

# Облікова картка дисертації

## I. Загальні відомості

**Державний обліковий номер:** 0413U002276

**Особливі позначки:** відкрита

**Дата реєстрації:** 29-04-2013

**Статус:** Захищена

**Реквізити наказу МОН / наказу закладу:**



## II. Відомості про здобувача

**Власне Прізвище Ім'я По-батькові:**

1. Гребіник Сергій Миколайович

2. Grebinyk Sergii Mykolaevych

**Кваліфікація:**

**Ідентифікатор ORCID ID:** Не застосовується

**Вид дисертації:** кандидат наук

**Аспірантура/Докторантура:** так

**Шифр наукової спеціальності:** 03.00.04

**Назва наукової спеціальності:** Біохімія

**Галузь / галузі знань:** Не застосовується

**Освітньо-наукова програма зі спеціальності:** Не застосовується

**Дата захисту:** 22-04-2013

**Спеціальність за освітою:**

**Місце роботи здобувача:** Інститут екогігієни і токсикології ім. Л.І. Медведя

**Код за ЄДРПОУ:** 01897914

**Місцезнаходження:** 03680, Київ-22, вул. Героїв оборони, 6

**Форма власності:**

**Сфера управління:** Міністерство охорони здоров'я

**Ідентифікатор ROR:** Не застосовується

### **III. Відомості про організацію, де відбувся захист**

**Шифр спеціалізованої вченої ради (разової спеціалізованої вченої ради):** Д 26.001.24

**Повне найменування юридичної особи:** Київський національний університет імені Тараса Шевченка

**Код за ЄДРПОУ:** 02070944

**Місцезнаходження:** вул. Володимирська, 60, м. Київ, Київська обл., 01033, Україна

**Форма власності:**

**Сфера управління:** Міністерство освіти і науки України

**Ідентифікатор ROR:** Не застосовується

### **IV. Відомості про підприємство, установу, організацію, в якій було виконано дисертацію**

**Повне найменування юридичної особи:** Київський національний університет імені Тараса Шевченка

**Код за ЄДРПОУ:** 02070944

**Місцезнаходження:** 01033, м. Київ, вул. Володимирська, 64

**Форма власності:**

**Сфера управління:** Міністерство освіти і науки України

**Ідентифікатор ROR:** Не застосовується

### **V. Відомості про дисертацію**

**Мова дисертації:**

**Коди тематичних рубрик:** 31.27

**Тема дисертації:**

1. Продукування активних форм кисню та зміна рівня цитозольного кальцію у трансформованих Т-клітинах за дії фотозбудженого фулерену C60
2. Production of reactive oxygen species and changing of free cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration in transformed T-cells under action of photoexcited fullerene C60

**Реферат:**

1. Дисертацію присвячено дослідженню продукування активних форм кисню (АФК) та показників кальцієвого гомеостазу у клітинах з нормальним (тимоцити щура лінії Вістар) та трансформованим (лейкемічні клітини ліній МТ-4, L1210, Jurkat) геномом за дії представника вуглецевих наноструктур фулерена C60 та за умови його фотозбудження. Виявлено відмінності у мембранотропних ефектах фулерену C60 у клітинах досліджуваних типів. У тимоцитах фулерен C60 (5\*10<sup>-5</sup> М) пригнічував активність екто-АТРази у плазматичній мембрані і не впливав на Ca<sup>2+</sup> -проникність мембрани ЕПР, тоді як у клітинах МТ-4 не впливав екто-АТРазну активність, але посилював вихід Ca<sup>2+</sup> з ЕПР. Ефекти фотозбудженого фулерена C60 було оцінено у клітинах, преінкубованих упродовж 1 год з 10<sup>-5</sup>М C60 та опромінених у діапазоні 320-600 нм.

