

Голові спеціалізованої вченої ради
при Інституті біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України
доктору біологічних наук, професору,
провідному науковому співробітнику
відділу науково-інформаційних та
інноваційних досліджень
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України
Ользі МАТИШЕВСЬКІЙ

ВІДГУК

офіційного опонента,
*к.біол.н., старшого дослідника, завідувачки лабораторії
експериментальних досліджень Науково-дослідного інституту
експериментальної та клінічної медицини Національного медичного
університету імені О.О.Богомольця*
Юлії КЛИСЬ,
на дисертаційну роботу Артема ЖИВОЛОЖНОГО
«Регуляторна роль позаклітинних везикул за умов норми та
канцерогенезу»,
подану на здобуття наукового ступеня
доктора філософії в галузі знань 09 – Біологія,
за спеціальністю 091 – Біологія.

1. Актуальність обраної теми

Дисертаційна робота Артема ЖИВОЛОЖНОГО присвячена дослідженню особливостей продукування, молекулярного складу та функціональних властивостей EVs, ізольованих з поту людини та кондиціонованого середовища псевдонормальних та пухлинних клітин, з'ясуванню впливу нормоксії/гіпоксії й адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на зазначені показники. Позаклітинні везикули (EVs) складають гетерогенну популяцію нано/мікророзмірних мембранних везикул, що постійно секретуються в позаклітинне середовище практично всіма дослідженими типами клітин як за нормальних фізіологічних, так і патологічних станів. EVs містять нуклеїнові кислоти (microRNA, mRNA, non-coding RNA, DNA), протеїни з різним функціональним потенціалом, сигнальні молекули та метаболіти, що дозволяє їм відігравати провідну роль у міжклітинній комунікації. EVs виявлені у всіх рідинах організму. Оскільки молекулярний склад EVs є відбитком генетичного контексту клітин, які їх продукували, профілювання вмісту цих частинок є потенційним клінічним ресурсом для неінвазивної диференційної діагностики, прогнозування перебігу хвороб і розробки протоколів лікування, скерованих на конкретного пацієнта. Зокрема,

на сьогодні переконливо встановлено, що EVs, ізольовані з крові онкологічних хворих та кондиціонованого середовища ліній пухлинних клітин, містять пухлино-специфічні молекули, які сприяють прогресії пухлинного росту, інвазії й метастазуванню, ремоделюванню мікрооточення пухлин та ангиогенезу.

Водночас, глибина вивчення EVs, що містяться в низці біологічних рідин та продукуються пухлинними клітинами, все ще залишається недостатньою. 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.

Продemonстровано, що підвищення експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в пухлинних клітинах різного тканинного походження супроводжується посиленням їх малігнізації. 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 є актуальними з точки зору можливості використання цих структур для діагностики, прогнозу розвитку онкологічних захворювань та виживаності онкологічних хворих.

Крім того, окремим актуальним аспектом дисертаційної роботи є пошук і вдосконалення новітніх методичних підходів для ізолювання та характеристики EVs. Вважаю, що робота Живоложного Артема є актуальною як з точки зору вирішення фундаментальних питань, так і практичних можливостей застосування її результатів.

2. *Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами*

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 підтримки 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.

3. Ступінь обґрунтованості основних положень, висновків та практичних рекомендацій, сформульованих у дисертації

Аналіз дисертаційної роботи Артема ЖИВОЛОЖНОГО та опублікованих ним праць свідчить про високий науковий рівень, актуальність, теоретичне та практичне значення дослідження. Відповідно до мети дисертаційної роботи автором сформульовано низку завдань для проведення досліджень, які було виконано здобувачем у повному обсязі. Дисертаційна робота виконана на високому методичному рівні із застосуванням сучасних високотехнологічних методів, містить великий обсяг результатів експериментальних досліджень. Усі висновки та наукові положення, наведені в роботі, ґрунтуються на матеріалах власних досліджень і встановлені шляхом аналізу отриманих експериментальних результатів із використанням біоінформатичних баз даних.

4. Достовірність основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, проведених наукових досліджень та одержаних результатів.

