

РЕЦЕНЗІЯ
на дисертаційну роботу
Артема ЖИВОЛОЖНОГО
**«РЕГУЛЯТОРНА РОЛЬ ПОЗАКЛІТИННИХ ВЕЗИКУЛ ЗА УМОВ
НОРМИ ТА КАНЦЕРОГЕНЕЗУ»,**
яка подається на здобуття наукового ступеня
доктора філософії
у галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія

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.

Сказаним визначається актуальність теми та практична значимість результатів дисертаційної роботи Артема ЖИВОЛОЖНОГО, повністю присвяченої дослідженню кількості, розмірів, молекулярного складу та функціональних властивостей EVs, ізольованих з поту людини та кондиціонованого середовища пухлинних клітин, з'ясуванню впливу нормоксії/гіпоксії й адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на зазначені показники.

У першому розділі дисертаційної роботи детально описано й проаналізовано основні типи EVs, особливості їх протеїнового та молекулярного складу, механізми утворення та вивільнення EVs, шляхи їх поглинання реципієнтними клітинами, участь EVs у міжклітинній комунікації та роль у розвитку злоякісних новоутворень. Особливу увагу приділено аналізу сучасного стану проблеми стосовно стратегій використання EVs у діагностиці захворювань. Необхідно зазначити, що матеріал, викладений в огляді літератури, свідчить про високу наукову ерудицію дисертанта, а також про його

здатність до критичного аналізу і узагальнення фактичного матеріалу. На жаль, в розділі «Огляд літератури» мають місце описки, друкарські помилки, важкі стилістичні звороти, невдалі вирази та переклади термінів з англійської мови.

Для виконання поставлених завдань дисертант використав низку сучасних методів біохімії, молекулярної та клітинної біології: збирання поту з верхньої частини тіла людини (рук і тулуба) після 30-хвилинних вправ на велотренажері, методи роботи з культурами клітин, отримання субліній пухлинних клітин зі стабільною надекспресією рекомбінантних протеїнів, лентивірусну shRNA технологію, ультрацентрифугування в градієнті щільності, виділення зразків EVs за допомогою комерційних наборів ExoEasy та ExoSpin, аналіз відстеження наночастинок (NTA), аналіз експресії біомаркерів EVs та кількісне визначення EVs з використанням платформи ExoView R100, електрофорез протеїнів у ПААГ та нуклеїнових кислот в агарозному гелі, Вестерн-блот аналіз, qRT-PCR, електронну мікроскопію та імуноелектронну мікроскопію, конфокальну імунофлуоресцентну мікроскопію, створення бібліотек RNA-seq методом Next-Generation Sequencing, Раманівську спектроскопію (TG-RS/TG-SERS), мас-спектрометричний аналіз протеїнового складу (LS-MS), аналіз проліферативної активності (MTT-тест та IncuCyte), дослідження міграційного потенціалу (метод заростання подряпини у клітинному моношарі та IncuCyte), дослідження інвазивності з використанням модифікованої камери Бойдена.

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.

Особистий внесок здобувача та новизна отриманих результатів.

Дисертаційна робота була виконана у відділі сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України та лабораторії біології розвитку Університету Оулу «Laboratory of Developmental Biology, Disease Networks Research Unit, Faculty of Biochemistry and Molecular Medicine, University of Oulu and Kvantum Institute, Oulu, Finland».

У процесі виконання дисертаційної роботи автором особисто вибрано та проаналізовано наукову літературу за темою наукового дослідження. Дисертантом, спільно з науковими керівниками розроблено програму проведення досліджень та вибрано методи розв'язання поставлених завдань.

Експериментальна частина дисертаційної роботи та аналіз даних проводився здобувачем особисто, за винятком експериментів, що потребували особливих знань та навичок, а також специфічного обладнання. В таких випадках дослідницька робота проводилась спільно із співробітниками відповідних установ.

Вимірювання TG-RS і TG-SERS проводилися у «VTT Technical Research Centre of Finland, Oulu, Finland» та «Institute of Photonics, University of Eastern Finland, Joensuu, Finland» спільно з PhD Martin Kögler. Мас-спектрометричний аналіз проводився у «Biocenter Oulu Mass spectrometry core facility, Oulu, Finland» спільно з Ulrich Bergmann та Hannele Härkman. Електронна мікроскопія та імуноелектронна мікроскопія проводилась спільно з Ilkka Miinalainen та Mika Kaakinen в «Biocenter Oulu Electron Microscopy core facility, Oulu, Finland». Дослідження впливу надекспресії Ruk/CIN85 на динаміку міграцій клітин Rensa та 4T1 проводились за консультацій к.б.н. Горак І.Р, к.б.н. Скатерної Т.Д., к.б.н. Худякової О.В. Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України. DNA та RNA секвенування зразків поту проводилося в «Biocenter Oulu, Sequencing core facility, Oulu, Finland». Аналіз даних DNA та RNA секвенування проводився спільно з PhD Geneviève Bart «Faculty of Biochemistry and Molecular Medicine, Disease Networks Research Unit, Laboratory of Developmental Biology, Kvantum Institute, Infotech Oulu, University of Oulu, Oulu, Finland» та PhD Daniel Fischer «Production Systems, Natural Resources Institute Finland (LUKE), Jokioinen, Finland». Результати вищезгаданих досліджень опубліковано у спільних публікаціях.

