховуючи актуальність теми, наукову новизну отриманих результатів, їх теоретичне і практичне значення, а також методичний рівень проведених досліджень, вважаю, що робота Яворовської Вікторії Ігорівни «Тіакалікс[4]арени – протектори АТР-гідролазної активності міозину міометрія від впливу катіонів важких металів» відповідає всім вимогам ДАК МОН України до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091-Біологія і може бути рекомендована до офіційного захисту.

Тихомиров А.О., в.о. зав. відділу хімії та біохімії ферментів, к.б.н., с.н.с.

Робота виконана на високому практичному рівні. В ній використано багато методів. Хоча вона не позбавлена, на мою думку, деяких недоліків. Вони відносяться до формулювання мети та завдання. Воно позбавляє роботу наукового пошуку. Інше зауваження стосується частина з відновленням МТТ реагенту. Результати, якої на мою думку треба переглянути.

Горидько Т.Н. д.б.н., ст.н.с.:

Я вважаю, що робота виконана на високоякісному рівні. Особливо варто відмітити поєднання класичних методів біохімії та сучасних методів, таких, як комп'ютерне моделювання.

ВИСНОВОК

про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертації Яворовської Вікторії Ігорівни на тему: «Тіакалікс[4]арени – протектори АТР-гідролазної активності міозину міометрія від впливу катіонів важких металів», поданої на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність теми:

Міометрій серед інших гладеньких м'язів відіграє виняткову роль внаслідок його унікальних функцій в репродуктивній системі жіночого організму у зв'язку з вагітністю та пологами. Порушення скоротливої функції міометрія викликає різноманітні патології у вагітних жінок: слабкість пологової діяльності, передчасні пологи та викидні. Здатність міометрія до скорочення визначається взаємодією двох основних скоротливих протеїнів актину та міозину, що утворюють актоміозиновий комплекс. Процес гідролізу АТР міозином лежить в основі скоротливої функції міометрія, тому забезпечення енергетичних потреб клітин гладеньких м'язів є надзвичайно важливим. Значну роль в забезпеченні клітин енергією у формі АТР відіграють мітохондрії завдяки процесу окисного метаболізму.

Важкі метали — велика група речовин, що забруднюють довкілля, серед них Pb та Cd є одними з найбільш токсичних. Ці елементи — дуже шкідливі для організму людини навіть у малій кількості. Особлива токсичність Pb та Cd, пов'язана з їх здатністю накопичуватись в органах та тканинах, оскільки організм людини не має ефективних механізмів їх виведення. Важкі метали здатні викликати різноманітні порушення репродуктивної системи жінок, які призводять до безпліддя, затримки статевого дозрівання, викликають гормональні порушення та онкологічні захворювання статевої системи .

Катіони важких металів здатні викликати зниження ензиматичної активності актоміозинового комплексу та АТР-гідролазної активності міозину міометрія. Катіони Cd і Pb також викликають порушення функціонування електрон-транспортного ланцюга клітини, що призводить до зниження рівня утворення АТР мітохондріями. Під їх впливом значно посилюється утворення активних форм кисню у клітинах, що призводить до окислювального стресу в клітинах та значною мірою пов'язано із токсичністю Cd²⁺ та Pb²⁺.

З огляду на значну кількість порушень в організмі жінок, які викликані впливом важких металів важливим є пошук та розробка фармакологічних сполук, які можуть усувати їх токсичний вплив. До таких потенційних сполук належать калісарени та їх сульфурвмісні похідні тіакаліксарени. Вони можуть утворювати міцні комплекси з катіонами двовалентних металів завдяки щільно розміщеним на нижньому вінці макроциклу гідроксильним групам та атомам двовалентного сульфуру. Вони здатні селективно та ефективно зв'язувати катіони важких металів та сприяти їх виведенню з організму. Це робить

тіакаліксарени перспективними для розробки лікарських засобів для усунування токсичних впливів важких металів в організмі.

Завдяки своїм властивостям утворювати супрамолекулярні комплекси з широким колом речовин каліксарени та їх похідні також є перспективними для розробки флуоресцентних хемосенсорів до катіонів різних металів.

