

ВИСНОВОК

наукового керівника Людмили ДРОБОТ,
д.б.н, професора, завідувача відділу сигнальних механізмів клітини
Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
на дисертаційну роботу Артема ЖИВОЛОЖНОГО
«Регуляторна роль позаклітинних везикул за умов норми та канцерогенезу»,
що подається на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09
Біологія, за спеціальністю 091 Біологія

1. Особливості прикріплення до виконання освітньо-наукової програми підготовки доктора філософії.

ЖИВОЛОЖНИЙ Артем вступив до аспірантури Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України 01.11.2016 р. та приступив до виконання ОНП за спеціальністю 091 Біологія (37 кредитів ЄТКС) для здобуття вищої освіти ступеня доктора філософії. На засіданні Вченої ради Інституту 28 лютого 2017 р. (протокол № 3) йому було затверджено індивідуальний план наукової роботи, тему дисертаційного дослідження «Роль екзосом, що продукуються пухлинними клітинами, у патогенезі злоякісних новоутворень: вклад адаптерного протеїну Ruk/CIN85» та призначено науковими керівниками д.б.н, професора. Дробот Л.Б. та д.б.н, ад'юнкт-професора Самойленка А.А., старшого наукового співробітника лабораторії біології розвитку, факультету біохімії та молекулярної медицини Університету Оулу (Фінляндія).

2. Особливості формування індивідуальної освітньої траєкторії та виконання індивідуального плану здобувача.

У зв'язку з тим, що виконання дисертаційного дослідження за обраною темою, насамперед, потребувало опрацювання методів виділення та характеристики молекулярного складу позаклітинних везикул як з біологічних рідин, так і з кондиційованого середовища культивування клітин на відповідному обладнанні, яке відсутнє в Інституті біохімії, а також на підставі реалізації академічної мобільності відповідним дозволом відділу аспірантури НАН України, Живоложний А.Ю. відбув на стажування в лабораторію біології розвитку, факультету біохімії та молекулярної медицини Університету Оулу (Фінляндія) до другого наукового керівника, д.б.н ад'юнкт-професора Самойленка А.А. з 01.01.2017 по 31.12.2017 на запрошення керівництва Університету Оулу. Тобто, в період з 2017 по 2021 рр. включно Живоложний А.Ю. здійснював виконання експериментальної частини дисертації по чергово в Інституті біохімії і Університеті Оулу. Навчання в аспірантурі відбувалося під час перебування в Інституті біохімії, оскільки на той час навчання в режимі on-line було відсутнє. Через це фактичний термін навчання переривався. Останнє поновлення Живоложного

А. в аспірантурі здійснено 01.09.2022 р., що відповідало на той момент 2-му року навчання, налагоджено завершення учбового процесу за індивідуальним графіком та звітування в режимі on-line за рішенням Вченої ради Інституту біохімії.

З іншого боку, протягом фактичного часу виконання дисертаційного дослідження 2017-2024 рр., дисертантом було накопичено великий обсяг експериментального матеріалу, що значно розширило коло наукових завдань для досягнення поставленої мети. Тому, було прийнято рішення про зміну теми дисертації з «Роль екзосом, що продукуються пухлинними клітинами, у патогенезі злоякісних новоутворень: вклад адаптерного протеїну Ruk/CIN85» на «Регуляторна роль позаклітинних везикул за умов норми та канцерогенезу» на засіданні Вченої ради Інституту біохімії (протокол №2 від 23.02.2024).

За час роботи над дисертацією в Інституті біохімії та проходження ОНП аспірант Живоложний А. набув рівня компетентності, що відповідає вимогам підготовки доктора філософії. Знання отримані за компонентами загально-наукового блоку ОНП дозволили аспіранту успішно провести та завершити роботу над дисертацією, набути навичок педагогічної діяльності, оприлюднення результатів досліджень у фахових наукових виданнях та їх презентації на наукових форумах, а також розширити можливості наукового дослідження за рахунок написання запитів на отримання грантової підтримки. Фундаментальна підготовка за спеціальністю («Біологія», спеціалізація – біохімія) сформувала головну компетенцією мого підопічного аспіранта, який свій професійний рівень за спеціальністю підтвердив здаванням іспитів з дисциплін за цим освітнім блоком, а також комплексного іспиту з загальної біохімії, на «відмінно».

