

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Директор Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України
академік НАН та АМН України,
доктор біологічних наук, професор,
С.В. Комісаренко
протокол № 5 від 09.10.2024 р.р.



ВИСНОВОК

про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів
дисертації

Живоложного Артема Юрійовича

«Регуляторна роль позаклітинних везикул за умов норми та канцерогенезу»,

поданої на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії в
галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність теми дисертаційної роботи.

Протягом останніх років стало очевидним, що одну із основних ролей у міжклітинній комунікації відіграє передача сигнальних молекул за допомогою так званих позаклітинних везикул (EVs), частинок сферичної форми, що продукуються клітинами шляхом екзоцитозу та постійно секретуються в позаклітинне середовище. Везикули містять такі біомолекули як ДНК, всі відомі на сьогоднішній день типи РНК, різноманітні протеїни, ліпіди, метаболіти і т. ін. Саме тому вони можуть слугувати важливим джерелом інформації про велику кількість процесів та порушень на клітинному рівні як за умов норми, так і патогенезу низки системних захворювань людини, зокрема онкологічних. EVs залучені до контролю процесів сигналювання як між сусідніми клітинами, так і віддаленими клітинами, що забезпечується їх циркуляцією у біологічних рідинах (кров, сеча, слина, піт, фекалії тощо). Водночас, глибина вивчення EVs, що містяться в біологічних рідинах та продукуються пухлинними клітинами, все ще залишається недостатньою, що зумовлює динамічне накопичення інформації стосовно ідентифікації й з'ясування механізмів реалізації регуляторних ефектів і біологічної ролі нових маркерних біомакромолекул. Так, людський піт може мати діагностичне значення адже його збір можна проводити неінвазивно та в реальному часі. Тому, актуальним є дослідження особливостей нуклеїнового чи протеїнового

складу EVs поту людини, оскільки відповідна інформація в науковій літературі на момент початку роботи дисертанта була відсутньою. З іншого боку, на сьогодні переконливо доведено наявність кореляції між інтенсивністю продукування EVs і метастатичним потенціалом пухлинних клітин. Багаторічними дослідженнями відділу сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О.В Палладіна НАН України встановлено взаємозалежність між рівнем адаптерного протеїну Ruk/CIN85 та ступенем малігнізації пухлинних клітин. Встановлено його участь у контролі активності HIF-1 та взаємодію з протеїнами Alix і TSG101 які регулюють завантаження EVs. Відомо, що Ruk/CIN85 регулює ендцитоз рецепторів клітинних поверхонь, що є одним із етапів формування мультивезикулярного тіла. Оскільки EVs відображають фізіологічний стан клітини, яка їх секретує, то дослідження EVs, що продукуються пухлинними клітинами з різним ступенем агресивності, а, відповідно, і з відмінним рівнем Ruk/CIN85, за умов різного тиску кисню (гіпоксія, нормоксія) є актуальними з точки зору можливості використання везикул для діагностики та прогнозу розвитку онкологічних захворювань. Окремим актуальним аспектом дисертаційної роботи Живоложного А.Ю. став пошук і вдосконалення новітніх методичних підходів для ізолювання та характеристики EVs.

Мета і завдання дослідження.

Мета дисертаційної роботи: дослідити кількість, розміри, молекулярний склад та функціональні властивості EVs, ізолюваних з поту людини та кондиціонованого середовища псевдонормальних та пухлинних клітин, з'ясувати вплив нормоксії/гіпоксії й адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на зазначені показники.

Завдання дослідження:

1. Охарактеризувати склад нуклеїнових кислот, що містяться в EVs з поту людини, індукованого фізичними навантаженнями.
2. Дослідити особливості протеїнового складу EVs з поту людини, індукованого фізичними навантаженнями, та оцінити можливість використання EVs з поту як джерела потенційних протеїнових біомаркерів.
3. Проаналізувати особливості хімічного та протеїнового складу EVs, що продукуються клітинами карциноми нирки миші лінії Renca та людини лінії 786-O за умов нормоксії/гіпоксії.
4. З'ясувати вплив нормоксії/гіпоксії на кількість, розміри та склад EVs, ізолюваних з кондиціонованого середовища клітин карциноми нирки миші лінії Renca з різним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85.
5. Дослідити вплив EVs, що продукуються клітинами ембріональної нирки людини лінії HEK293 з різним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85, на клітинні відповіді *in vitro*.

