

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертацію Труша В'ячеслава Володимировича

“Інгібування протеїнтирозинфосфатази 1В фосфонатними похідними калікс[4]аренів”,

подану на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія

Дисертаційна робота В.В. Труша присвячена дослідженню різних аспектів біологічної активності інгібіторів протеїнтирозинфосфатази 1В похідними калікс[4]аренів, що містять замісники фосфонатного типу. Не викликає жодних сумнівів актуальність теми представленої роботи. Відомо, що регуляція сигнальних шляхів клітини відбувається в першу чергу за рахунок специфічного фосфорилування чи дефосфорилування певних білків, за що відповідають ферменти – відповідно кінази та фосфатази. В цих процесах беруть участь переважно гідрокси-амінокислоти в складі білків-мішеней – серин і тирозин. Специфічна регуляція активності відповідних ферментів, у тому числі родини тирозинфосфатаз, може забезпечити можливість тонкого і глибокого впливу на численні клітинні процеси. Зокрема, інгібування ферментів цього класу може бути шляхом лікування діабету типу II, ожиріння та ряду інших патологій. Тому інгібітори тирозинфосфатаз останнім часом широко вивчаються в медичній хімії як терапевтичні засоби, а також як інструменти біохімічних і молекулярно-біологічних досліджень.

Сполуки, що вивчалися в роботі, поєднують два ключових структурних елементи – корову каліксаренову частину й замісники фосфонатного типу. Добре відомо, що фосфонатні ліганди як ізотери фосфатів часто здатні селективно зв'язуватися з ферментами, задіяними у процесах фосфатного обміну, проте не метаболізуються останніми, виступаючи таким чином у ролі інгібіторів.

З іншого боку, каліксарени – цікавий клас сполук, що можуть служити зручною молекулярною платформою для дизайну нових структур селективних інгібіторів ферментів та інших біологічно активних речовин. В першу чергу важливо відзначити широкі можливості хімічної модифікації каліксаренового макроциклу: з одного боку, конформаційно це досить жорстка структура, з іншого ж в неї можна вволити широке коло різноманітних замісників. Це дозволяє отримати 3-мірні молекулярні структури з заданим розміщенням фармакофорних груп, що забезпечує можливість їхньої високоспецифічної взаємодії з біологічно важливими макромолекулами.

Виходячи з цього, дослідження біологічної активності нових фосфонатних похідних калікс[4]аренів є актуальним завданням, цікавим з наукового погляду і одночасно практично важливим.

Дисертація загальним обсягом 125 стор. побудована за традиційною схемою і складається зі вступу, шести розділів, заключної частини, висновків і списку літератури.

Літературний огляд присвячено протеїнтирозинфосфатазам, їхній ролі в біохімічних процесах, інгібіторам а також ферментів даного класу. Розглянуто різні структурні та функціональні типи інгібіторів. Вказані питання розглянуто достатньо повно. Список літератури містить 149 назв, при цьому понад 30 із них, тобто п'яту частину, опубліковано після 2010 р. Це хороший показник, що свідчить про те, що дисертант добре знайомий з останніми досягненнями у своїй області досліджень.

В експериментальній частині дисертації (розділ 2) наведено детальні методики досліджень, що використовувалися в роботі.

Основні результати дисертації представлено в розділах 3-6.

В роботі використано широкий арсенал адекватних методів досліджень, зокрема, біохімічні методи ферментативної кінетики. Кінетичні експерименти виконано на високому рівні, з використанням достатньої кількості незалежних повторів та статистичної обробки даних. Останнє дуже важливо для робіт, пов'язаних із дослідженням біологічних об'єктів.

В роботі вперше встановлено інгібувальну активність сполук класу фосфонат-заміщених каліксаренів щодо протеїнтирозинфосфатази 1В *in vitro*, причому деякі сполуки, крім високої активності, виявляють і селективність до своєї мішені порівняно з іншими ферментами родини тирозинфосфатаз. Визначено величини IC_{50} інгібіторів, а також константи інгібування. При цьому виявляється, що похідні тіакалікс[4]арену є активнішими інгібіторами порівняно з каліксареновими аналогами. В ряді випадків було визначено й термодинамічні характеристики взаємодії білок-ліганд.

