

Рішення
разової спеціалізованої вченої ради
про присудження ступеня доктора філософії

Здобувач ступеня доктора філософії **Артем ЖИВОЛОЖНИЙ**, 1993 року народження, громадянин України, освіта вища: закінчив у 2016 році Київський Національний університет імені Тараса Шевченка за спеціальністю «Біохімія», аспірант відділу сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, м. Київ, виконав акредитовану Освітньо-наукову програму підготовки докторів філософії в аспірантурі Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за спеціальністю 091 «Біологія».

Разова спеціалізована вчена рада, утворена наказом Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, м. Київ від «30» жовтня 2024 року № 39-а у складі:

Голови разової спеціалізованої вченої ради	Ольги МАТИШЕВСЬКОЇ , доктора біологічних наук, професора, провідного наукового співробітника науково-інформаційних та інноваційних досліджень Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
Рецензентів	Дениса КОЛИБО , доктора біологічних наук, професора, головного наукового співробітника відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України; Артема ТИХОМИРОВА , доктора біологічних наук, старшого наукового співробітника, завідувача відділу хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України;
Офіційних опонентів	Наталії КОЗИРОВСЬКОЇ , кандидата біологічних наук, старшого наукового співробітника, завідувачки лабораторії мікробної екології Інституту молекулярної біології та генетики НАН України; Юлії КЛИСЬ , кандидата біологічних наук, старшого дослідника, завідувачки лабораторії експериментальних досліджень Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця

на засіданні 18 грудня 2024 року прийняла рішення про присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 09 Біологія **Артему ЖИВОЛОЖНОМУ** на підставі публічного захисту дисертації «РЕГУЛЯТОРНА РОЛЬ ПОЗАКЛІТИННИХ ВЕЗИКУЛ ЗА УМОВ НОРМИ ТА КАНЦЕРОГЕНЕЗУ» за спеціальністю 091 Біологія.

Дисертацію виконано в Інституті біохімії ім. О.В Палладіна НАН України, м. Київ.

Наукові керівники: **Людмила ДРОБОТ**, д.б.н., проф., Інститут біохімії ім. О.В Палладіна НАН України, завідувач відділу сигнальних механізмів клітини;

Анатолій САМОЙЛЕНКО, д.б.н., ад'юнкт-професор, факультет біохімії та молекулярної медицини Університету Оулу (Фінляндія), старший науковий співробітник лабораторії біології розвитку.

Дисертацію подано у вигляді спеціально підготовленого рукопису українською мовою із дотриманням вимог пункту 6 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 від 12 січня 2022 року № 44 (зі змінами)).

Дисертація є завершеною науковою працею та відповідає галузі знань 09 Біологія, за спеціальністю 091 Біологія, виконана із дотриманням вимог академічної доброчесності, отримані результати якої мають важливе наукове, теоретичне та практичне значення в галузі знань 09 Біологія. Дисертаційна робота присвячена дослідженню функціональних та регуляторних властивостей позаклітинних везикул (EVs), отриманих із зразків людського поту та кондиційованого середовища вирощування псевдонормальних та пухлинних клітин за різних умов, зокрема нормоксії/гіпоксії та модулювання вмісту адаптерного протеїну Ruk/CIN85.

Наукова новизна дисертаційної роботи полягає у тому, що в ній вперше:

- в зразках позаклітинних везикул людського поту з'ясовано склад нуклеїнових кислот та протеїнів, ідентифіковано потенційні біомаркери для неінвазивного моніторингу інфекційних та онкологічних захворювань;
- в складі позаклітинних везикул, отриманих з пухлинних клітин, виявлено адаптерний протеїн Ruk/CIN85, який функціонує як регулятор біогенезу цих везикул та канцерогенезу загалом;
- продемонстровано здатність позаклітинних везикул, що продукуються пухлинними клітинами з різним вмістом Ruk/CIN85, модулювати проліферативні властивості, рухливість та інвазивність клітин *in vitro*.

Здобувач має 6 наукових робіт, які відповідають вимогам Постанови Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 р. і проіндексовані в базі даних Scopus, з них 4 статті - у фахових іноземних виданнях, віднесених до квартилю Q1 на дату опублікування:

1. Zhyvolozhnyi A, Samoilenko 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. Samoilenko 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, Samoilenko 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, Samoilenko 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>)

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>)

У дискусії взяли участь члени разової спеціалізованої ради: голова, рецензенти, офіційні опоненти, а також інші присутні, та висловили свої зауваження:

1. Ольга МАТИШЕВСЬКА, д.б.н., проф., провідний науковий співробітник науково-інформаційних та інноваційних досліджень Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України: без зауважень.

