

**РЕЦЕНЗІЯ**  
**на дисертаційну роботу Артема ЖИВОЛОЖНОГО**  
**за темою «Регуляторна роль позаклітинних везикул за умов**  
**норми та канцерогенезу»,**  
**що подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії**  
**в галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія**

Дисертація Живоложного А.Ю. присвячена дослідженню основних характеристик, молекулярного складу та функціональних властивостей позаклітинних везикул (extracellular vesicles, EVs), виділених з поту людини, а також із середовища, в якому вирощувалися умовно нормальні та онкотрансформовані клітини. У роботі також підлягало з'ясуванню ефекти нормоксії та гіпоксії й адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на структурно-функціональні особливості EVs.

**Актуальність обраної теми дослідження.** Функціональний стан клітин у багатоклітинних організмах залежить від надходження сигнальної інформації із зовнішнього та внутрішнього середовища, яка сприймається рецепторами, локалізованими на плазматичній мембрані або у цитоплазмі. Трансдукція сигналів досередини клітини опосередковується взаємодією між сигнальними протеїнами, які організовані у складні сигнальні мережі. EVs як унікальні носії та передавачі біологічної інформації все більше привертають до себе увагу дослідників. Утворення мембранних позаклітинних везикул характерно для бактерій, архей, рослин та тварин й людини. Вперше EVs, що циркулюють у крові людини, описав Р. Wolf у 1967 р., довівши їхнє тромбоцитарне походження. Пізніше було встановлено, що утворення мікрочасток характерно для багатьох типів клітин, у тому числі для лейкоцитів, еритроцитів, лейоміоцитів, ендотеліоцитів, стовбурових, а також пухлинних клітин. EVs виявлені у всіх рідинах організму (кров, лімфа, сеча, слина, слюза, піт), але їхня будова, механізми утворення, молекулярний склад та біологічні функції досліджено недостатньо, що вимагає подальших зусиль для розуміння їхньої

ролі в організмі та механізмів дії. Протягом тривалого часу вважалося, що EVs – інертне «сміття», або «клітинний пил», який вивільняється клітинами в процесі життєдіяльності. Втім, останніми роками стало зрозуміло, що EVs, які утворюються шляхом екзоцитозу, відіграють ключову роль у міжклітинній комунікації, відіграючи роль інформаційного сполучення між різними клітинами, передають сигнали всередині організму, регулюючи в такий спосіб різні біологічні процеси. EVs містять різні біомолекули: протеїни (у тому числі ензими, фактори росту та цитокіни, транскрипційні фактори), ДНК, РНК, ліпіди та метаболіти, і захоплюються реципієнтними клітинами, змінюючи їхню фізіологічну активність. EVs залучаються до виконання патофізіологічної ролі за розвитку різних захворювань, включаючи атеросклероз і гіпертонічну хворобу, тромботичні стани, нейродегенеративні стани та неврологічні порушення, розповсюдження вірусів та пріонів, патологічний ангиогенез, онкологічні захворювання тощо.

Функції EVs визначаються їхнім складом, у тому числі протеомом, який залежить від типу клітини, що їх продукує, і стимулу, який спричинив їх утворення. На сьогодні накопичено значний об'єм експериментальних даних щодо зростання рівня певних типів EVs у пацієнтів з гострим коронарним синдромом, атеросклерозом, ішемічним інсультом, діабетом, серцевою та легеневою гіпертензією, тромботичними станами, а також за онкологічних хвороб. Ці спостереження відкривають перспективи використання EVs та їхнього протеому як маркерів відповідних захворювань, а також показників ефективності лікування. Піт є перспективною біологічною рідиною для моніторингу молекулярних змін в організмі, викликаних захворюваннями та впливом навколишнього середовища. Він може слугувати альтернативою аналізу крові завдяки неінвазивному способу забору в реальному часі. На момент початку виконання представленого дисертаційного дослідження дані про особливості нуклеїнового та протеїнового складу EVs поту, що виділяється під час фізичних вправ, та їх діагностичне використання, були повністю відсутні, що підкреслює актуальність теми.