Виявлено зниження життєздатності лейкомічних клітин L1210 та Jurkat, з використанням флуоресцентних зондів DCF та індо-1 продемонстровано інтенсифікацію продукування АФК та тривале підвищення концентрації цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  у динаміці після фотозбудження фулерена C60. У тимоцитах таких ефектів виявлено не було. Показано, що система підтримання кальцієвого гомеостазу у лейкомічних клітинах L1210 та Jurkat є ремодульованою? відносна величина  $\text{Ca}^{2+}$ -пулу ендоплазматичного ретикула є меншою, а вхід  $\text{Ca}^{2+}$  катіона через плазматичну мембрану у ЕПР за ємнісним механізмом? слабкішим, ніж у тимоцитах. За дії фотозбудженого фулерену C60 ємнісний вхід  $\text{Ca}^{2+}$  у клітини L1210 та Jurkat значно посилюється, мітохондрії втрачають здатність утримувати  $\text{Ca}^{2+}$ , акумульований внаслідок його виходу з ЕПР, що призводить до неконтрольованого виходу катіона з мітохондрій у цитозоль та до дисипації мембранного потенціалу мітохондрій, вимірюного за допомогою зонду TRME. Отримані данні вказують на перспективність використання фотозбудженого фулерену C60 для впливу на систему  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналіngu та активації шляхів  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного апоптозу в лейкомічних клітинах.

2. The thesis is devoted to the study of reactive oxygen species (ROS) production and calcium homeostasis indexes in T-cells with normal (Wistar rat thymocytes) and transformed (leukemic MT-4, Jurkat, L1210 lines) genome under the influence of carbon nanostructure fullerene C60 in control and after its photoexcitation. The differences in membratotropic effects of fullerene C60 in test cells were shown. Treatment of thymocytes with fullerene C60 ( $5 \times 10^{-5}$  M) caused inhibition of ecto-ATPase activity in plasma membrane, initial velocity ( $V_0$ ) of the enzymatic reaction was decreased while the time of reaching a half-maximum velocity rate (?) was increased. Treatment of MT-4 cells was not followed by changes in ecto-ATPase activity.  $\text{Ca}^{2+}$  permeability of endoplasmic reticulum (ER) membrane was evaluated in experiments with Indo-1 loaded cells incubated in  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium followed by the addition of C60. Fullerene C60 did not influence  $\text{Ca}^{2+}$ -permeability of ER membrane in thymocytes, but in MT-4 cells caused a gradual increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . The differences revealed appear to be dependent on the rate of fullerene C60 distribution in plasma membrane and of its penetration into the cytoplasm of normal and transformed cells. With the use of fluorescent probe DCF-DA the antioxidant properties of fullerene C60 were studied in thymocytes, exposed to 0.1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  as an inducer of oxidative stress. It was shown that  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dependent ROS production was inhibited when the cells were preincubated with  $10^{-5}$  M C60. The obtained data indicate on C60 ability to prevent oxidative stress in thymocytes. Effects of photoexcited fullerene C60 were evaluated in cells treated for 1h with  $10^{-5}$  M C60 and irradiated ( $\lambda = 320-600$  nm) by mercury-vapor lamp (200 mW/cm<sup>2</sup>). It was shown that fullerene C60 exhibited cytotoxic effect against leukemic L1210 and Jurkat cells decreasing cell viability when combined with UV-visible irradiation. No phototoxic effect of fullerene C60 against thymocytes was detected. Exposure of test cells to UV-visible irradiation only was followed by insignificant increase of intracellular ROS formation. Under the combined action of fullerene C60 and irradiation the dynamic of ROS production in thymocytes was the same as that under irradiation, but in L1210 and Jurkat cells ROS production was further intensified and its level significantly exceeded the level of ROS in control. Thus, photoexcitation of fullerene C60 was shown to be accompanied by increased ROS production in leukemic cells. To elucidate the influence of photoexcited fullerene C60 on  $\text{Ca}^{2+}$  signaling system its influence on the concentration of free cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  was investigated in normal and leukemic cells. It was shown that C60 photoexcitation was followed by only transient  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevation in thymocytes while in leukemic a significant and sustained increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was detected. To determine the mechanisms of photoexcited fullerene C60 on  $\text{Ca}^{2+}$ -homeostasis  $\text{Ca}^{2+}$ -pool of endoplasmic reticulum and capacitive calcium entry into the cells were evaluated. Depletion of ER  $\text{Ca}^{2+}$ -pool was caused by addition of thapsigargin - highly effective inhibitor of ER  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. The relative value of capacitive  $\text{Ca}^{2+}$  entry was estimated as the difference between the values of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  before and after addition of 1 mM  $\text{CaCl}_2$  to the incubation medium of thapsigargin-treated cells. It was shown that the system of maintaining  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in leukemic cells is remodulated. The value of endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -pool was less and that of capacitive  $\text{Ca}^{2+}$  entry across plasma membrane into ER was significantly lower in L1210 and Jurkat cells than in thymocytes. It was demonstrated that combined action of fullerene C60 and irradiation is followed by substantial increase of capacitive  $\text{Ca}^{2+}$  entry into leukemic cells. This phenomena resulted in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase and excessive  $\text{Ca}^{2+}$ -accumulation by mitochondria of leucemic cells. It was shown that following C60 photoexcitation mitochondria of