Звіти про стажування та виконання індивідуального навчального плану Живоложний А. здійснював в зазначені терміни, всі вони були затверджені на засіданнях Вченої ради ІБХ. Станом на 01.05.2024 р. успішно завершено виконання ОНП за спеціальністю «Біологія» в аспірантурі Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та отримано академічну довідку за №3 від 03.06.2024 р.

3. Успіхи у набутті компетентностей наукового пошуку.

Тривалий період, протягом якого ЖИВОЛОЖНИЙ Артем працював над дисертацією і навчався в аспірантурі, внаслідок зазначених вище обставин, мав для нього позитивний вплив. За цей час він досяг значних успіхів у теоретичних та практичних аспектах біохімії та молекулярної клітинної біології. Наразі Артем демонструє високий рівень майстерності у володінні сучасними методами цієї галузі, зокрема такими, як культивування еукаріотичних клітин і оцінка їхньої життєздатності, аналіз їхньої міграційної та інвазивної активності, визначення вмісту протеїнів і експресії мРНК у пухлинних клітинах за допомогою Вестерн-

блоту та кількісної ПЛР, а також ізоляція позаклітинних везикул з пухлинних клітин і біологічних рідин організму з подальшою їх характеристикою за розміром і молекулярним складом (протеїни, нуклеїнові кислоти, ліпіди, метаболіти).

Освоєння цих методів вимагало від нього вміння працювати з високотехнологічним спеціалізованим обладнанням, таким як електронний і конфокальний мікроскоп, мас-спектрометр і раманівський спектрометр, з чим він успішно впорався. Окремо слід підкреслити його досвід і вміння працювати з біоінформатичними базами даних для обробки та інтерпретації експериментальних даних.

Серед важливих рис ЖИВОЛОЖНОГО Артема варто виділити його точність і ретельність у роботі, здатність оперативно вирішувати складні завдання, а також його комунікабельність і доброзичливість. Він має ґрунтовні знання та достатній досвід для впевненої участі в наукових дискусіях. Артем користується повагою серед колег і вміє організувати ефективну роботу дослідницької групи для досягнення поставлених цілей. Постійно працює над підвищенням свого професійного рівня, зокрема через активне використання сучасної наукової літератури.

4. Актуальність теми дисертаційної роботи.

Фізіологія клітин у багатоклітинному організмі визначається дією сигналів, які надходять із зовнішньоклітинного і внутрішньоклітинного середовища, в т. ч. від сусідніх клітин та сприймаються як мембранними, так і цитоплазматичними рецепторами клітин-мішеней. Подальша передача окремих сигналів вглиб клітини зазвичай відбувається шляхом низки взаємодій між сигнальними протеїнами та іншими молекулами сигнального шляху. Клітинні сигнальні шляхи не існують окремо, а мають множинні перехрести та сполучення, утворюючи сигнальні мережі. Протягом останніх років стало очевидним, що одну із основних ролей у міжклітинній комунікації відіграє передача сигнальних молекул за допомогою так званих позаклітинних везикул (EVs), що утворюються шляхом екзоцитозу. Везикули є сферичними структурами, вкриті мембранним бішаром, збагачені різними біомолекулами, включаючи ДНК, всі відомі на сьогоднішній день типи РНК, різні протеїни, ліпіди, метаболіти і ін. EVs поглинаються реципієнтними клітинами за автокринним, паракринним та ендокринним механізмами регулювання, зумовлюючи, залежно від їх вмісту, модулювання сигнальних мереж, репрограмування транскриптому й метаболізму і, як наслідок, зміни фізіологічної активності клітин. 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. Крім того, EVs виявлені у всіх рідинах організму (кров, сеча, слина, піт, фекалії тощо). Водночас, глибина

вивчення EVs, що містяться в низці біологічних рідин 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.