Раніше було показано, що інтенсивність продукування EVs корелює з метастатичним потенціалом пухлинних клітин. 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 ангіогенезу. EVs можуть пригнічувати імунітет організму, посилювати пухлинний ріст і зумовлювати розвиток резистентності до протипухлинних препаратів. У попередніх дослідженнях, проведених у відділі сигнальних механізмів клітини ІБХ НАНУ було встановлено, що підвищення експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в пухлинних клітинах посилює їх малігнізацію. Ruk/CIN85 бере участь у ліганд-індукованому ендоцитозі, внутрішньоклітинному трафіку мембранних везикул та секреції EVs. Молекулярні механізми впливу EVs на процеси за пухлинного росту залишаються недостатньо вивченими. Дослідження EVs, що продукуються пухлинними клітинами з різним рівнем агресивності та вмістом Ruk/CIN85 за умов гіпоксії та нормоксії, є актуальними для діагностики та прогнозу онкологічних захворювань. Для цього необхідно глибоко вивчити механізми біогенезу EVs, опосередковані Ruk/CIN85, та їхні регуляторні ефекти, а також можливість використання Ruk/CIN85 як мішені у протипухлинній терапії. Важливим аспектом роботи Артема Живоложного є пошук і вдосконалення методів ізолювання та характеристики EVs, оскільки прогрес у зазначеній галузі молекулярної та клітинної біології й експериментальної медицини тісно пов'язаний з використанням сучасних і розробкою новітніх технологій для ізолювання та характеристики EVs.

Слід зазначити, що дана наукова проблема жваво досліджується у світі. Кількість публікацій за темою “extracellular vesicles” стрімко зростає: зокрема, за пошуком у базі даних Pubmed їх кількість становить 47692 статті, що свідчить про беззаперечну затребуваність вирішення означеної наукової проблеми. Отже, актуальність обраної теми дисертаційного дослідження здобувача не викликає жодних сумнівів.

**Ступінь обґрунтованості основних положень, висновків сформульованих у дисертації.** Метою представленої дисертаційної роботи було дослідити кількість, розміри, молекулярний склад та функціональні властивості EVs, ізольованих з поту людини та кондиціонованого середовища псевдонормальних та пухлинних клітин, з'ясувати вплив нормоксії/гіпоксії й адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на зазначені показники.

Завдання, які було сформульовано у роботі, є цілком адекватні поставленій меті. Зокрема, дисертантом було заплановано 7 завдань:

1. Охарактеризувати склад нуклеїнових кислот, що містяться в EVs з поту людини, індукованого фізичними навантаженнями.

2. Дослідити особливості протеїнового складу EVs з поту людини, індукованого фізичними навантаженнями, та оцінити можливість використання EVs з поту як джерела потенційних протеїнових біомаркерів.

3. Проаналізувати особливості хімічного та протеїнового складу EVs, що продукуються клітинами карциноми нирки миші лінії Rensa та людини лінії 786-O за умов нормоксії/гіпоксії.

4. З'ясувати вплив нормоксії/гіпоксії на кількість, розміри та склад EVs, ізольованих з кондиціонованого середовища клітин карциноми нирки миші лінії Rensa з різним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85.

5. Дослідити вплив EVs, що продукуються клітинами ембріональної нирки людини лінії HEK293 з різним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85, на клітинні відповіді *in vitro*.

6. Проаналізувати особливості протеїнового складу EVs, що продукуються клітинами ембріональної нирки людини лінії HEK293 залежно від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85.

7. Дослідити вплив EVs, ізольованих з кондиціонованого середовища аденокарциномних клітин грудної залози миші лінії 4T1 з up/down регулюванням адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на біологічні відповіді клітин 4T1 WT *in vitro*.