З кінетичних кривих і термодинамічних даних зроблено коректні висновки щодо можливого механізму зв'язування сполук з активним центром фермента, а також альбуміном.

Заслуговує на особливу увагу широке застосування в роботі методів комп'ютерного моделювання, в першу чергу докінгу, які поступово стають обов'язковими для досліджень взаємодії біомолекул із лігандами. Побудовано моделі зв'язування сполук в активному центрі фермента.

Важливо, що докінг лігандів проводили паралельно у структури фермента з відкритою й закритою конформацією WPD-петлі. У всіх випадках результати моделювання, отримані для закритої конформації, краще корелювали з експериментальними даними щодо біологічної активності. Це може свідчити про те, що саме ця конформація переважно й реалізується у водному середовищі.

Звичайно, лише прикрасило б роботу застосування підходів молекулярної динаміки, про що буде сказано нижче.

Досліджено взаємодію тіакалікс[4]аренів з сироватковим альбуміном, для чого використовували флуоресцентну спектроскопію. Було визначено константи Штерна-Вольмера та зроблено висновки про можливий механізм зв'язування ліганд-білок та стехіометрію процесу. Визначено термодинамічні параметри зв'язування кількох лігандів з альбуміном (ΔH , ΔG , ΔS), на основі чого зроблено цілком переконливі висновки про можливий характер взаємодії – переважання в комплексоутворенні різних лігандів гідрофобних, Ван-дер-Ваальсових взаємодій чи водневих зв'язків.

Таким чином, в представленій дисертаційній роботі вперше досліджено біологічну активність інгібіторів протеїнтирозинфосфатаз на основі фосфонатних похідних каліксаренів та тіакаліксаренів. Отримано численні кількісні параметри, що стосуються біологічної активності сполук та ферментативних реакцій. Досліджено також механізми біологічної дії інгібіторів, зокрема, їхнє зв'язування з ферментом. Все це становить значний науковий інтерес для біоорганічної хімії та біохімії та відзначається безумовною науковою новизною.

Разом з тим, робота має й очевидне практичне значення. В першу чергу слід відзначити, що автором знайдено ряд ефективних інгібіторів, активних *in vitro* в низьких мікромольних чи навіть субмікромольних концентраціях. Це свідчить про перспективність досліджень інгібіторів тирозинфосфатаз та інших подібних ферментів на основі макроциклічної молекулярної платформи калікс[4]арену. В ширшому контексті отримані в роботі результати можуть бути основою для дизайну нових лікарських засобів, зокрема, для терапії діабету й онкологічних захворювань.

Безумовно, дисертаційна робота не позбавлена й певних недоліків. Серед них можна відзначити наступні.

Розділ 6, який присвячений дослідженню взаємодії тіакалікс[4]аренів із сироватковим альбуміном, стоїть дещо осторонь від основної теми роботи й безпосередньо не пов'язаний з проблемою інгібування фермента. Звичайно, альбумін є дуже важливим транспортним білком, і аналіз його взаємодії з потенційними медичними засобами важливий для вивчення їхньої біодоступності, фармакокінетики й фармакодинаміки. Проте автором недостатньо обґрунтовано включення в дисертацію даного розділу (де представлено цікаві результати).

Недостатньо детально описано методики проведення докінгу, не вказано параметри процедур. В авторефераті (с. 5) говориться, що способи зв'язування інгібіторів вивчали за допомогою, зокрема, програми PdbViewer. Це не зовсім зрозуміло, оскільки PdbViewer – це, власне, інструмент візуалізації структур, а не моделювання/симуляції. В дисертації ж дане коректне формулювання – вказано, що ця програма використовується “для аналізу обраних моделей докінгу” (с. 46).

В роботі використано кристалографічні структури фермента, причому з великого набору відомих структур, представлених в Protein Data Bank, взято лише

деякі, які “найкраще узгоджувались з результатами досліджень інгібувальної активності” (автореферат, с. 5). Не пояснено, як конкретно робився такий відбір.