6. Проаналізувати особливості протеїнового складу EVs, що продукуються клітинами ембріональної нирки людини лінії HEK293 залежно від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85.

7. Дослідити вплив EVs, ізольованих з кондиціонованого середовища аденокарциномних клітин грудної залози миші лінії 4T1 з up/down регулюванням адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на біологічні відповіді клітин 4T1 WT in vitro.

Об'єкт дослідження. Молекулярний склад та біологічні ефекти EVs, отриманих з біологічних рідин організму та кондиціонованого середовища клітин в культурі за нормальних та патологічних умов.

Предмет дослідження. Зміни протеїнового та нуклеїнового складу EVs з поту людини, індукованого фізичними навантаженнями; особливості хімічного/протеїнового складу та біологічних ефектів EVs з кондиціонованого середовища пухлинних клітин за умов впливу нормоксії/гіпоксії та змін у рівні експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85.

Методи дослідження. Дисертантом використано широкий спектр методів, а саме: біохімічні, збирання поту з верхньої частини тіла людини (рук і тулуба) після 30-хвилинних вправ на велотренажері, методи роботи з культурами клітин, отримання субліній пухлинних клітин зі стабільною надекспресією рекомбінантних протеїнів, лентивірусна shRNA технологія, ультрацентрифугування в градієнті щільності, виділення зразків EVs за допомогою комерційних наборів ExoEasy та ExoSpin, аналіз відстеження наночастинок (NTA), аналіз експресії біомаркерів EVs та кількісне визначення EVs з використанням платформи ExoView R100, електрофорез протеїнів у ПААГ та нуклеїнових кислот в агарозному гелі, Вестерн-блот аналіз, qRT-PCR, електронна мікроскопія та імуноелектронна мікроскопія, конфокальна імунофлуоресцентна мікроскопія, створення бібліотек RNA-seq методом Next-Generation Sequencing, Раманівська спектроскопія (TG-RS/TG-SERS), мас-спектрометричний аналіз протеїнового складу (LS-MS), аналіз проліферативної активності (MTT-тест та IncuCyte), дослідження міграційного потенціалу (метод заростання подряпини у клітинному моношарі та IncuCyte), дослідження інвазивності з використанням модифікованої камери Бойдена.

Наукова новизна одержаних результатів.

Вперше охарактеризовано особливості нуклеїнового складу EVs поту людини, індукованого фізичними вправами. Встановлено, що EVs поту людини містять різноманітні нуклеїнові кислоти, включаючи DNA та RNA людського і мікробного походження. Найбільш представленою була мітохондрійна DNA,

тоді як більшість ідентифікованих RNA були представлені tRNA, і меншою мірою miRNA, mRNA, snRNA, snoRNA та іншими small RNAs. Виявлено також нуклеїнові кислоти бактерій, архей і вірусів, типових для мікробіому шкіри.

Вперше охарактеризовано особливості протеїнового складу EVs поту людини, індукованого фізичними вправами. Встановлено відмінності у складі протеїнів, виявлених в різних індивідуальних зразках EVs та загального поту людини, ідентифіковані потенційні біомаркери раку та інфекційних захворювань серед протеїнів EVs поту. Показано, що альгінатний пластир може бути використаний для збору EVs людського поту з метою їх відокремлення від бактерійних EVs.

На моделі карциномних клітин нирки миші та людини вперше показано, що комплексне використання Раманівської спектроскопії (TG-RS/TG-SERS) та мас-спектрометричного аналізу (LS-MS) забезпечує глибоку диференційну оцінку діапазону розмірів наночастинок та молекулярних змін, зумовлених впливом різних факторів навколишнього середовища, таких як гіпоксія.