2. Денис КОЛИБО, д.б.н., проф., головний науковий співробітник відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, надав позитивну рецензію із зауваженнями і запитаннями:

- Яке, на думку автора, може мати фізіологічне значення підвищення секреції EVs клітинами за умов гіпоксії? Чи це явище є характерним виключно для пухлинних клітин, чи нормальні здорові клітини в організмі також можуть підвищувати секрецію EVs при кисневому голодуванні?
- Наскільки, на Вашу думку, може відрізнятись молекулярний склад везикул у різних біологічних рідинах, взятих від однієї особини в той самий час?
- В чому полягає, на думку автора, основна перевага використання біомаркерів поту для діагностики метаболічних, генетичних і інфекційних хвороб у порівнянні з аналогічними біомаркерами інших біологічних рідин?
- Як Ви пояснюєте природу «змін в амідних областях через зміни у хімічних зв'язків у протеїнах за умов гіпоксії», які були зафіксованих Вами при аналізі Раманівських спектрів?
- Чи вдавалось Вам спостерігати флуоресценцію везикул, що утворювалися в клітинах НЕК293 з up-регулюванням EGFP-Ruk/CIN85, які містили цей флуоресцентний білок? Можливо, це могло б бути цікавим способом дослідження особливостей їх поглинання і внутрішньоклітинного розподілу у клітинах мішенях?
- Чи можна вважати, що екстрацелюлярні везикули, виділені ультрацентрифугуванням і концентруванням у градієнті щільності, трохи відрізняються за властивостями? Який метод виділення, на Вашу думку, є більш ошадливим?
- В чому полягала ідея використання імуноелектронної мікроскопії для дослідження везикул?
- Чим можна пояснити недостатньо високий сигнал на присутність маркеру CD9 в тесті EchoView, хоча в блоті він достатньо помітний?
- Що можна сказати про представників архей, маркери яких були виявлені Вами у поті?
- Відповідно з Вашими даними, більшу частину нуклеїнових кислот в екстрацелюлярних везикулах склали tRNA і rRNA? Чи може це мати якесь біологічне

значення?

- Деякі переклади з англійської термінології не дуже подобаються, зокрема «біоти́пи РНК», «типи бактерій» та деякі інші.

3. **Артем ТИХОМИРОВ**, д.б.н., старший науковий співробітник, завідувач відділу хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, надав позитивну рецензію із зауваженнями:

- Результати досліджень EVs поту людини, індукованого фізичними вправами, є важливим внеском до розвитку неінвазивних методів моніторингу здоров'я. Проте, для повного використання потенціалу цих технологій потрібні подальші дослідження. Обмежена кількість зразків та можливість контамінації ускладнюють узагальнення результатів. Індивідуальна варіабельність може перешкоджати стандартизації аналізів. Метод EchoEasy вимагає значних об'ємів поту, що може бути проблематичним для клінічного застосування. Питання інтерпретації даних щодо бактерійних протеїнів залишаються відкритими.

- Вибір методу виділення EVs може більше впливати на визначення їх складу, ніж умови гіпоксії, що підкреслює необхідність стандартизації методів. Раманівська спектроскопія (TG-RS/TG-SERS) є швидшою, але менш детальною порівняно з мас-спектрометрією. Дослідження включає аналіз EVs лише з двох клітинних ліній (Rensa та 786-O), що обмежує узагальнення результатів. Для підтвердження діагностичної цінності TG-RS потрібні додаткові клінічні дослідження з різними методами виділення та аналізу EVs.

- У дисертації показано наявність різних молекулярних форм адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у EVs, але їхній вплив на фізіологічний ефект EVs на клітини-мішені залишається невідомим. Відсутність даних про вплив EVs *in vivo* на розвиток пухлин обмежує екстраполяцію результатів на клінічні випадки. Дослідження проводилося на одній лінії пухлинних клітин нирки миші та умовно нормальних клітинах ембріональної нирки людини, що обмежує узагальнення для інших типів клітин або пухлин. Для глибшого розуміння ролі Ruk/CIN85 у біогенезі EVs та їх впливу на пухлини й метастазування потрібні подальші дослідження з різними моделями *in vivo*.