Достовірність основних наукових положень, висновків, практичних рекомендацій та одержаних результатів не викликає сумнівів, оскільки робота виконана дисертантом на високому науковому рівні, ретельний аналіз отриманих даних дав змогу дисертанту їх узагальнити та зробити висновки. Обґрунтованість і достовірність отриманих результатів підтверджено високим рівнем висвітлення матеріалу в опублікованих здобувачем працях у наукових виданнях, 4 з яких мають рейтинг Q1-Q2 відповідно до класифікації SCOPUS.

5. Новизна основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, а також проведених наукових досліджень та 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.

6. *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. 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.

7. *Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій в опублікованих працях.*

Результати, представлені в дисертації, в повному обсязі висвітлені в 6 основних наукових публікаціях у фахових виданнях, які проіндексовано в наукометричній базі SCOPUS, 4 з яких - у виданнях Q1-Q2, що збільшує їх кількість удвічі згідно Постанови КМУ №44. Результати дисертації були також апробовані на 5 вітчизняних та міжнародних наукових конференціях.

8. *Структура дисертації*

Структура та зміст дисертації відповідають вимогам щодо оформлення цих рукописів згідно Наказу МОН №40 від 12.01.2017 р. Дисертація складається з анотації українською та англійською мовами, вступу, переліку умовних позначень, 4-х основних розділів («Огляд літератури», «Матеріали та методи досліджень», «Результати та їх обговорення», «Аналіз та узагальнення результатів»), висновків, переліку використаних джерел, який включає 383 посилання, додатки. Рукопис викладений на 281 сторінці комп'ютерного

набору, містить 8 таблиць в основній частині та 21 – у додатках, а також 58 рисунків.

В анотації автор виклав основні положення та результати досліджень дисертаційної роботи, окреслив наукову новизну та практичне значення.

У вступі наведено актуальність дисертаційного дослідження, сформульовано мету і завдання роботи, вказано методи досліджень, наукову новизну отриманих результатів та їх практичне значення, зазначено особистий внесок здобувача, зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами, висвітлено дані про апробацію результатів та публікації по темі роботи.

Огляд літератури присвячено висвітленню інформації із сучасних наукових джерел за темою дисертаційного дослідження. Описано загальну характеристику позаклітинних везикул, їх основні типи, протеїновий та молекулярний склад, механізми утворення та вивільнення, шляхи поглинання вмісту. Зроблено акцент на ролі позаклітинних везикул у розвитку злоякісних новоутворень та можливих стратегіях використання EVs з діагностичною та терапевтичною метою. Особлива увага приділена будові та функціям адаптерного протеїну Ruk/CIN85, його ролі в процесах везикулярного транспорту та канцерогенезі.

У розділі «Матеріали та методи досліджень» всебічно описано етапи досліджень, експериментальні моделі та методи, які використовувалися у дисертаційній роботі. Викладений опис експериментів узагальнено схемами досліджень, що значно збагачує викладення методичного матеріалу. Детально зазначено лабораторне обладнання, реактиви та програмне забезпечення, використане для аналізу даних та статистичної обробки.

У розділі «Результати досліджень та їх обговорення» дисертант детально представив та проаналізував отримані експериментальні результати власних досліджень. Охарактеризовано нуклеїновий та протеїновий склад зразків поту (загального, збагаченого EVs та отриманого з пластира). Представлено результати аналізу складу EVs, ізольованих з кондиціонованого середовища аденокарциномних клітин нирки миші лінії Rensa за умов нормоксії та гіпоксії з метою з'ясування особливості впливу гіпоксії на секрецію EVs. Продемонстровано результати вивчення особливостей хімічного складу EVs за допомогою обмеженої в часі Раманівської спектроскопії (Time-Gated Raman Spectroscopy, TG-RS) та підсиленої поверхнею обмеженої в часі Раманівської спектроскопії (Surface Enhanced Time-Gated Raman Spectroscopy, TG-SERS), за результатами яких рекомендовано корисні методологічні підходи для аналізу змін у молекулярному складі EVs.

