

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, кандидата біологічних наук, старшого наукового
співробітника, завідувачки лабораторії Наталії КОЗИРОВСЬКОЇ
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

Екстрацелюлярні мембранні везикули (ЕВ) відіграють визначну роль у паракринній міжклітинній комунікації як у нормі, так і за умов патології. Необхідними умовами для подальшого прогресу у використанні ЕВ в біомедицині є, окрім фундаментальних досліджень ЕВ, розробка новітніх технологій їхнього виділення та діагностики презентованих везикулами маркерних біомолекул. У дисертаційній роботі А. Живоложного презентовано обидва ці сучасні напрямки роботи, результати яких є вагомим внеском у розвиток як фундаментальної, так і прикладної науки, що відповідає вимогам до дисертаційних робіт. А саме: 1) дослідження особливостей продукування, молекулярного складу та функціональних властивостей ЕВ, виділених з поту людини та пухлинних клітин, а також з'ясування впливу фізико-хімічних умов та, конкретно, адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на зазначені показники, наближає до розуміння ролі біомолекул, асоційованих з ЕВ, у регулюванні канцерогенезу та використання їх як джерела біомаркерів хвороб; 2) розробка новітнього методу забору ЕВ з поту людини як неінвазивного методу діагностики стану здоров'я людини. Як набута здобувачем інформація про особливості нуклеїнового та протеїнового складу ЕВ поту людини, так і неінвазивний метод забору ЕВ з поту пацієнтів мають потенціал у використанні в біомедицині.

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 у рамках двох НДР (2016-2019 № держреєстрації 0117U004344 та 2020-2024 рр., № державної реєстрації 0120U002191), а також в лабораторії біології розвитку Університету Оулу у Фінляндії за підтримки десятка престижних дослідницьких грантів та програм.

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

Робота Артема Живоложного у частині визначення молекулярного карго загального везикулому поту умовно здорової людини є піонерською; та як це часто буває з такими роботами, має певні застереження, переважно технічного характеру (викладені нижче), які у процесі розвитку цього перспективного напрямку буде подолано. На висновки та практичні рекомендації, сформульовані у дисертації, вони суттєво не впливають.

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

НДР виконано на достатніх вибірках досліджуваних об'єктів, і ті висновки, що здобувач зробив у дисертаційній роботі, цілковито обґрунтовано теоретично, підтверджено експериментально та «затверджено» рецензентами статей за авторства здобувача, опублікованих у наукових журналах 1-го квартилю.

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

Артемом Живоложним вперше продемонстровано, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 є новим компонентом ЕВ, який продукується пухлинними клітинами і спроможний контролювати склад ЕВ за умов нормоксії та гіпоксії та відігравати роль у канцерогенезі. Автором вперше охарактеризовано особливості нуклеїнового та білкового складу ЕВ поту людини, індукованого фізичними вправами, зокрема, виявлено біомолекули бактерій, типових не лише для мікробіому шкіри. Новим здобутком є також те, що ЕВ поту несуть матеріал, отриманий не лише зі шкіри, але й з інших органів, і таким чином можуть містити потенційні маркери захворювань або розладу здоров'я.

6. Практичне значення одержаних результатів

Комплексне використання Раманівської спектроскопії та мас-спектрометричного аналізу, яке забезпечує виявлення змін у молекулах, асоційованих з ЕВ, за умов, зокрема, гіпоксії, автор рекомендує для швидкого аналізу змін у молекулярному складі ЕВ, залежно від умов навколишнього середовища. ЕВ з поту людини можуть бути використані як джерело потенційних біомаркерів для неінвазивного моніторингу стану здоров'я людини. Результати дисертаційної роботи рекомендовано для використання у курсі «Сигнальні механізми клітин» для аспірантів на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія, за спеціальністю 091 Біологія, Біохімія.

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 посилань, додатки. Рукопис викладений на 281 сторінці комп'ютерного набору, містить 8 таблиць в основній частині та 21 – у додатках, а також 58 рисунків.

В огляді літератури охарактеризовано екстрацелюлярні везикули (ЕВ) та їхні основні типи, а також описано і представлено схематично молекулярне карго везикул. Здобувачем надано ґрунтовну інформацію щодо механізмів біогенезу та вивільнення ЕВ. У цьому розділі висвітлено роль везикул в міжклітинних комунікаціях, яка важлива як для нормального стану, так і патології. Особливо детально описано роль ЕВ у розвитку злоякісних новоутворень та можливості застосування ЕВ як наноплатформи для переносу ліків. Окремий підрозділ присвячено характеристикам адаптерного протеїну Ruk/CIN85 як багатоцільової платформи для організації надмолекулярних комплексів, які регулюють фізіологічні процеси через сигнальні мережі клітин, зокрема, його роль у канцерогенезі.

У другому розділі описано методи та об'єкт дослідження. Автором описано всі методи використані в роботі. Власні дослідження ґрунтовно описано у третьому розділі. У розділі «Узагальнення результатів дослідження» здобувач логічно підводить підсумок проведених досліджень, які у повній мірі відповідають поставленій меті і завданням роботи. Достатня кількість проведених досліджень дозволила провести достовірну оцінку отриманих результатів. Завершується робота висновками, які впливають зі змісту роботи, є логічними і відображають основні результати дисертаційної роботи.

9. Недоліки дисертації щодо її змісту та оформлення

1) Щодо змісту дисертації є декілька зауважень, перш за все, у контексті визначення складу ЕВ бактерій. По-перше, це стосується методології виділення і аналізу ЕВ бактерій; вибір набору EuxEasy для виділення одночасно ЕВ людини і бактерій є дискусійним 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 везикулому поту людини, що репрезентують лише грамнегативні бактерії, дивом було виділено цим методом. Окрім них, у мікробному везикуломі були присутніми *мікроевезикули* численних грампозитивних бактерій, які також мають відмінності у складі мембрани, порівняно з еукаріотичними ЕВ, і теоретично, набір EhoEasy для їхнього виділення не є практичним.

2) 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]).

3) Також викликає питання щодо пробопідготування до збору поту у здорових добровольців (обробка шкіри миттям під душем очевидно недостатня для очищення шкіри від мікробіоти та її ЕВ). 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.

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

5) 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 проєктах.

6) Є зауваження щодо оформлення роботи, наприклад, використання англійських слів, які мають аналоги в українській мові, не є виправданим, наприклад, small RNA, DNA, OMV. Назва розділу 2.3 не відповідає змісту.

Зазначені зауваження жодним чином не знижують наукової цінності дисертаційної роботи здобувача Артема ЖИВОЛОЖНОГО.

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.

Кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник,
завідувачка лабораторії мікробної екології
Інституту молекулярної біології і
генетики НАН України

Наталія КОЗИРОВСЬКА