Jurkat and L1210 cells lost their ability to retain  $Ca^{2+}$  accumulated after cation release from ER. With the use of potential-sensitive fluorescent probe TRME it was demonstrated that fullerene C60 reduced the value of mitochondrial membrane potential in leukemic cells. These data confirm the ability of fullerene C60 to penetrate into cells and to localize near or in the membranes of mitochondria. The membrane potential of mitochondria in Jurkat and L1210 was shown to be dissipated following C60 photoexcitation. The data obtained indicate the promising application of photoexcited fullerene C60 for influence on  $Ca^{2+}$ -signaling system and for induction of  $Ca^{2+}$ -dependent apoptosis in leukemic cells.

**Державний реєстраційний номер ДіР:**

**Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки:**

**Стратегічний пріоритетний напрям інноваційної діяльності:**

**Підсумки дослідження:**

**Публікації:**

**Наукова (науково-технічна) продукція:**

**Соціально-економічна спрямованість:**

**Охоронні документи на ОПВ:**

**Впровадження результатів дисертації:**

**Зв'язок з науковими темами:**

## **VI. Відомості про наукового керівника/керівників (консультанта)**

**Власне Прізвище Ім'я По-батькові:**

1. Матишевська Ольга Павлівна
2. Matyshevskya Olga Pavlovna

**Кваліфікація:** д.б.н., 03.00.04, 03.00.04

**Ідентифікатор ORCID ID:** Не застосовується

**Додаткова інформація:**

**Повне найменування юридичної особи:**

**Код за ЄДРПОУ:**

**Місцезнаходження:**

**Форма власності:**

**Сфера управління:**

**Ідентифікатор ROR:** Не застосовується

## **VII. Відомості про офіційних опонентів та рецензентів**

**Офіційні опоненти**

**Власне Прізвище Ім'я По-батькові:**

1. Костерін Сергій Олексійович
2. Костерін Сергій Олексійович

**Кваліфікація:** д.б.н., 03.00.04, 03.00.04**Ідентифікатор ORCID ID:** Не застосовується**Додаткова інформація:****Повне найменування юридичної особи:****Код за ЄДРПОУ:****Місцезнаходження:****Форма власності:****Сфера управління:****Ідентифікатор ROR:** Не застосовується**Власне Прізвище Ім'я По-батькові:**

1. Хижняк Світлана Володимирівна
2. Хижняк Світлана Володимирівна

**Кваліфікація:** д.б.н., 03.00.01, 03.00.04**Ідентифікатор ORCID ID:** Не застосовується**Додаткова інформація:****Повне найменування юридичної особи:****Код за ЄДРПОУ:****Місцезнаходження:****Форма власності:****Сфера управління:****Ідентифікатор ROR:** Не застосовується**Рецензенти****VIII. Заключні відомості****Власне Прізвище Ім'я По-батькові  
голови ради**

Остапченко Людмила Іванівна

**Власне Прізвище Ім'я По-батькові  
головуючого на засіданні**

Остапченко Людмила Іванівна

**Відповідальний за підготовку  
облікових документів**

**Реєстратор**

**Керівник відділу УкрІНТЕІ, що є  
відповідальним за реєстрацію наукової  
діяльності**



Юрченко Т.А.