У розділі детально проаналізовано особливості протеїнового складу EVs, що продукуються пухлинними клітинами Rensa за експериментальних умов та показано, що за умов гіпоксії вивільняються EVs, збагачені на мембранні протеїни, які беруть участь в адгезії, зв'язуванні рецепторів, забезпеченні імпорту вантажу в клітину-мішень. Наведено результати досліджень впливу адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на протеїновий склад EVs клітин Rensa та продемонстровано його потенційну регуляторну роль у

контролі протеїнового складу EVs залежно від парціального тиску кисню у середовищі культивування клітин. Представлено результати експериментів, що дозволили встановити здатність позаклітинних везикул, що продукуються клітинами ембріональної нирки людини лінії HEK293 з різним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 модулювати проліферативні властивості та рухливість клітин людських фібробластів *in vitro*. Продemonстровано здатність Ruk/CIN85 за умов надекспресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 модулювати склад як загальних клітинних протеїнів, так і протеїнів позаклітинних везикул. Приведено результати дослідження впливу EVs, ізольованих з кондиціонованого середовища аденокарциномних клітин грудної залози миші лінії 4T1 з up/down регулюванням адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на біологічні властивості клітин 4T1 WT. Аналіз цих даних дав можливість дисертанту встановити, що сублінії RukUp володіють високоінвазивними властивостями на противагу RukDown, для яких притаманні слабоінвазивні ознаки.

Отримані здобувачем результати детально проаналізовані в розділі «Аналіз та узагальнення результатів». Рівень викладення та аналізу значної кількості експериментальних даних свідчить про високий рівень фахової підготовки дисертанта та характеризує його як висококваліфікованого науковця.

Висновки ґрунтуються на результатах власних експериментальних досліджень. Сформульовано 7 висновків, які повністю відповідають меті та завданням дослідження.

9. Недоліки дисертації щодо її змісту та оформлення.

В процесі ознайомлення з дисертацією принципових зауважень не виникло, робота написана і оформлена кваліфіковано, матеріал викладено логічно і якісно ілюстровано.

В кінці підрозділів «Результатів дослідження» доречно вказувати, де опубліковані наведені результати.

Результати досліджень щодо аналізу EVs, ізольованих з поту людини, безперечно розширяють підґрунтя для потенційних можливостей впровадження їх у клінічну практику для неінвазивної диференційної діагностики. Проте, на сьогодні не досліджено вплив індивідуальних фізіологічних особливостей, таких як вік, стан фізичної підготовки, супутні захворювання на інтенсивність утворення та склад молекулярного вмісту позаклітинних везикул. Тому це може бути перешкодою для стандартизації протоколів у клінічному застосуванні методичних підходів і потребує подальшого дослідження.

Окрім того, недостатньо вивчена динаміка вивільнення позаклітинних везикул у відповідь на фізичне навантаження. Припускають, що клітинне походження позаклітинних везикул і їх молекулярний склад під час різних видів фізичних вправ можуть відрізнятися. Тому питання походження EVs у поті, індукованому фізичним навантаженням, у контексті потенційного використання з діагностичною метою, вимагають продовження досліджень.

Вказані зауваження не впливають на загальну позитивну оцінку роботи Артема ЖИВОЛОЖНОГО і не зменшують її наукову та практичну цінність.

Однак, в контексті дискусії до роботи є запитання:

1. Який Ви припускаєте механізм утворення EVs у потовій рідині під час фізичних навантажень, та яке є їх клітинне походження? Адже потова рідина – це продукт екскреції організму, що підлягає виведенню.
2. Для виділення EVs зазначеним у дисертаційній роботі методом було зібрано значний об'єм поту від кожної особи, що може бути складно здійснити для певних груп хворих. Які на Вашу думку, можливі заходи стандартизації збору матеріалу для подібних досліджень?
3. Чи відомі дані в літературних джерелах стосовно порівняння вмісту EVs в інших біологічних рідинах, наприклад, слині, збір якої є легшим з методологічної точки зору?

10. Висновок

Дисертаційна робота Артема ЖИВОЛОЖНОГО «Регуляторна роль позаклітинних везикул за умов норми та канцерогенезу» за актуальністю, науково-теоретичним рівнем, новизною постановки та розв'язанням проблем, практичним значенням відповідає вимогам Постанов 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 та «Про Порядок підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у закладах вищої освіти (наукових установах)» в редакції від 19.05.2023 р. №502, а здобувач заслуговує на присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія.

*Завідувачка лабораторії
експериментальних досліджень
Науково-дослідного інституту
експериментальної та клінічної
медицини НМУ імені О.О.Богомольця,
к.біол.н., старший дослідник*

Юлія КЛИСЬ