Усі поставлені у роботі завдання були виконані у повній мірі, чому посприяло застосування цілого арсеналу сучасних біохімічних та фізико-хімічних методів дослідження. Зокрема, дисертантом було використано методи забору біоматеріалу (зразків поту), культивування еукаріотичних клітин і оцінка їхньої життєздатності, отримання субліній пухлинних клітин зі стабільною надекспресією рекомбінантних протеїнів, лентивірусна shRNA технологія, 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, електронна мікроскопія та імуноелектронна мікроскопія, конфокальна імунофлуоресцентна мікроскопія, створення бібліотек RNA-seq методом Next-Generation Sequencing, Раманівська спектроскопія (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) та ін. Автором опановано вміння працювати з високотехнологічним спеціалізованим обладнанням, таким як електронний і конфокальний мікроскоп, магнітно-резонансний спектрометр, мас-спектрометр і раманівський спектрометр. Аналіз та інтерпретацію даних авторові дозволило зробити його вміння працювати з відповідними біоінформаційними базами даних.

На підставі ретельного ознайомлення з результатами дисертаційного дослідження Артема Живоложного можна зробити висновок, що наукові положення, висновки і рекомендації, які сформульовані у дисертації, є науково обґрунтованими, достовірними, містять усі елементи новизни та мають науково-практичну цінність для галузі знань з біології.

**Новизна основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, а також проведених наукових досліджень і одержаних результатів.** Погоджуючись в цілому із сформульованими в дисертаційному

дослідженні конкретними положеннями, які визначають наукову новизну отриманих результатів, особливо наголошу на окремих з них, що, на мою думку, є найбільш важливими і вагомими.

- Вперше охарактеризовано нуклеїновий склад екзосом поту людини, індукованого фізичними вправами. Встановлено, що екзосоми поту містять різноманітні нуклеїнові кислоти, включаючи ДНК та РНК як людського, так і мікробного походження. Найбільш представленою була мітохондрійна ДНК, тоді як більшість ідентифікованих РНК складали тРНК, а також меншою мірою мікроРНК, мРНК, малі ядерні РНК, малі нуклеоларні РНК та інші малі РНК. Також виявлено нуклеїнові кислоти бактерій, архей і вірусів, характерних для мікробіому шкіри.
- Вперше охарактеризовано протеїновий склад екзосом поту людини, індукованого фізичними вправами. Встановлено відмінності у складі протеїнів, виявлених у різних індивідуальних зразках екзосом та загального поту людини, ідентифіковано потенційні біомаркери раку та інфекційних захворювань серед протеїнів екзосом поту. Показано, що альгінатний пластир може бути використаний для збору екзосом людського поту з метою їх відокремлення від бактеріальних екзосом.
- Вперше показано, що комплексне використання 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 встановлено, що рівень експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 значно впливає на кількість та склад екзосом. Виявлено суттєві зміни вмісту Ruk/CIN85 та маркерних протеїнів екзосом, таких як Alix і CD81, у везикулах залежно від парціального тиску кисню у середовищі. Вперше продемонстровано, що Ruk/CIN85 є новим

компонентом екзосом, який відіграє важливу роль у біогенезі везикул та регулюванні їхнього складу за різних кисневих умов середовища.

- Встановлено, що адаптерний протеїн EGFP-Ruk/CIN85 є компонентом екзосом, що продукуються стабільними трансфектантами клітин ембріональної нирки людини лінії HEK293. Продemonстровано здатність екзосом 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 екзосомах, є метаболічними ензимами.
- Виявлено, що екзосоми, які секретуються аденокарциномними клітинами грудної залози миші лінії 4T1 з up- та down-регулюванням Ruk/CIN85, містять різні молекулярні форми адаптерного протеїну та диференційно модулюють проліферативну активність, рухливість і інвазивність батьківських клітин 4T1. Екзосоми від клітин з підвищеною експресією Ruk/CIN85 (RukUp) підвищують агресивність, тоді як екзосоми від клітин зі зниженою експресією (RukDown) знижують ці показники. Встановлено також здатність EVs, що походять з пухлинних клітин, які відрізняються за рівнем експресії Ruk/CIN85, диференційно модулювати проліферативну активність, рухливість і інвазивність клітин-реципієнтів. Отримані дані вказують на ключову роль Ruk/CIN85 у біогенезі екзосом та свідчать про їх вплив на процеси, асоційовані з пухлинним ростом.

