

ВИСНОВОК

наукового керівника Анатолія САМОЙЛЕНКА,
д.б.н, ад'юнкт-професора, старшого наукового співробітника лабораторії
біології розвитку, факультету біохімії та молекулярної медицини
Університету Оулу
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 був прикріплений до виконання освітньо-наукової програми за спеціальністю 091 Біологія (37 кредитів ЄКТС) для здобуття ступеня доктора філософії наказом Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України від 1 листопада 2016 року про зарахування в аспірантуру. Індивідуальний план наукової роботи та тема дисертаційного дослідження «Роль екзосом, що продукуються пухлинними клітинами, у патогенезі злоякісних новоутворень: вклад адаптерного протеїну Ruk/CIN85» затверджено на засіданні Вченої ради Інституту 28 лютого 2017 року (протокол № 3). Науковими керівниками призначено д.б.н., професора Дробот Л.Б., завідувача відділу сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України та д.б.н. ад'юнкт-професора Університету Оулу (Фінляндія) Самойленка А.А.

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

Початок роботи над обраною темою дисертаційного дослідження Живоложного А. був пов'язаний з певними труднощами через відсутність в Інституті біохімії оснащення для ізолювання та очищення позаклітинних везикул як з біологічних рідин людини, так і кондиційованого середовища вирощування еукаріотичних клітин. Тому, нами з Л.Б. Дробот, спираючись на можливість реалізації здобувачами права на академічну мобільність, було прийнято колегіальне рішення про від'їзд нашого підопічного на весь календарний 2017 рік до Університету Оулу (Фінляндія), на факультет біохімії та молекулярної медицини до лабораторії біології розвитку, де я працюю старшим науковим співробітником і де є в наявності відповідне обладнання для проведення експериментальної роботи за обраною темою дисертації. З свого боку я отримав підтримку керівництва Університету та оформив запрошення для Живоложного А, а Л.Б. Дробот узгодила його стажування з відділом аспірантури НАН України. Починаючи з 2017 р. по теперішній час аспірант працював над дисертацією в зазначених установах

обох країн. На той час можливості не переривати навчання в аспірантурі під час перебування за кордоном не було, тому фактичний термін перебування в аспірантурі не співпадав з календарним. Такої затримки вдалось уникнути після налагодження навчання в аспірантурі ІБХ в режимі он-лайн і з 01.09.2022 року Артема було поновлено в чергове в аспірантурі. З того часу він, аспірант 2-го року, успішно включився до завершення навчального процесу за індивідуальним графіком. Звітування проходило також в онлайн-форматі за рішенням Вченої ради Інституту біохімії.

Протягом 2017-2024 років, у ході виконання дисертаційної роботи, дисертант зібрав значний обсяг експериментальних даних та опублікував 11 наукових статей у фахових виданнях, 7 з яких – в виданнях Q1, що суттєво змінило масштаб і характер наукових завдань, необхідних для досягнення поставленої мети. Тому нами, обома науковими керівниками, було прийнято рішення змінити тему 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», що зафіксовано офіційним рішенням Вченої ради Інституту біохімії (протокол №2 від 23.02.2024 р.).

3. Успіхи у набутті компетентностей наукового пошуку.

Під час роботи над дисертацією під моїм безпосереднім керівництвом, навчання в аспірантурі та роботи в Інститут біохімії Живоложний А. здобув глибокі знання та практичні навички в галузі біохімії та молекулярної клітинної біології. Він упевнено володіє сучасними методами, такими як культивування еукаріотичних клітин, оцінка їхньої життєздатності, аналіз міграційного та інвазивного потенціалу, визначення вмісту протеїнів і експресії mRNA пухлинних клітин за допомогою Вестерн-блоту та qPCR, ізоляція позаклітинних везикул та їх характеристика. Опанування цих методів потребувало роботи з високотехнологічним обладнанням, а саме електронним та конфокальним мікроскопами, магнітно-резонансним спектрометром, мас-спектрометром і раманівським спектрометром, що Артем успішно виконав. Він також набув компетентності також у роботі з біоінформатичними базами даних, важливою і складною ділянкою сучасного дослідника-біолога. Для Артема характерні такі особисті риси як уважність, точність, здатність вирішувати робочі проблеми, комунікабельність та доброзичливість. Він має достатньо досвіду для участі в наукових дискусіях і прагне постійного професійного зростання.