Мета роботи: дослідити можливі захисні властивості тіакалікс[4]аренів при шкідливих впливах катіонів важких металів - Cd, Pb, Zn та Ni на АТР-гідролазну активність міозину та функціонування дихального ланцюга мітохондрій клітин міометрія.

Для досягнення поставленої мети були сформовані наступні завдання:

1. Вивчити захисні властивості тіакалікс[4]аренів від негативного впливу катіонів важких металів на АТР-гідролазну активність субфрагмента-1 міозину.

2. Дослідити захисний вплив тіакалікс[4]аренів на біохімічні показники функціонування дихального ланцюга мітохондрій міоцитів за дії катіонів ВМ.

3. З'ясувати механізми взаємодії тіакалікс[4]аренів із катіонами Zn, а також можливості застосування цих сполук в якості внутрішньоклітинних флуоресцентних зондів до Zn^{2+} .

Об'єкт дослідження: субфрагмент-1 міозину гладенького м'язу матки; міоцити міометрія; ізольовані мітохондрії ГМ клітин; Mg^{2+} -залежна АТР-гідролазна реакція; тіакалікс[4]арени.

Предмет дослідження: здатність такалікс[4]аренів відновлювати активність АТРази міозину при інгібуючому впливі катіонів важких металів; закономірності та механізм взаємодії тіакалікс[4]аренів з субфрагментом-1 міозину міометрія; здатність такалікс[4]аренів усувати негативні впливи катіонів важких металів на дихальний ланцюг мітохондрій міоцитів матки; можливість використання тіакалікс[4]аренів в якості внутрішньоклітинних флуоресцентних зондів до катіонів Zn у міоцитах матки.

Методи дослідження: ультрацентрифугування, вертикальний електрофорез в поліакриламідному гелі, колонкова хроматографія, світлова мікроскопія, конфокальна флуоресцентна мікроскопія, протокова цитофлуориметрія, культура клітин еукаріотів, МТТ-тест, ензимологічні, спектрофотометрія, спектрофлуориметрія, комп'ютерне моделювання, докінг-аналіз, біохімічна кінетика та статистичний аналіз.

Наукова новизна одержаних результатів.

У роботі вперше на прикладі міоцитів матки досліджено можливість використання тіакалікс[4]аренів в якості хелатуючих агентів в живих системах. Зокрема, методом флуоресцентної мікроскопії показана здатність тіакалікс[4]аренів проникати всередину клітин міометрія. Методом МТТ-тесту виявлена здатність тіакалікс[4]арену С-800 знижувати негативний вплив катіонів Cd та Pb на дихальний ланцюг мітохондрій клітин міометрія, а саме НАДН-дегідрогеназу мітохондрій тому, що реакція відновлення МТТ реагенту відбувається переважно за рахунок ензимів та носіїв електронів мітохондрій.

Вперше встановлено, що тіакалікс[4]арени усувають інгібувальний

вплив катіонів Cd, Pb, Zn та Ni на АТРазу субфрагмента-1 міозину. З використанням методу комп'ютерного моделювання були запропоновані можливі механізми усунування тіакалікс[4]аренами негативних впливів Cd²⁺, Pb²⁺ та Zn²⁺ на субфрагмент-1 міозину. Результати молекулярного докінгу тіакалікс[4]аренів С-798 та С-800 показали можливість взаємодії функціональних груп цих тіакалікс[4]аренів з катіоном Zn в ділянці, яка наближена до АТР-гідролазного центру субфрагмента-1 міозину, за умови зв'язування катіону Zn²⁺ з протеїном.

Методами спектрофлуориметрії та флуоресцентної мікроскопії виявлена можливість використання тіакалікс[4]арену С-800 в якості чутливого та селективного флуоресцентного зонда до катіонів Zn. Показано, що флуоресценція тіакалікс[4]арену С-800 збільшувалася в клітинах міометрія, інкубованих з Zn²⁺. Вона залежала від їх концентрації та часу інкубації. Для встановлення механізмів посилення флуоресцентних властивостей тіакалікс[4]арену С-800 катіонами Zn та особливостей їх взаємодії в комплексі було проведено комп'ютерне моделювання. Було показано, що катіони Zn зв'язуються на верхньому вінці макроциклу атомами кисню гідроксидофосфонілметильних груп. При цьому молекула тіакалікс[4]арену С-800 здатна зв'язати два Zn²⁺. Встановлено, що чотири етильні залишки гідроксидофосфонілметильних, які присутні на верхньому вінці тіакалікс[4]арену С-800 можуть відігравати важливу роль у стабілізації та врівноваженні конформації його комплексу з катіонами Zn.

