

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Труша В'ячеслава Володимировича „Інгібування протеїнтирозинфосфатази 1В фосфонатними похідними калікс[4]аренів”, представлену на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія.

Актуальність теми. Дисертаційна робота Труша В.В. присвячена важливому напрямку сучасних досліджень в біоорганічній хімії – пошуку селективних та ефективних інгібіторів ферментів. Актуальність роботи в першу чергу визначається вибором як мішеней одних з ключових регуляторів сигнальних шляхів – протеїнтирозинфосфатаз (РТРаз), які ідентифіковані в кількості більше сотні і які впливають на перебіг багатьох фізіологічних процесів завдяки дефосфорилуванню тирозинових залишків певних білків, що впливає на їх активність. В.В. Трушом було досліджено ряд таких РТРаз, серед яких основну увагу було приділено протеїнтирозинфосфатазі 1В. Це цитоплазматичний ензим, надлишкова експресія (і активність) якого ведуть до розвитку ракових хвороб, діабету та ожиріння.

Мета та завдання дисертаційної роботи сформульовані чітко. У відповідності з ними головну увагу було приділено вивченню інгібуючої дії на РТРази ряду макроциклічних похідних: гідроксифосфонових, кетофосфонових, гідроксиметиленбісфосфонових та метиленбісфосфонових кислот на калікс[4]ареновій платформі та метиленфосфонових кислот та їх моноалкільних естерів на платформах тіакалікс[4]арену та калікс[4]арену. Також вивчались термодинамічні аспекти зв'язування фосфонатних похідних каліксаренів з РТР1В та людським сироватковим альбуміном (ЛСА).

Робота була частиною науково-дослідних робіт відділу механізмів біоорганічних реакцій Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України в рамках таких проектів: тема 2.1.10.13-10 "Пошук і модельні дослідження потенційно біоактивних сполук", № держреєстрації 0110U000375; тема 5.18.2.8 "Дослідження фізико-хімічних властивостей і біоактивності синтетичних нанорозмірних макроциклічних об'єктів та їх функціоналізованих похідних щодо терапевтично важливих білкових мішеней *in vitro*", № держреєстрації 0112U004108; тема 2/03-13 "Молекулярний дизайн, синтез і дослідження інгібіторів протеїнтирозинфосфатаз як потенційних лікарських засобів проти цукрового діабету та інших захворювань", № держреєстрації 0113U005097. У зв'язку з цим, важливість та актуальність даної теми як з теоретичної, так із практичної сторони не викликає жодних сумнівів.

Наукова новизна та практичне значення отриманих результатів. У роботі вперше встановлено інгібуючу здатність та закономірності впливу метиленбісфосфонових, метиленфосфонових,  $\alpha$ -гідроксиметиленбісфосфонових,  $\alpha$ -гідроксиметилфосфонових і  $\alpha$ -

кетофосфонових похідних калікс[4]аренів на ряд людських протеїнтирозинфосфатаз. Знайдено нові ефективні інгібітори РТР1В, що можуть виявляти селективність у порівнянні з іншими протеїнтирозинфосфатазами, такими як ТС-РТР, CD45, SHP2, MEG2, MEG1 та LAR-РТР. З'ясовано кінетичні особливості та механізми інгібування РТР1В фосфонатними інгібіторами на калікс[4]ареновій платформі. Виявлено, що процес облаштування інгібітора в активному центрі РТР1В узгоджується з одно- або двостадійним механізмом повільного зв'язування. На основі експериментальних даних та молекулярного докінгу показана роль біоізостерних замісників та макроциклічної платформи в механізмах утворення фермент-інгібіторного комплексу. Продемонстровано, що метилфосфонатні похідні на платформі тіакалікс[4]арену виявляють сильнішу інгібуючу здатність стосовно РТР1В у порівнянні з калікс[4]ареновими аналогами. Вперше встановлено, що похідні тіакалікс[4]аренів з ковалентно зв'язаними моноестерними залишками фосфонових кислот здатні ефективно і селективно пригнічувати РТР1В зі значеннями констант інгібування в субмікромольному діапазоні. За допомогою спектрофлуориметричного методу вперше показано здатність калікс[4]арен- та тіакалікс[4]аренфосфонових кислот взаємодіяти з людським сироватковим альбуміном. Очевидно, ці та інші вперше опубліковані автором результати дисертаційного дослідження створюють підґрунтя для дизайну високоефективних та селективних інгібіторів протеїнтирозинфосфатаз, а з огляду на систематичні дослідження відділу механізмів біоорганічних реакцій, в якому виконана дисертаційна робота, і для створення каліксаренових регуляторів активності інших фосфатаз. Одержані результати можуть бути використані для пошуку і можливої подальшої розробки нових лікарських засобів, зокрема, для лікування діабету 2 типу, ожиріння та раку.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень і висновків здобувача. Наукові положення обґрунтовані наявним експериментальним матеріалом. На отриманих результатах базуються і зроблені висновки. Автор дисертації провів систематичне дослідження впливу гідрокси-, кето-, гідроксиметилбіс-, та метиленбісфосфонових кислот на калікс[4]ареновій платформі і метиленфосфонових кислот та їх моноалкільних естерів на платформах тіакалікс[4]арену і калікс[4]арену на гідролазну активність ряду людських РТРаза (ТС-РТР, CD45, SHP2, MEG2, MEG1, LAR-РТР та РТР1В). Також слід відзначити дослідження зв'язування тіакаліксаренфосфонові кислоти та її моноетилового естеру з людським сироватковим альбуміном. Представлені в роботі дані достовірні, експерименти повторювались, а для  $IC_{50}$  та констант інгібування подано значення стандартних відхилень.