На моделях аденокарциномних клітин нирки миші лінії Rensa, грудної залози миші лінії 4T1, псевдонормальних клітин ембріональної нирки людини лінії HEK293 вперше продемонстровано, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 є новим компонентом EVs, який відіграє важливу роль у біогенезі везикул, регулюванні їхнього складу за різних кисневих умов середовища. Встановлено також здатність EVs з пухлинних клітин, що відрізняються за рівнем експресії Ruk/CIN85, диференційно модулювати проліферативну активність, рухливість і інвазивність клітин-реципієнтів. Мас-спектрометричним аналізом (GeLC MS/MS) вперше показано, що більшість ідентифікованих протеїнів, що диференційно експресуються в клітинах HEK293 з up-регулюванням EGFP-Ruk/CIN85 і виявляються в EVs, є метаболічними ензимами.

Теоретичне значення одержаних результатів. Отримані в ході дисертаційного дослідження дані про молекулярний склад EVs, ізольованих з пухлинних клітин, мають важливе значення для розуміння процесів, пов'язаних з канцерогенезом, їх можливим впливом на прогресію пухлинного росту, механізмами адаптації пухлинних клітин до умов гіпоксії. Результати дисертаційної роботи рекомендуються для використання в курсі «Сигнальні механізми клітин» для аспірантів на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія, за спеціальністю 091 Біологія, Біохімія.

Практичне значення одержаних результатів. За результатами проведених досліджень, Раманівську спектроскопію (TG-RS/TG-SERS) можна рекомендувати для швидкого аналізу змін у молекулярному складі EVs залежно від умов навколишнього середовища і використання різних протоколів для їх очищення. Характеристика складу EVs з поту людини свідчить про високу

індивідуальну варіабельність бактерійного складу цієї біологічної рідини та вказує на можливість її застосування як джерела для вивчення мікробіому шкіри, а самі EVs з поту можуть бути використані як джерело потенційних біомаркерів для неінвазивного моніторингу здоров'я людини.

Особистий внесок здобувача. У процесі виконання дисертаційної роботи автором особисто вибрано та проаналізовано наукову літературу за темою наукового дослідження. Дисертантом, спільно з науковими керівниками розроблено програму проведення досліджень та вибрано методи розв'язання поставлених завдань.

Дисертаційна робота була виконана у відділі сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України та лабораторії біології розвитку Університету Оулу «Laboratory of Developmental Biology, Disease Networks Research Unit, Faculty of Biochemistry and Molecular Medicine, University of Oulu and Kvantum Institute, Oulu, Finland».

Експериментальна частина дисертаційної роботи та аналіз даних проводився здобувачем особисто, за винятком експериментів, що потребували особливих знань та навичок, а також специфічного обладнання. В таких випадках дослідницька робота проводилась спільно із співробітниками відповідних установ.

Вимірювання TG-RS і TG-SERS проводилися у «VTT Technical Research Centre of Finland, Oulu, Finland» та «Institute of Photonics, University of Eastern Finland, Joensuu, Finland» спільно з PhD Martin Kögler. Мас-спектрометричний аналіз проводився у «Biocenter Oulu Mass spectrometry core facility, Oulu, Finland» спільно з Ulrich Bergmann та Hannele Härkman. Електронна мікроскопія та імуноелектронна мікроскопія проводилась спільно з Ilkka Miinalainen та Mika Kaakinen в «Biocenter Oulu Electron Microscopy core facility, Oulu, Finland». Дослідження впливу надекспресії Ruk/CIN85 на динаміку міграцій клітин Rensa та 4T1 проводились за консультацій к.б.н. Горак І.Р., к.б.н. Скатерної Т.Д., к.б.н. Худякової О.В. Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України. DNA та RNA секвенування зразків поту проводилося в «Biocenter Oulu, Sequencing core facility, Oulu, Finland». Аналіз даних DNA та RNA секвенування проводився спільно з PhD Geneviève Bart «Faculty of Biochemistry and Molecular Medicine, Disease Networks Research Unit, Laboratory of Developmental Biology, Kvantum Institute, Infotech Oulu, University of Oulu, Oulu, Finland» та PhD Daniel Fischer «Production Systems, Natural Resources Institute Finland (LUKE), Jokioinen, Finland». Результати вищезгаданих досліджень опубліковано у спільних публікаціях.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 6 основних робіт, які відповідають вимогам Постанови Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 р., з них 4 статті - у фахових іноземних виданнях, віднесених до Q1-Q2 на

дату опублікування.