Практичне значення одержаних результатів.

Результати, що були одержані, перспективні для подальшого розглядання використання тіакалікс[4]аренів в якості хелатуючих агентів в медицині. Особливо, беручи до уваги відносно нешкідливість та низьку імуногенність каліксаренів.

З'ясована можливість застосування тіакалікс[4]арену С-800 в якості чутливого та селективного флуоресцентного зонда до Zn²⁺, що може мати значення для подальших досліджень ефектів цього катіону в живих клітинах тому, що катіони Zn мають важливе значення для забезпечення життєдіяльності клітин та організму людини. Більше того, катіони Zn шкідливі у надлишковій кількості, тому моніторинг вмісту цих іонів в клітині може мати важливе практичне та теоретичне значення.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота – завершене дослідження, яке було здійснене автором відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих і виконаних протягом 2016 – 2020 р.р. Дисертантом, спільно з науковим керівником акад НАНУ, проф. Костеріним С.О. та старшим науковим співробітником, к.б.н. Лабинцевою Р.Д. сформульовані головні задачі дослідження та розроблено методи його проведення. Підбір, систематизація, аналіз та узагальнення літературних даних було проведено дисертанткою особисто. Нею особисто виконані більшість експериментальних досліджень за винятком деяких експериментів, які були проведені спільно з співробітниками відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ к.б.н. Лабинцевою Р.Д. та Пугач А.Я., що відображено в

спільних публікаціях. Результати теоретичних досліджень комп'ютерного моделювання виконані у співпраці із науковим співробітником відділу біохімії м'язів к.б.н. Бевзою О.В. Аналіз власних експериментальних результатів, їх узагальнення, інтерпретація та формування основних положень і висновків роботи проведено спільно із науковим керівником та к.б.н. Р.Д. Лабинцевою. Автор приймав активну участь у написанні та підготовці до друку усіх статей та тез доповідей, що вийшли за темою дисертаційної роботи. Всі розділи роботи та її автореферат написані самостійно дисертанткою.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, що викладені в дисертації, були представлені на міжнародних та українських наукових конференціях: XII Український біохімічний конгрес (Тернополь, 2019); VII International research and practice conference "Nanotechnology and Nanomaterials" (Львів, 2019); Eastwest Chemistry Conference (Львів, 2018); V International research and practice conference "Nanotechnology and Nanomaterials" (Чернівці, 2017). Результати експериментів також систематично доповідались та обговорювались на наукових семінарах відділу біохімії м'язів та засіданнях Вченої Ради Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (2017-2020 рр.)

За результатами дисертації опубліковано 2 статті у фахових наукових журналах та глава в монографії.

Статті у наукових виданнях інших держав, які входять до міжнародних наукометричних баз даних:

1. Labyntseva R, **Yavorovska V**, Bevza A, Drapailo A, Kalchenko V, Kosterin S. Thiocalix[4]arene-tetraphosphonate Eliminates Inhibitory Effects of Heavy Metals on Smooth Muscle Myosin S1 ATPase Activity. World Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 2018; 3(2): 46-54. *(Дисертантка брала участь у виконанні експериментальної частини дослідження, взяла активну участь у аналізі її результатів, написанні та оформленні статті).*

2. Labyntseva RD, **Yavorovska VI**, Bevza OV, Drapaylo AB, Kalchenko VI, Kosterin SO. Thiocalix[4]arenes remove the inhibitory effects of Zn cations on the myosin ATPase activity. Nanoscale Research Letters, 2018; 13(1):224. doi: 10.1186/s11671-018-2630-2. *(Дисертантка взяла участь у виконанні експериментальної частини досліджень, взяла активну участь у аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті).*