Крім того, добре відомо, що кристалографічні структури біомакромолекул жорсткі й отримані в неприродних для них безводних умовах, а тому більшою чи меншою мірою відрізняються від реальних структур, що існують у воді. Якщо відсутні повні дані щодо структур білків у розчині, отримані за допомогою ЯМР, то необхідно спершу проводити оптимізацію кристалографічних структур за допомогою молекулярної динаміки чи, якщо дозволяють обчислювальні ресурси, квантово-хімічних методів. Подібна оптимізація в роботі не проводилась.

При дослідженні гасіння флуоресценції альбуміну лігандами не зроблено висновку, який же флуорофор білка переважно задіяний у процесі – тирозин чи триптофан. Використано лише збудження при 280 нм, що індукує флуоресценцію обох вказаних амінокислот. На жаль, не використано можливість селективного збудження триптофану при 295-296 нм. Якби паралельно проводили збудження емісії білка при цій довжині хвилі, можна було би встановити роль в гасінні лише триптофану, що могло б дати цінну інформацію про сайти зв'язування лігандів.

Графіки Лайнуівера-Берка всюди підписано так: “Інгібування фермента таким-то інгібітором”. Коректніше було б називати такі графіки “залежність швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату”.

У висновках (можливо, у преамбулі до них) слід було б зазначити, що в роботі знайдено інгібітори фермента, активні в мікро- та субмікромолярних концентраціях. Це тільки підсилює їх. У висновках варто було прямо вказати і виявлений тип інгібування (конкурентний).

Дисертація й автореферат написані гарною мовою. Ми знаходимо дуже мало літературних огріхів чи не зовсім вдалих, на наш погляд, формулювань типу “штучні субстрати” (с. 41), “буфер вміщував” (замість “містив”, с. 42), “механізм повільного облаштування інгібітора в активному центрі” (с. 72 та ін.), тощо.

Вказані недоліки не є суттєвими і жодним чином не знижують загального високого рівня дисертаційної роботи.

Висновки чітко сформульовані та відображають основний зміст роботи й отримані в ній результати. Зміст автореферату повністю відповідає змістові самої дисертації. При цьому не викликає сумнівів достовірність науково обґрунтованих результатів, отриманих із використанням сучасних методів досліджень і обробки даних.

Результати дисертаційної роботи повністю опубліковані. Серед публікацій – стаття в науковому збірнику та 5 статей у провідних фахових журналах, у т.ч. міжнародних із високим імпаکت-фактором, таких як *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* чи *Organic and Biomolecular Chemistry*. Матеріали було також представлено на 6 наукових конференціях. Публікації свідчать про високий рівень виконаної роботи й отриманих результатів.

Важливо зазначити, що автором отримано і 2 патенти України на винахід, що підтверджує практичне значення даної дисертації.

Як дисертація, так і автореферат добре оформлені, відзначаються якісною графікою, схеми й рисунки чіткі та зрозумілі.

Отже, у роботі В.В. Труша всебічно, на високому експериментальному й теоретичному рівні, досліджено проблеми біологічної активності похідних калікс[4]аренів як інгібіторів протеїнтирозинфосфатази. На нашу думку, автором успішно досягнута поставлена в роботі мета.

Великий обсяг проведених досліджень, безсумнівна наукова новизна та вагоме практичне значення отриманих результатів свідчать про те, що представлена дисертація є завершеною науковою працею на актуальну тему та становить собою важливий внесок в біоорганічну хімію, а також суміжні науки, зокрема, в дослідження інгібіторів ферментів і механізмів їхньої дії.

Виходячи з цього, вважаю, що дисертаційна робота “Інгібування протеїнтирозинфосфатази 1В фосфонатними похідними калікс[4]аренів” повністю відповідає сучасним вимогам, що висувуються до кандидатських дисертацій, а її автор, В’ячеслав Володимирович Труш, цілком заслуговує присвоєння наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія.

Офіційний опонент
завідувач відділу синтетичних біорегуляторів
Інституту молекулярної біології і генетики
НАН України, д.х.н.

І.Я. Дубей