Дисертаційна робота викладена на 125 сторінках машинописного тексту, і складається із вступу, розділу, присвяченому огляду літератури, розділу щодо матеріалів та методів, трьох розділів власне досліджень впливу каліксаренфосфонових кислот на РТРази і розділу з вивчення взаємодії тіакаліксаренфосфонатів з ЛСА, заключної частини, висновків та списку

використаних літературних джерел (149 найменувань). Дисертація містить 13 таблиць, 4 схеми та 39 рисунків.

Вступ за змістом і об'ємом повністю відповідає існуючим вимогам.

В першому розділі (огляд літератури „Інгібітори протеїнтирозинфосфатаз. Структура та активність”) автор послідовно і критично аналізує стан літератури до початку 2015 року, щодо піднятої наукової проблеми, акцентує увагу на перспективах створення нових інгібіторів, в тому числі на платформі каліксаренів. В цілому огляд побудований на вдало класифікованому і значному фактичному матеріалі, формуючи враження про дисертанта як кваліфікованого дослідника.

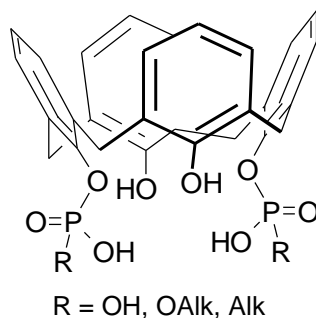
Другий розділ присвячено опису матеріалів дослідження і методів, що були використані. Слід відмітити, що такі дослідження є технічно непростими, достатньо дорогими і, безперечно, здобутком дисертанта є опанування прийомами роботи з препаратами ферментів та білків. З іншого боку, В.В. Труш показав, що може також використовувати спектрофотометричний і спектрофлуориметричний методи, кінетичні обрахунки, молекулярний докінг, статистичний аналіз.

В наступних розділах наведено результати виконаних біоорганічних досліджень. В третьому розділі показано, що монозаміщені каліксаренбісфосфонові кислоти краще зв'язуються та інгібують активність РТРаз, ніж каліксарени з двома такими групами. Отримані значення  $IC_{50}$  добре узгоджуються з розрахованими енергіями утворених комплексів. В четвертому розділі автор досліджує менш об'ємні  $\alpha$ -гідрокси- та  $\alpha$ -кетосфосфонові кислоти. Серед них знайдено каліксарен 4.1, вискоефективний інгібітор РТРази CD45, який на жаль не був досить селективним відносно РТР1В фосфатази. В цілому ж введення другої фосфонокислої групи і тут не приводить до збільшення інгібуючого ефекту, а самі каліксарени в середньому дещо гірше інгібують активність всіх РТРаз. В наступному розділі досліджувались метиленфосфонові кислоти на платформі тіакалікс[4]арену та калікс[4]арену та моноалікільні естери на тіакалікс[4]ареновій платформі. Вибір наступних об'єктів був закономірний з огляду на високу інгібуючу здатність таких кислот на активність РТРази з Єрсинії. І тут було ідентифіковано тіакаліксарен 5.3 з дуже високим параметром інгібуючої дії на РТР1В ( $IC_{50}$  0,32 мкМ) і досить значною селективністю по відношенню до інших фосфатаз. Слід відзначити, що цей макроцикл приблизно в 15 разів гірше пригнічує активність фосфатази ТСРТР, яка є надважливою при ембріональному розвитку. Для найактивних каліксаренів було проведено серію досліджень з визначення констант інгібування ( $K_i$ ), незалежного параметру, за яким порівнюють інгібувальну дію сполук. Для каліксарену 5.3 як найсильнішого з ряду вивчених сполук інгібітора РТРВ1  $K_i$  становить 0,12-0,15 мкМ.