3. Labyntseva RD, **Yavorovska VI**, Bevza OV, Kalchenko VI, Kosterin SO. Calix[4]arenes as the effectors of smooth muscle myosin ATPase. "Myosin: Biosynthesis, Classes and Function", Nova Science Publishers, Inc. (USA). 2018. 89-135. *(Дисертантка брала активну участь у аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні глави в монографії).*

Тези наукових доповідей:

1. **V. Yavorovska**, R. Labyntseva. Tetrahydroxythiocalix[4]arene-tetraphosphonate Remove Inhibitory Effects of Pb and Cd Cations on Myosin ATPase Activity. EastWest Chemistry Conference, Lviv Polytechnic National University, October 10-

12, Lviv, 2018: 143.

2. **Yavorovska V. I.**, Labyntseva R.D. Protective influence of thiacalix[4]arenes on myosin ATPase activity against inhibitory effects of Zn^{2+} . V International research and practice conference “Nanotechnology and Nanomaterials” (NANO-2017) Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University, 23-26 August 2017, Chernivtsi, Ukraine: 662.

3. **Yavorovska V.I.**, Labyntseva R.D., Bevza O.V. A selective and sensitive fluorescent sensor: thiacalix[4]arene C-800 for Zn ions. Medical and Clinical Chemistry 21; 3(80):292-293.

4. Puhach A., **Yavorovska V.I.**, Labyntseva R.D. Thiacalix[4]arene C-800 as selective and sensitive fluorescent sensor for Zn ions. VII International research and practice conference “Nanotechnology and Nanomaterials” (NANO-2019), Lviv Polytechnic National University, 27-30 August 2019, Lviv, Ukraine:331.

5. Puhach A., **Yavorovska V.I.**, Labyntseva R.D. Thiacalixarene C-800 as a potential molecular tool for Zn^{2+} level measurement. VIII International Conference “Medical physics – the current status, problems, the way of development. Innovation technologies”, September 26-27, 2019, Kyiv, Ukraine. P.210-211.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота викладена на 147 сторінках машинописного тексту та включає розділи: вступ, огляд літератури, методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення, заключний розділ, висновки та список використаних джерел, який містить посилання. Робота ілюстрована 32 рисунками. Список використаних джерел охоплює 307 найменування.

Характеристика особистості здобувача. Яворовська Вікторія Ігорівна, 1986 р.н., закінчила ННЦ «Інститут Біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у 2012 р., де одержала звання “магістра” та спеціальність “загальна та молекулярна генетика”. З 2016 по 2020 рр. Яворовська В.І. була співробітником Інституту, а з 2016 по 2020 роки являлась аспірантом відділу біохімії м’язів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна. Вона є ініціативним, цілеспрямованим, доброзичливим, працьовитим, наполегливим науковцем, постійно вдосконалює свій науковий рівень, користується авторитетом та повагою своїх колег.

Оцінка мови та стилю дисертації. Дисертацію написано грамотною українською мовою, стиль викладення матеріалу відповідає прийнятому в науковій літературі.

Відомості щодо проведення біоетичної експертизи. Дисертація виконана з дотриманням всіх біоетичних вимог (протокол №1 засідання комісії з біоетики і біобезпеки Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України від 14 січня 2021 р.).

Рекомендація дисертації до захисту. Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 091 «Біологія» Яворовської Вікторії Ігорівни на тему: «Тіакалікс[4]арени – протектори АТР-гідролазної активності міозину міометрія від впливу катіонів важких металів» є завершеною науковою працею, що виконана здобувачем особисто, а також має наукову новизну,

теоретичне та практичне значення.

Робота Яворовської В.І. відповідає вимогам п. 10 постанови «Про проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії», затвердженої Кабінетом Міністрів України від 6 березня 2019 р. №167 і може бути рекомендована до офіційного захисту на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

Рецензенти:

Голова засідання,
старший науковий співробітник
відділу біохімії ліпідів
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України
кандидат біологічних наук

Г.В. Косякова

Доктор біологічних наук,
провідний науковий співробітник
відділу біохімії м'язів
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України

Данилович Ю.В.



Підпис Косякової В.І. та
ЗАСВІДЧУЮ Данилович Ю.В.
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна
національної академії наук України
"27" 08 20 19 р.