Однією з перспективних біологічних рідин для використання в контексті моніторингу змін в організмі людини на молекулярному рівні, викликаних як захворюваннями, так і впливом різноманітних чинників навколишнього середовища, є піт. Зазначена рідина може забезпечити альтернативу аналізу крові, адже його збір проводиться неінвазивно та в реальному часі. Дані стосовно нуклеїнового та протеїнового складу EVs поту людини, індукованого фізичними вправами, як і використання таких даних з діагностичною метою, на момент початку дисертаційного дослідження в літературі були відсутні, що безперечно вказує на актуальність обраної теми й напрямку досліджень.

На сьогодні, встановлено кореляцію між інтенсивністю продукування EVs і метастатичним потенціалом пухлинних клітин. Показано здатність таких везикул пригнічувати імунітет, посилювати пухлинний ріст і розвиток резистентності до протипухлинних препаратів. Дослідженнями відділу сигнальних механізмів клітини продемонстровано, що підвищення експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в пухлинних клітинах різного тканинного походження супроводжується посиленням їх малігнізації. Окрім того, встановлена роль Ruk/CIN85 у ліганд-індукованому ендцитозі мембранних рецепторів, внутрішньоклітинному трафіку мембранних везикул, показана структурно-функціональна взаємодія Ruk/CIN85 з протеїнами Alix, Tsg101 та клатрином, залученими до формування MVB (мультивезикулярних тілець), а також кортактином, що стимулює секрецію EVs. Водночас, слід зазначити, що молекулярні механізми впливу EVs на розвиток пухлинного процесу залежно від особливостей їх походження та складу, залишаються недостатньо вивченими. Оскільки EVs відображають фізіологічний стан клітини, яка їх секретує, то дослідження характеристик та вмісту EVs, що продукуються пухлинними клітинами з різним ступенем агресивності, а, відповідно, і з відмінним рівнем вмісту Ruk/CIN85, за умов різного парціального тиску кисню в позаклітинному середовищі (гіпоксія, нормоксія) є актуальними з точки зору можливості використання цих структур для діагностики, прогнозу розвитку онкологічних захворювань та виживаності онкологічних хворих. Сказане визначає необхідність глибокого і всебічного вивчення Ruk/CIN85-опосередкованих механізмів біогенезу EVs та їх регуляторних ефектів, можливості використання досліджуваного адаптерного протеїну як нової мішені у протипухлинній терапії.

Крім того, окремим актуальним аспектом дисертаційної роботи

ЖИВОЛОЖНОГО А. став пошук і вдосконалення новітніх методичних підходів для ізолювання та характеристики EVs.

5. Зв'язок роботи з науковими програмами, темами, планами.

Роботу виконано відповідно до плану науково-дослідних робіт Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України в рамках НДР за темами: «Біохімічні механізми контролю системних міжклітинних взаємодій, регулювання сигнальних мереж та клітинних функцій за умов норми та патологічних станів» (2016-2019 № держреєстрації 0117U004344), «Механізми ядерного та метаболічного репрограмування пухлинних клітин, асоційовані з прогресією онкологічних захворювань: внесок адаптерного протеїну Ruk/CIN85» (2020-2024 рр., № державної реєстрації 0120U002191).

Дослідження, проведені в лабораторії біології розвитку Університету Оулу Фінляндії виконані за підтримані наступних дослідницьких грантів та програм: Centre of Excellence grant (2012–2017 251314); Business Finland (BioRealHealth); Academy of Finland Biofuture2025, European Union Regional Development Fund (Printocent); the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013; grant FP7-HEALTH-F5; Academy of Finland (AF) Flagship Program Gene; Cell and Nano Therapy Competence Cluster for the Treatment of Chronic Diseases (GeneCellNano); Business Finland Future of Diagnostics—FUDIS; EDUFI (Finnish National Agency for Education) Fellowships; the Academy of Finland (AF) Flagship Programs: Photonics Research and Innovation (PREIN) with decisions 320168 (M.K., J.H) and 320166 (S.A., M.R); Cancer Foundation of Finland to S.V. (2017 and 2018); European Research Council (ERC) under Horizon 2020 (H2020/2018–2022/ERC grant agreement no. 772110); Academy of Finland (grants #289649, 294027, 319216 and 323480); EU FET Open grant 829040, Sigrid Juselius Foundation;

6. Наукова новизна отриманих результатів.