Дослідження модельних біоорганічних процесів зв'язування ЛСА з тіакалікс[4]арен-тетракіс-метилфосфоновою кислотою 5.2 та її тетра(моно)етиліновим естером 5.3 винесені в окремий шостий розділ. З використанням флуоресцентного методу було знайдено константи зв'язування ліганду в комплекс ЛСА-каліксарен ( $K_b$ ) та обраховано вільні енергії утворення, а також ентальпії та ентропії утворення даних асоціатів. Автором знайдено, що зв'язування сильно залежить від температури і  $K_b$  досягає значень  $10^5$  л/моль, що є дуже високим для взаємодій такого роду у водних розчинах.

В заключній частині роботи ще раз проаналізовано отримані результати та зроблено деякі важливі акценти. Так, показано наступництво в проведенні наукових робіт, які були розпочаті у відділі більше десяти років тому з дослідження лужних фосфатаз, проаналізовано зв'язки між будовою та активністю вивчених каліксаренів, їхню вибірковість при інгібуванні різних фосфатаз.

До роботи можна додати побажання, яке було б недоцільно виносити у зауваження: дуже цікавим було б дослідити каліксарени з фосфатними та фосфонатними групами на нижньому вінці макроциклу, адже вони будуть найбільш схожими на фосфотирозинові фрагменти субстратів даних РТРаз.



Зауваження та загальна оцінка роботи. Необхідно зазначити, що наукові положення, висновки, практичні рекомендації, які сформульовані в дисертації цілком обґрунтовані і не викликають сумнівів. Це підтверджується результатами ретельно виконаних експериментальних досліджень інгібуючої дії каліксаренфосфонової кислот на ряд РТРаз, які доповнені комплексними розрахунками констант інгібування та докінгу найбільш сильних інгібіторів в активний сайт ензиму. Важливим є також комплексне дослідження комплексів ЛСА-каліксарени методами спектрофлуориметричного аналізу, однак, авторові варто було б детальніше обґрунтувати доцільність такого розділу.

У літературному огляді наведено дані щодо класифікації РТРаз та про механізми їх каталітичної активності. Проаналізовано відомі інгібітори цих ферментів, в тому числі окремо наведено інгібітори РТР1В. Але серед представлених сполук не показано чи існують інгібітори РТР1В та інших РТРаз на основі макроциклів (циклодекстринів, порфіринів, каліксаренів та інших) та на основі вуглецевих наноструктур (фулеренів, нанотрубок та

інших). З огляду на об'єкти дослідження в даній роботі така інформація була б цікавою і дуже важливою.

У розділі 6, присвяченому дослідженню взаємодії тіакаліксаренів 5.2 і 5.3 з ЛСА, визначено константи зв'язування та Штерна-Фольмера за допомогою флуоресцентного методу. Проте, незважаючи на всі переваги цього методу, бажано було використати для кількісного та якісного аналізу асоціатів каліксарен-ЛСА й інші методи, наприклад мас спектроскопію.

Ці зауваження не торкаються основних досягнень дисертаційної роботи, яка оформлена у відповідності з діючими вимогами. Матеріали дисертації викладені в шести статтях в провідних фахових журналах та двох патентах на винахід і були представлені на шести міжнародних конференціях. Статті та тези відповідають змісту дисертаційної роботи. Наведені дані отримано вперше, всі висновки повністю відображають результати досліджень дисертанта. Автореферат роботи віддзеркалює зміст дисертації.

Вважаю, що представлена робота є закінченою науково-дослідною роботою, в якій детально обґрунтовано потенціал каліксаренфосфонових кислот як селективних інгібіторів протеїнтирозинфосфатази 1В та встановлено їх здатність зв'язуватись з ЛСА. Виконання дисертаційного дослідження значно розширює напрями біоорганічних досліджень фосфонових кислот, в тому числі на макроциклічній платформі, як інгібіторів терапевтично значимих людських протеїнтирозинфосфатаз.

Таким чином, актуальність проблеми, великий об'єм виконаних досліджень та добре сформульовані висновки, що мають як теоретичне, так і практичне значення, дають підстави стверджувати, що робота Труша В'ячеслава Володимировича „Інгібування протеїнтирозинфосфатази 1В фосфонатними похідними калікс[4]аренів” повністю відповідає вимогам ДАК України щодо дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук, а її автор заслуговує присудження даного ступеня за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія.

Офіційний опонент:

завідуючий лабораторії медико-біологічних досліджень  
відділ №5, Інституту органічної хімії НАН України  
старший науковий співробітник,  
кандидат хімічних наук



Родік Р.В.