1. Zhyvolozhnyi A, Samoylenko A, Bart G, Kaisanlahti A, Hekkala J, Makieieva O, Pratiwi F, Miinalainen I, Kaakinen M, Bergman U, Singh P, Nurmi T, Khosrowbadi E, Abdelrady E, Kellokumpu S, Kosamo S, Reunanen J, Röning J, Hiltunen J, Vainio SJ. Enrichment of sweat-derived extracellular vesicles of human and bacterial origin for biomarker identification. *Nanotheranostics*. 2024; 8(1):48-63. <https://doi.org/10.7150/ntno.87822> (SJR Q1

<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21100904379&tip=sid&clean=0>)

2. Samoylenko A, Kögler M, Zhyvolozhnyi A, Makieieva O, Bart G, Andoh SS, Roussey M, Vainio SJ, Hiltunen J. Time-gated Raman spectroscopy and proteomics analyses of hypoxic and normoxic renal carcinoma extracellular vesicles. *Sci Rep*. 2021; 11(1):19594. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99004-6> (SJR Q1 <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21100200805&tip=sid&clean=0>)

3. Ullah MS, Zhivonitko VV, Samoylenko A, Zhyvolozhnyi A, Viitala S, Kankaanpää S, Komulainen S, Schröder L, Vainio SJ, Telkki VV. Identification of extracellular nanoparticle subsets by nuclear magnetic resonance. *Chem Sci*. 2021; 12(24):8311-8319. <https://doi.org/10.1039/D1SC01402A> (SJR Q1 <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=19700200838&tip=sid&clean=0>)

4. Bart G, Fischer D, Samoylenko A, Zhyvolozhnyi A, Stehantsev P, Miinalainen I, Kaakinen M, Nurmi T, Singh P, Kosamo S, Rannaste L, Viitala S, Hiltunen J, Vainio SJ. Characterization of nucleic acids from extracellular vesicle-enriched human sweat. *BMC Genomics*. 2021; 22(1):425. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07733-9>(SJR Q1 <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21727&tip=sid&clean=0>)

5. Zhyvolozhnyi A. Yu., Horak I. R., Skaterna T. D., Khudiakova O. V., Vainio S. J., Samoylenko A. A., Drobot L. B. Composition of EVs markers under normoxic and hypoxic conditions is dependent on the expression level of adaptor protein Ruk/CIN85 in mouse renal carcinoma Renca cells. *Biopolym. Cell*. 2021; 38(4):325-334 DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A5E> (SJR Q4 <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=17600155231&tip=sid&clean=0>)

Живоложний А.Ю. – проектування та виконання дослідження, аналіз результатів та написання оригінальної чернетки; Горак І.Р. – методологія, рецензування та редагування; Скатерна Т.Д. – методологія, дослідження; Худякова О.В. – ресурси, дослідження; Вайнію С.Дж. – рецензування та редагування; Самойленко А.А. – концепція та дизайн дослідження; Дробот Л.Б. – коцептуалізація, візуалізація, написання рукопису.

6. Zhyvolozhnyi A. Yu., Samoylenko A. A., Horak I. R., Hudkova O. O., Gomozkova M. O., Vainio S. J., Drobot L. B. Extracellular vesicles produced by mouse breast adenocarcinoma 4T1 cells with up- or down-regulation of adaptor protein Ruk/CIN85 differentially modulate the biological properties of 4t1 WT cells. *Ukr. Biochem. J*. 2021; 93(6):46-54 <https://doi.org/10.15407/ubj93.06.046>

(SJR Q4

<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21100395051&tip=sid&clean=0>)

Живоложний А.Ю. – проектування та виконання дослідження, аналіз результатів та написання оригінальної чернетки; Самойленко А.А. – концепція та дизайн дослідження; Горак І.Р. – методологія, дослідження; Гудкова О.О. – ресурси, візуалізація; Гомозкова М.О. – дослідження; Вайніо С.Дж. – рецензування та редагування; Дробот Л.Б. – концептуалізація, візуалізація, написання рукопису.