4. Актуальність теми дисертаційної роботи.

Позаклітинні везикули (EVs) відіграють ключову роль у міжклітинній комунікації, завдяки здійсненню трансферу сигнальних молекул між клітинами. Ці біологічні структури утворюються шляхом екзоцитозу мембрани (мікровезикули) або ендоцитозу з подальшим вивільненням з

мультивезикулярних тіл (екзосоми) і містяться у всіх біологічних рідинах, включаючи кров, сечу, слину та піт. EVs є важливим джерелом інформації про клітинні процеси, ріст пухлин, міграцію, інвазію та ангиогенез, що робить їх перспективними для моніторингу змін, викликаних різними стимулами. Їхній вплив на карциногенез залежить від клітини походження, що підкреслює їх потенціал у персоналізованій медицині.

Попри прогрес у діагностиці та лікуванні раку, такі пухлини, як рак нирки (RCC), залишаються стійкими до традиційних методів терапії. У цьому контексті важливу роль відіграють адапторні протеїни, зокрема Ruk/CIN85, які взаємодіють з маркерними протеїнами EVs і беруть участь у регуляції клітинної поведінки. Виявлення того, що склад EVs відображає фізіологічний стан клітини, відкриває нові можливості для діагностики. Піт, який можна збирати неінвазивно, є перспективною альтернативою аналізу крові для моніторингу здоров'я, оскільки містить різні типи EVs, придатні для виявлення біомаркерів. Однак, широке використання EVs з поту обмежене через нерозвинені методи їх ізоляції та аналізу.

Розвиток переносних датчиків для аналізу поту, що дозволяють збирати та концентрувати аналіти в реальному часі, є перспективним напрямом. Такі датчики можуть включати пластирі на основі альгінату, які є біосумісними та екологічно безпечними. Вже розробляються мікрофлюїдні платформи для аналізу EVs в крові, які можуть бути адаптовані для роботи з потом, що відкриває нові можливості для неінвазивного моніторингу захворювань.

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

Дослідження, що проведені в лабораторії біології розвитку Університету Оулу (Фінляндія), виконані за підтримки наступних дослідницьких грантів та програм: Business Finland (BioRealHealth); Academy of Finland Biofuture2025; 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) 320168 (M.K., J.H); Cancer Foundation of Finland (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); Sigrid Juselius Foundation;

Роботу в Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України виконано 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).

6. Наукова новизна отриманих результатів.

1. Вперше було детально досліджено нуклеїновий склад позаклітинних везикул, що присутні у поті людини, зібраного після фізичних навантажень. Результати цього дослідження продемонстрували, що EVs поту містять різноманітні нуклеїнові кислоти, як людського, так і мікробного походження, включаючи DNA та RNA. Виявлено, що найбільшу частку серед цих нуклеїнових кислот становить мітохондріальна DNA, тоді як серед RNA домінують tRNA, з меншою часткою miRNA, mRNA, snRNA, snoRNA та інших малих RNA. Крім того, у поті було виявлено наявність нуклеїнових кислот бактерій, архей і вірусів, що є характерними для мікробіому шкіри.

2. Вперше було детально досліджено протеїновий склад позаклітинних везикул у поті людини, що виділяється під впливом фізичних вправ. Дослідження виявило суттєві відмінності в протеїновому складі між окремими зразками EVs та загальним протеїновим складом поту. Серед протеїнів EVs були виявлені потенційні біомаркери онкологічних та інфекційних захворювань. Крім того, було продемонстровано, що альгінатний пластир ефективно збирає EVs людського поту, дозволяючи відокремити їх від бактеріальних EVs.