**Практичне значення одержаних результатів.** Характеристика складу екзосом (EVs), виділених 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. Самі

EVs з поту можуть бути використані як джерело потенційних біомаркерів для неінвазивного моніторингу здоров'я людини.

1. Дослідження мікробіому шкіри:

- Індивідуальна варіабельність: висока індивідуальна варіабельність бактерійного складу поту дозволяє детально вивчати мікробіом шкіри кожної людини. Це може допомогти виявити специфічні бактерії, які асоціюються з різними станами шкіри, такими як акне, екзема або псоріаз.
- Персоналізовані підходи: результати досліджень можуть бути використані для розробки персоналізованих підходів до лікування та догляду за шкірою, враховуючи унікальний мікробіом кожної людини.

2. Неінвазивний моніторинг здоров'я:

- Біомаркери та виявлення захворювань на ранніх стадіях: EVs з поту можуть містити біомаркери, які відображають стан здоров'я людини. Це дозволяє використовувати піт як неінвазивний зразок для моніторингу різних фізіологічних та патологічних станів. Аналіз EVs з поту може допомогти в ранньому виявленні захворювань, таких як діабет, серцево-судинні захворювання або інфекції, що дозволить своєчасно вжити необхідних заходів.

3. Розробка нових діагностичних методів:

- Технології аналізу: розробка нових технологій для аналізу EVs з поту може призвести до створення більш точних та чутливих методів діагностики. Це може включати використання мас-спектрометрії, секвенування ДНК або інших передових методів.
- Портативні пристрої: можливість створення портативних пристроїв для аналізу поту в реальному часі, що дозволить проводити моніторинг здоров'я безпосередньо в домашніх умовах або в польових умовах.

4. Профілактика та здоровий спосіб життя:



- Індивідуальні рекомендації: на основі аналізу EVs з поту можна розробляти індивідуальні рекомендації щодо харчування, фізичної активності та інших аспектів здорового способу життя.
- Моніторинг ефективності: регулярний аналіз EVs з поту може допомогти відстежувати ефективність різних оздоровчих програм та коригувати їх відповідно до індивідуальних потреб.

Таким чином, результати дослідження EVs поту мають значний потенціал для покращення діагностики, моніторингу та профілактики захворювань, а також для розвитку персоналізованої медицини та здорового способу життя.

Встановлено, що EVs, виділені з пухлинних клітин, які відрізняються за рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85, здатні диференційно модулювати проліферативну активність, рухливість та інвазивність клітин-реципієнтів. Ці результати мають кілька важливих практичних аспектів:

#### 1. Розробка нових терапевтичних підходів:

- Таргетна терапія: виявлення ролі Ruk/CIN85 у біогенезі та функціонуванні екзосом відкриває можливості для розробки нових таргетних терапевтичних стратегій. Наприклад, інгібітори Ruk/CIN85 можуть бути використані для зменшення агресивності пухлинних клітин шляхом модифікації складу екзосом.
- Імунотерапія: знання про те, як екзосоми з різним вмістом Ruk/CIN85 впливають на клітини-реципієнти, може бути використане для розробки імунотерапевтичних підходів, спрямованих на зміну імунної відповіді організму на пухлину.

#### 2. Діагностика та прогнозування:

- Біомаркери: протеїни, виявлені в екзосомах, можуть використовуватися як біомаркери для ранньої діагностики раку та моніторингу ефективності лікування. Наприклад, підвищений рівень Ruk/CIN85 в екзосомах може свідчити про агресивний перебіг захворювання.

- Прогнозування: аналіз складу екзосом може допомогти прогнозувати поведінку пухлини, включаючи її здатність до метастазування та резистентність до терапії.

### 3. Персоналізована медицина:

- Індивідуалізація лікування: розуміння механізмів, за допомогою яких екзосоми впливають на клітини-реципієнти, дозволяє розробляти індивідуальні терапевтичні підходи, що враховують специфічні особливості пухлини кожного пацієнта.
- Моніторинг лікування: відстеження змін у складі екзосом під час лікування може бути використане для коригування терапевтичних стратегій у реальному часі, забезпечуючи більш ефективне та адаптивне лікування.