Дисертантом вперше охарактеризовано особливості нуклеїнового та протеїнового складу EVs поту людини, індукованого фізичними вправами.

Встановлено, що EVs поту людини містять різноманітні нуклеїнові кислоти, включаючи DNA та RNA людського і мікробного походження. Виявлено також нуклеїнові кислоти бактерій, архей і вірусів, типових для мікробіому шкіри. 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. 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.

На моделі аденокарциномних клітин нирки миші лінії Rensa вперше продемонстровано, що Ruk/CIN85 є новим компонентом EVs, який відіграє важливу роль у біогенезі везикул, регулюванні їх кількості та складу за різних кисневих умов середовища. Встановлено також, що адаптерний протеїн EGFP-Ruk/CIN85 є компонентом EVs, що продукуються стабільними трансфектантами клітин ембріональної нирки людини лінії HEK293. Продemonстровано 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. На моделі аденокарциномних клітин грудної залози миші лінії 4T1 з up- та down-регулюванням Ruk/CIN85 виявлено, що EVs із підвищеним вмістом Ruk/CIN85 з клітин 4T1 RukUp підсилюють агресивність клітин 4T1 WT, тоді як зі зниженим вмістом з клітин 4T1 RukDown — пригнічують. Ці дані підкреслюють важливу роль Ruk/CIN85 у біогенезі EVs та їх впливі на канцерогенез.

Повнота викладу результатів дисертації в опублікованих працях

Результати дисертаційного дослідження Артема ЖИВОЛОЖНОГО повністю висвітлено у 6 наукових статтях, опублікованих у фахових міжнародних та вітчизняних виданнях, що входять до наукометричних баз Scopus та Web of Science відповідно до вимог Постанови №44 Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р. «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії». 4 з цих статей опубліковані у виданнях Q1-Q2, що свідчить про актуальність та високий рівень результатів досліджень, які також були апробовані на 3 вітчизняних та 2 міжнародних наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертація містить такі розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення, аналіз та узагальнення результатів досліджень, висновки, список використаних джерел, додатки. Рукопис викладений на 281 сторінках комп'ютерного набору, містить 8 таблиць в основній частині та 21 таблицю в додатках, 56 рисунків. Список використаних джерел включає 383 найменувань.

Зауваження та запитання.

Робота Артема ЖИВОЛОЖНОГО виконана на високому методичному рівні та викладена кваліфікованою науковою мовою. Отже, зауважень до роботи у мене практично немає, а тому наводжу деякі запитання, які можуть торкатися піднятої в роботі проблематики:

1. 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?
2. Наскільки, на Вашу думку, може відрізнятися молекулярний склад везикул у різних біологічних рідинах, взятих від однієї особи в той самий час?
3. 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?
4. 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?
5. 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 оццадливим?
6. В чому полягала ідея використання імуноелектронної мікроскопії для дослідження везикул?
7. Чим можна пояснити недостатньо високий сигнал на присутність маркеру CD9 в тесті EchoView, хоча в блоті він достатньо помітний?
8. Що можна сказати про представників архей, маркери яких були виявлені Вами у поті?
9. Відповідно з Вашими даними, більшу частину нуклеїнових кислот в

екстрацелюлярних везикулах склали tRNA і rRNA? Чи може це мати якесь біологічне значення?

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

Загальний висновок.

Дисертаційна робота Артема ЖИВОЛОЖНОГО «РЕГУЛЯТОРНА РОЛЬ ПОЗАКЛІТИННИХ ВЕЗИКУЛ ЗА УМОВ НОРМИ ТА КАНЦЕРОГЕНЕЗУ» є завершеним науковим дослідженням, яке за актуальністю, новизною та обґрунтованістю наукових результатів, що мають теоретичне та практичне значення і повноцінно відображені в наукових публікаціях, відповідає вимогам до наукової кваліфікації ступеня доктора філософії у галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія, встановлених Постановою КМУ «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» від 12.01.2022 р. № 44.

Дисертант Артем ЖИВОЛОЖНИЙ може бути допущений до офіційного захисту на здобуття ступеня доктора філософії і заслуговує на присудження відповідного ступеня.

Рецензент

доктор біологічних наук, професор,

головний науковий співробітник Інституту біохімії

ім. О.В. Палладіна НАН України

Денис КОЛИБО