3. У дослідженні на моделі аденокарциномних клітин нирки миші лінії Renca було виявлено, що рівень експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у пухлинних клітинах значно впливає на кількість і склад позаклітинних везикул. Спостерігалися суттєві зміни у вмісті Ruk/CIN85 та маркерних протеїнів EVs, таких як Alix і CD81, залежно від парціального тиску кисню в навколишньому середовищі. Це дослідження вперше показало, що Ruk/CIN85 є новим компонентом EVs, який відіграє ключову роль у біогенезі везикул та регулюванні їх складу під впливом різних умов кисневого середовища.

4. Виявлено, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 мічений з EGFP входить до складу позаклітинних везикул, які продукуються стабільно трансфікованими клітинами ембріональної нирки людини лінії HEK293. Дослідження показало, що EVs з різним рівнем EGFP-Ruk/CIN85 можуть впливати на проліферацію та рухливість клітин *in vitro*. За допомогою мас-спектрометричного аналізу (GeLC MS/MS) вперше встановлено, що більшість протеїнів, які диференційно експресуються в клітинах HEK293 з підвищеним рівнем EGFP-Ruk/CIN85 і присутні в EVs, належать до метаболічних ензимів.

5. Було встановлено, що EVs, які секретуються аденокарциномними

клітинами молочної залози миші лінії 4T1 із підвищеним або зниженим рівнем експресії Ruk/CIN85, містять різні молекулярні форми цього адаптерного протеїну та по-різному впливають на проліферацію, рухливість і інвазивність вихідних клітин 4T1. EVs, отримані від клітин з підвищеною експресією Ruk/CIN85 (RukUp), збільшують агресивність клітин, тоді як EVs від клітин зі зниженою експресією (RukDown) зменшують ці показники. Ці результати підкреслюють важливу роль Ruk/CIN85 у біогенезі EVs та їхньому впливі на процеси канцерогенезу.

7. Наукове та практичне значення дослідження.

Дослідження показало, що позаклітинні везикули (EVs) поту людини містять потенційні біомаркери людського та бактерійного походження, розширюючи знання про склад EVs та їх роль у фізіологічних і патологічних процесах. Особливо важливою є ідентифікація протеїнів бактеріального походження, що відображає склад мікробіому шкіри, а також аналіз нуклеїнових кислот, який може сприяти розробці нових біомаркерів для онкологічних захворювань. Результати можуть бути використані для розробки неінвазивних методів діагностики захворювань, через аналіз поту. Крім того, дослідження сприяє розвитку персоналізованої медицини і вказує на можливість використання альгінатних пластирів для селективного збору EVs людського походження.

Аналіз EVs за допомогою Time-gated Raman spectroscopy (TG-RS) та протеоміки в умовах гіпоксії та нормоксії дозволяє глибше зрозуміти, як гіпоксія впливає на склад протеїнів EVs, що секретуються клітинами раку нирки. Дослідження підкреслює значення специфічних протеїнів, таких як інтегрини, які були надмірно представлені у везикулах гіпоксичних клітин, що вказує на їхню роль у адгезії та метастазуванні. Використання TG-RS для аналізу EVs відкриває нові можливості для неінвазивного і точного вивчення змін в EVs під впливом зовнішніх стимулів, таких як нестача кисню.

Протеїн Ruk/CIN85 в умовах нормоксії та гіпоксії в клітинах мишачої карциноми нирки поглиблює розуміння механізмів, що регулюють склад EVs. Встановлено, що Ruk/CIN85 є новим компонентом EVs, який впливає на їхній склад залежно від умов кисневого середовища. Це відкриває нові можливості для вивчення механізмів комунікації між клітинами, особливо в умовах стресу, таких як гіпоксія, що є характерною для ракових пухлин.

8. Повнота викладення матеріалу дисертації в наукових публікаціях.