- Як відрізняється за складом протеїнів піт, що виробляється еккриновими і апокриновими залозами? Чи проводили Ви у роботі окремий аналіз цих видів поту?

4. **Наталія КОЗИРОВСЬКА**, к.б.н., старший науковий співробітник, завідувачка лабораторії мікробної екології Інституту молекулярної біології та генетики НАН України, надала позитивний відгук із зауваженнями:

- Щодо змісту дисертації є декілька зауважень, перш за все, у контексті визначення складу EB бактерій. По-перше, це стосується методології виділення і аналізу EB бактерій; вибір набору EchoEasy для виділення одночасно EB людини і бактерій є дискусивним питанням, оскільки структура і склад клітинних мембран відрізняються у ссавців і бактерій, відповідно, методи виділення у них різні (окрім ультрацентрифугування і преципітації). Зовнішньо-клітинні мембранні везикули (OMVs, як зазначає здобувач), як частина бактерійного везикулуму поту людини, що репрезентують лише грамнегативні бактерії, дивом було виділено цим методом. Окрім них, у мікробному везикулومی були присутніми *мікровезикули* численних грампозитивних бактерій (*Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Cutibacteria*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* та ін.), які також мають відмінності у складі мембрани, порівняно з еукаріотичними EB, і теоретично, набір EchoEasy для їхнього виділення не є практичним.

- По-друге, на стор. 127 зазначено, що «Серед бактерійних протеїнів, які найчастіше зустрічаються в EVs поту, були убіквітин і гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (ЕС 1.2.1.-), які сприяють вірулентності багатьох патогенних бактерій [155]». Термін «бактерійних» у реченні – зайвий, оскільки убіквітин - регуляторний білок, притаманний виключно еукаріотам, який виконує функцію посттрансляційної модифікації білків. Гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа також належить до білків еукаріотів. Обидва не мають стосунку до вірулентності бактерій (некоректне цитування [155]).

- Також викликає питання про підготування до збору поту у здорових добровольців (обробка шкіри миттям під душем очевидно недостатня для очищення шкіри від мікробіоти та її EB). Було б непогано більш ретельно опитувати донорів стосовно стану здоров'я, попереджати про дієту і вживання їжі перед експериментом, а також можливо брати більшу вибірку добровольців для статистики, оскільки контрольної групи хворих з етичної позиції не було.

- Окрім вищезазначених питань, на їхньому тлі виникають питання щодо визначених у здорових добровольців потенційних біомаркерів раку та інфекційних захворювань серед протеїнів EB поту: це ранні сигнали порушень чи фізіологічний процес очищення клітин від непотрібних протеїнів? чи можна рекомендувати збір поту для ранньої діагностики раку людей? Цікавим є також, які протеїнові маркери інфекційних захворювань зафіксовано серед протеїнів EB поту (висновок 2)? Які думки є у здобувача стосовно механізму відокремлення еукаріотичних EB від бактерійних у поту людини за допомогою альгінатного пластиру?

- Як на мене, здобувачем не достатньо наведено аргументів щодо впливу адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на формування складу карго везикул при канцерогенезі та яких саме їхніх популяцій? Це найцікавіша, ґрунтовна частина дисертаційної роботи і хотілося б, щоб вона була продовжена на більш різноманітному матеріалі у подальших проектах.

- Є зауваження щодо оформлення роботи, наприклад, використання англійських слів, які мають аналоги в українській мові не є виправданим, наприклад, small RNA, DNA, OMV, up-регулювання, та термінів: «протеїновий та молекулярний склад позаклітинних везикул» (с. 37) - чи протеїновий не є молекулярним?; подвійні мембрани (с. 98) (двошарова мембрана). Назва розділу 2.3 не відповідає змісту.

5. **Юлія КЛИСЬ**, кандидат к.б.н., старший дослідник, завідувачка лабораторії експериментальних досліджень Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, надала позитивний відгук із зауваженнями:

- 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.

Інші присутні на захисті фахівці, без зауважень.

Результати відкритого голосування:

«За» 5 членів ради,

«Проти» немає членів ради.

На підставі результатів відкритого голосування разова спеціалізована вчена рада присуджує Артему ЖИВОЛОЖНОМУ ступінь доктора філософії з галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія.

Відеозапис трансляції захисту дисертації додається.

Голова разової
спеціалізованої
вченої ради

Ольга МАТИШЕВСЬКА,

Підпис О. Матишевської
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна
національної академії наук України
"19" 12 2024 р.