1. 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.

2. 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.

3. Вперше показано, що комплексне використання методів Раманівської спектроскопії та мас-спектрометричного аналізу забезпечує глибоку диференційну оцінку діапазону розмірів наночастинок та молекулярних змін, зумовлених впливом різних факторів навколишнього середовища, таких як гіпоксія.

4. На моделі аденокарциномних клітин нирки миші лінії Rensa встановлено, що рівень експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в пухлинних клітинах значно впливає на кількість та склад EVs. Виявлено суттєві зміни вмісту Ruk/CIN85 та маркерних протеїнів EVs, таких як Alix і CD81, у везикулах залежно від значень парціального тиску кисню у середовищі. Вперше продемонстровано, що Ruk/CIN85 є новим компонентом EVs, який відіграє важливу роль у біогенезі везикул, регулюванні їхнього складу за різних кисневих умов середовища.

5. Встановлено, що адаптерний протеїн EGFP-Ruk/CIN85 є компонентом EVs, що продукуються стабільними трансфектантами клітин ембріональної нирки людини лінії HEK293. Продемонстровано здатність EVs з різним вмістом EGFP-Ruk/CIN85 модулювати проліферативні властивості та рухливість клітин *in vitro*. 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.

6. Виявлено, що EVs, які секретуються аденокарциномними клітинами грудної залози миші лінії 4T1 з up- та down-регулюванням Ruk/CIN85, містять різні молекулярні форми адаптерного протеїну й диференційно модулюють проліферативну активність, рухливість і інвазивність батьківських клітин 4T1: EVs від клітин з підвищеною експресією Ruk/CIN85 (RukUp) - підвищують агресивність, тоді як EVs від клітин зі зниженою експресією (RukDown) - знижують ці показники. Отримані дані вказують на ключову роль Ruk/CIN85 у біогенезі EVs та їх впливі на канцерогенез.

7. Наукове та практичне значення дослідження.

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. 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.

8. Повнота викладення матеріалу дисертації в наукових публікаціях.

Результати, представлені в дисертації, в повному обсязі висвітлені в 6 наукових публікаціях у фахових виданнях, які проіндексовано в наукометричній базі SCOPUS, 4 з яких - в виданнях Q1-Q2, що збільшує їх кількість удвічі згідно Постанови КМУ №44. Тобто, загальна кількість статей, опублікованих за темою дисертаційного дослідження складає 10. Результати дисертації були також опробовані на 4 вітчизняних та міжнародних наукових конференціях.

9. Структура та зміст дисертації, її завершеність та відповідність установленим вимогам щодо оформлення.

Структура та зміст дисертації відповідають вимогам щодо оформлення цих рукописів згідно Наказу МОН №40 від 12.01.2017 р. Дисертація складається з вступу, переліку умовних позначень, 3-х основних розділів («Огляд літератури», «Матеріали та методи досліджень», «Результати та їх обговорення»), «Аналізу та узагальнення результатів», висновків, переліку використаних джерел, переліку наукових праць, опублікованих за темою дисертації. Рукопис викладений на 185 сторінках комп'ютерного набору, містить 8 таблиць, 58 рисунків.

10. Дотримання принципів академічної доброчесності.

Дисертаційна робота здобувача ЖИВОЛОЖНОГО Артема повністю відповідає п.12 Постанови Кабінету Міністрів України «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» від 12 січня 2022 р., № 44 щодо вимог академічної доброчесності, оскільки не містить плагіату, самоплагіату, фальсифікацій та фабрикації, містить результати, отримані особисто, у всіх інших випадках наводяться посилання на співавторів наукових публікацій та відповідні джерела.