Результати, представлені в дисертації, повністю висвітлені в 6 наукових публікаціях у фахових виданнях, які проіндексовано в наукометричній базі SCOPUS, з яких 4 опубліковано в виданнях Q1, що, відповідно до Постанови КМУ №44, подвоює їх кількість. Таким чином, загальна кількість статей, опублікованих за темою дисертаційного

дослідження, складає 10. Результати дисертації також були представлені 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.

Враховуючи швидкий розвиток персоналізованої медицини, яка потребує доступу до високоточних біомаркерів, результати цих досліджень можуть бути значним кроком вперед у створенні нових діагностичних інструментів. Одним із ключових моментів у цьому дослідженні є методологія збору поту та EVs. Хоча було використано різні підходи для збору зразків, включаючи використання альгінатних пластирів, варто звернути увагу на відсутність чіткої стандартизації цих методів. Збір поту під час фізичної активності, в однакових умовах, залежить від фізичного стану учасників і має значну варіабельність, що ускладнює порівняння даних між різними зразками. Дослідження проводилося на невеликій кількості добровольців, що є обмежуючим фактором для генералізації висновків. Висока індивідуальна варіабельність складу EVs у поту, яка була помічена в дослідженні, може бути як справжньою біологічною варіабельністю, так і наслідком невеликої вибірки. Хоча в дослідженні було показано, що EVs містять протеїни бактеріального походження, точна природа цих протеїнів і їх значення залишаються не зовсім зрозумілими. Необхідно краще визначити, чи ці протеїни є лише контамінантами, чи вони мають метаболічне значення.

Використання технологій Time-gated Raman spectroscopy (TG-RS) і TG-

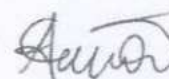
SERS (Surface-enhanced Raman spectroscopy) для аналізу EVs є інноваційним підходом, який дозволяє отримати унікальні спектральні підписи EVs і зменшити вплив флуоресценції. Однак дослідження було проведено лише на двох клітинних лініях (Rensa та 786-O), що може обмежувати загальність отриманих результатів. Було б корисно розширити експерименти на інші типи клітин, щоб підтвердити узагальнюваність висновків. Хоча TG-SERS дозволяє отримувати більш чіткі спектри, проте проблема з повторюваністю результатів через залежність підсилення сигналу від відстані між наночастинками і біомолекулами залишається. Це може вплинути на надійність отриманих даних, особливо при використанні цього підходу в клінічній практиці. Незважаючи на високий науковий інтерес, технічна складність TG-RS та TG-SERS, а також їх обмежена доступність можуть бути перешкодою для широкого застосування цих методів у клінічних умовах. Це вимагає додаткових досліджень з адаптації цих технологій до клінічних лабораторій.

Зміна рівня експресії Ruk/CIN85 що впливає на склад EVs, потребує додаткової перевірки за допомогою більш широкого набору експериментів, включаючи дослідження з використанням різних моделей раку та нормальних клітин. Використання градієнтну ультрацентрифугування для ізоляції EVs, було б цікаво порівняти з іншими методами ізоляції, такими як осадження або фільтрація, щоб краще зрозуміти вплив методу на результати.

12. Загальний висновок.

Дисертаційна робота здобувача Живоложного Артема цілком відповідає вимогам 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 академічної доброчесності. У роботі відсутній плагіат, самоплагіат, фабрикації або фальсифікації. Всі результати, представлені в дисертації, отримані особисто автором. У випадках використання спільних результатів або даних інших авторів наведені відповідні посилання на співавторів наукових публікацій та джерела.

Науковий керівник:
д.б.н, ад'юнкт-професор, старший
науковий співробітник лабораторії
біології розвитку, факультету біохімії
та молекулярної медицини
Університету Оулу
09.08.2024 р.



Анатолій САМОЙЛЕНКО



OULUN YLIOPISTO

Biokemian ja molekyylibiokemian tiedekunta