Апробація результатів дослідження.

Одержані результати дисертації було апробовано на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях:

1. Науково-практичної конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», 4-5 лютого 2019, Київ, Україна XI Український біохімічний конгрес. м. Київ, 4-8 жовтня 2014 р.

2. Young scientists conference “Modern aspects of biochemistry and biotechnology – 2019”. 21-22 March, 2019, Kyiv, Ukraine.

3. The 5th international scientific conference current problems of biochemistry, cell biology and physiology. 1-2 October, 2020 Dnipro, Ukraine.

4. Conference - ISEV 2020: International Society for Extracellular Vesicles

5. Young scientists conference “Modern aspects of biochemistry and biotechnology – 2020”

Інформація щодо проведення біоетичної експертизи дисертаційних досліджень. Здобувач Живоложний А.Ю. виконував експериментальну частину дисертаційної роботи у відділі сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (культивування евкаріотичних клітин) та лабораторії біології розвитку, факультету біохімії та молекулярної медицини Університету Оулу (Фінляндія) (дослідження молекулярного складу поту людини). Комісія з біологічної безпеки та біоетики Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України надала висновок щодо дотримання вимог норм біоетики та біологічної безпеки тієї частини досліджень, що була проведена в ІБХ. Комісія прийняла рішення, що дисертаційна робота була проведена з дотриманням правил роботи з культурами евкаріотичних клітин в лабораторії П рівня біобезпеки згідно з рекомендаціями та настановами Директиви 2000/54/ЄС Європейського Парламенту та Ради від 18 вересня 2000 року про захист працівників від ризиків, пов'язаних із впливом біологічних агентів на роботі (сьома окрема директива у значенні статті 16(1) Директиви 89/ 391/ЄЕС) та Закону України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» від 31.05.2007 № 1103-V (протокол №7 від 26.09.2024 р.). На проведення дослідження в Університеті Оулу дослідницька група отримала

дозвіл відповідних державних структур (протокол №2/2019 від 18.02.2019 р), які підтвердили, відповідність науково-дослідницької роботи, що проводилася в рамках плану RUBY 2, вимогам закону (Фінляндії) про медичні дослідження (488/1999).

Висновок.

Таким чином, за результатами публічної презентації Живоложним Артемом Юрійовичем наукових результатів дисертації «Регуляторна роль позаклітинних везикул за умов норми та канцерогенезу» та їх обговорення на розширеному засіданні професорсько-викладацького складу Випускової кафедри ЗВО Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та наукового семінару «Актуальні проблеми сучасної біохімії» Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України ухвалили:

1. Вважати, що дисертація Живоложного Артема Юрійовича на тему «Регуляторна роль позаклітинних везикул за умов норми та канцерогенезу» є завершеною науковою працею та відповідає галузі знань 09 Біологія, за спеціальністю 091 Біологія.

2. Вважати, що дисертація Живоложного Артема Юрійовича відповідає пп. 6, 7, 8 «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 р та «Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у закладах вищої освіти (наукових установах)», в редакції від 19.05.2023 р., затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 502.

3. Рекомендувати дисертацію Живоложного Артема Юрійовича на тему «Регуляторна роль позаклітинних везикул за умов норми та канцерогенезу» до захисту на засіданні разової спеціалізованої вченої ради в галузі знань 09 Біологія зі спеціальності 091 Біологія.

14.10.2024 р.

Головуючий, заступник директора за наукової роботи
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України
академік НАН України,
д.б.н., професор

С.О. Костерін

Завідувач Випускової кафедри
ЗВО Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України
д.б.н., с.н.с.

Л.Г. Бабіч

Учений секретар

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України
к.б.н.

О.В. Худякова