11. Дискусійні положення та зауваження до дисертації.

Результати досліджень, присвячених аналізу EVs поту людини, індукованого фізичними вправами, є значним внеском у розвиток неінвазивних методів моніторингу здоров'я. Однак, для повного використання потенціалу цих технологій необхідні подальші дослідження. Незважаючи на те, що дослідження включає аналіз зразків від декількох добровольців, обмежена кількість зразків ускладнює можливість узагальнення результатів на широкую популяцію. Існує ймовірність

контамінації зразків як людськими, так і мікробними протеїнами з інших джерел, таких як шкіра або навколишнє середовище, що потребує детальнішого аналізу або додаткових контрольних експериментів. Хоча в роботі підкреслюється важливість індивідуальної варіабельності, зазначений феномен може стати перешкодою для стандартизації аналізів. Вважаю, що подальші дослідження повинні бути скеровані на визначенні мінімального набору універсальних біомаркерів. Метод EchoEasy, який був використаний для виділення EVs, вимагає значних обсягів поту, що може бути проблематичним для клінічного застосування. Крім того, питання інтерпретації даних стосовно бактерійних протеїнів та їхнього значення для діагностики залишаються відкритими.

В дослідженнях на культурах пухлинних клітин *in vitro* здійснено детальний аналіз різних методів ізолювання EVs. Проте, отримані результати продемонстрували, що метод виділення може мати навіть більше значення для забезпечення особливостей складу EVs, ніж умови гіпоксії, що піднімає питання стосовно узгодженості результатів, отриманих різними лабораторіями, і вказує на необхідність стандартизації методів виділення. Крім того, хоча метод Раманівської спектроскопії (TG-RS/TG-SERS) є швидшим, він не надає такої детальної інформації стосовно хімічного складу EVs, як мас-спектрометрія, і порівняння між цими двома методами може бути складним через різні принципи їх роботи. Також варто зазначити, що дослідження включає аналіз EVs лише з двох клітинних ліній (аденокарциномні клітини нирки миші Rensa та людини 786-O), що може обмежувати узагальнення результатів для інших типів ракових клітин або тканин. Таким чином, для підтвердження діагностичної цінності TG-RS та його здатності виявляти біомаркери у реальних зразках пацієнтів необхідні додаткові клінічні дослідження, які врахують всі можливі варіанти методів виділення EVs та їх аналізу.

Хоча в дисертаційній роботі показана присутність різних молекулярних форм адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у EVs, залишається відкритим питання щодо того, наскільки ці форми впливають на кінцевий фізіологічний ефект EVs на клітини-мішені. Відсутність даних щодо впливу EVs за умов *in vivo* на розвиток пухлинного процесу обмежує можливість екстраполяції отриманих результатів на клінічні результати. Крім того, дослідження проводилося на одній лінії пухлинних клітин нирки миші та умовно нормальних клітинах ембріональної нирки людини, що обмежує узагальнення результатів, отримані для інших типів клітин або пухлин. Для глибшого розуміння механізмів дії Ruk/CIN85 в біогенезі EVs та їх впливі на розвиток пухлинного процесу й метастазування необхідні подальші дослідження з використанням різноманітних моделей за умов *in vivo*.

12. **Загальний висновок.**

Дисертаційна робота ЖИВОЛОЖНОГО Артема «Регуляторна роль позаклітинних везикул за умов норми та канцерогенезу» за актуальністю, науково-теоретичним рівнем, новизною постановки та розв'язанням проблем, практичним значенням відповідає вимогам Постанови Кабінету Міністрів України «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» від 12 січня 2022 р., № 44, а здобувач заслуговує на присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія, за спеціальністю 091 - Біологія.

Науковий керівник:
д.б.н, професор,
завідувач відділу
сигнальних механізмів
клітини
Інституту біохімії ім. О. В.
Палладіна НАН України

Людмила ДРОБОТ

12.08.2024 р.



Підпис 
СВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна
національної академії наук України
"12" 08 2024 р. 