Таким чином, результати дослідження мають значний потенціал для покращення діагностики, прогнозування та лікування онкологічних захворювань, сприяючи розвитку персоналізованої медицини та нових терапевтичних підходів.

**Достовірність основних наукових положень, висновків, практичних рекомендацій та одержаних результатів.** Достовірність основних наукових положень, висновків, практичних рекомендацій та одержаних результатів не викликає сумнівів, оскільки проведена дисертантом робота є достатньо комплексною, всебічною, виконана на високому науковому та методичному рівні. Застосовані в роботі методи дозволили підтвердити висунуті дисертантом гіпотези. Отримані результати є якісними і не містять ознак підробки, фабрикації та академічного плагіату.

**Структура дисертаційної роботи.** Структура та зміст дисертації Артема Живоложного відповідають вимогам щодо оформлення цих рукописів згідно з Наказом МОН № 40 від 12.01.2017 р. Дисертація складається з анотації (українською та англійською мовами), переліку умовних скорочень, вступу,

чотирьох основних розділів («Огляд літератури», «Матеріали та методи досліджень», «Результати та їх обговорення», «Аналізу та узагальнення результатів»), висновків, переліку використаних джерел (383 найменування), додатків. Рукопис викладений на 281 сторінці комп'ютерного набору, містить 8 таблиць в основній частині та 21 таблицю в додатках, 56 рисунків.

**Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій в опублікованих працях.** За темою дисертації опубліковано 6 основних робіт, які відповідають вимогам Постанови Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 р., з них 4 статті – у фахових іноземних виданнях, віднесених до квартилей Q1-Q2 на дату опублікування. Згідно Постанови № 44 такі статті прирівнюються до двох наукових публікацій. Таким чином, загальна кількість статей, опублікованих за темою дисертації:  $(4 \times 2) + 2 = 10$ . Публікації як за кількістю, так і за якістю відповідають нормативним вимогам. Результати дисертаційного дослідження у достатній мірі апробовано на 5 вітчизняних та міжнародних наукових форумах, автор має 5 тез до конференцій.

**Недоліки дисертації щодо їх змісту та оформлення.** Після ознайомлення з текстом дисертаційної роботи постають певні питання та зауваження, деякі з них мають дискусійний характер, але потребують уточнення автора для остаточного оформлення рукопису дисертації. У цілому, ознайомлення з дисертаційною роботою залишає позитивне враження, робота написана у загальноприйнятому науковому стилі, є лексично грамотною, має чіткий логічний методологічний підхід до викладення матеріалу, якісно ілюстрована. Зміст дисертації повною мірою розкриває суть проведеної роботи, її положень, результатів та визначеного наукового напрямку. Попри відсутність принципових недоліків, є незначні зауваження, що стосуються наступного:

1. 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.

2. 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.

3. 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*.

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

Висловлені питання та зауваження, у цілому, не зменшують науково-практичної цінності отриманих результатів роботи.

### **Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам:**

Враховуючи беззаперечну актуальність обраної теми, наукову та практичну значимість отриманих результатів, високий методичний рівень, оригінальність запланованих експериментів та значний масив отриманих первинних даних, які відкривають широкі перспективи подальшого розвитку цього напрямку досліджень, наявність наукових публікацій високого рівня, вважаю, що дисертаційна робота ЖИВОЛОЖНОГО Артема «Регуляторна роль позаклітинних везикул за умов норми та канцерогенезу» відповідає усім вимогам «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 12.01.2022 р. № 44 та «Про внесення змін до деяких постанов Кабінету Міністрів України з питань підготовки та атестації здобувачів наукових ступенів», затвердженої Постановою Кабінету Міністрів України від 19.05.2023 р. № 502, та може бути представлена до офіційного захисту на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія.

Завідувач відділу хімії та біохімії ферментів

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна

НАН України,

старший науковий співробітник

д.б.н. Артем ТИХОМИРОВ

