

ВІДГУК

офіційного опонента, член-кореспондента НАН України, доктора біологічних наук, професора, головного наукового співробітника відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

КОЛИБО ДЕНИСА ВОЛОДИМИРОВИЧА

на дисертаційну роботу

КОЗАК ТАМАРИ ПАВЛІВНИ

на тему

«*BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* ЯК МОДИФІКАТОР ПРОЦЕСІВ ГЛІКОЛІЗУ В КЛІТИНАХ ЛІНІЙ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ РІЗНИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ ПІДТИПІВ»

подану на здобуття ступеня доктора філософії

з галузі знань 09 «Біологія»

зі спеціальності 091 «Біологія»

Актуальність роботи

Метаболічне репрограмування є однією з ключових властивостей пухлинного процесу, що забезпечує адаптацію та виживання злоякісних клітин, зокрема в умовах терапевтичного тиску. Особливої уваги заслуговують шляхи метаболізму глюкози в пухлинних клітинах, оскільки гліколіз забезпечує їх потреби у більшості анаболічних і енергетичних процесів, віддаючи перевагу ферментації глюкози над мітохондріальним окисним фосфорилуванням.

Численні результати сучасних досліджень довели, що на метаболізм пухлинних клітин впливають компоненти пухлинного мікрооточення, зокрема мікробіом. Представниками мікробіоти молочної залози людини є молочнокислі бактерії роду *Bifidobacterium*, які здатні інгібувати проліферацію злоякісних клітин, активувати прокаспази та посилювати експресію проапоптичних білків. Однак, існують дані про їх потенційну здатність підсилювати ефект Варбурга в пухлинних клітинах через підвищення біодоступності лактату.

Актуальність дисертаційної роботи Козак Тамари Павлівни, яка присвячена комплексному аналізу впливу *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* на ключові показники гліколізу (швидкість споживання глюкози і продукції лактату, активність ферментів гліколітичного шляху та пентозофосфатного циклу), а також на елементи сигнальних шляхів асоційованих з регуляцією

метаболізму глюкози в клітинах раку молочної залози людини *in vitro*, не викликає сумнівів. Результати цієї роботи розширюють наукові знання сучасної теоретичної й експериментальної онкології щодо впливу мікробіоти на метаболічну пластичність пухлинних клітин. Урахування особливостей молекулярних підтипів раку молочної залози дозволяє оцінити варіабельність метаболічної відповіді на взаємодію з живими бактеріями, що особливо важливо з огляду на встановлені відмінності у вихідних характеристиках молекулярного фенотипу цих клітин. Важливо відмітити також, що використання саме живих бактерій в такій моделі дослідження дозволяє оцінити повний спектр їх біологічних ефектів. Отримані результати дозволяють виявити регуляторні механізми, через які представники мікробіоти можуть модифікувати енергетичний обмін клітин раку молочної залози, що може стати основою для розробки нових метаболічно-орієнтованих підходів до терапії цього небезпечного захворювання.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана у відділі моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України в рамках програми «Клітинний банк ліній з тканин людини та тварин» (2020-2021рр.), науково-дослідної роботи «Вивчення впливу представників лактобактерій, біфідобактерій та умовно-патогенних представників мікробіоти людини на особливості реалізації механізмів метаболічних порушень при пухлинному процесі» (2022-2026 рр., № державної реєстрації 0121U113840), та Лабораторії колоректального раку Едуарда Батльє при Інституті біомедичних досліджень IRB Barcelona (Colorectal Cancer Laboratory, Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona)) за фінансування Спеціальних стипендій для дослідників з України від Наукової фундації Іспанської асоціації проти раку AECC (2022-2023, Ayudas extraordinarias investigadores de Ucrania – Fundacion científica asociacion española contra el cancer AECC 2022), а також стипендії НАН України для молодих вчених «Показники окремих ланок метаболізму глюкози і окисно-відновного потенціалу

клітин РМЗ людини *in vitro* після їх культивування з представниками мікробіоти людини виду *Bifidobacterium animalis*» (2024-2025 pp).

Ступінь обґрунтованості основних положень і висновків, сформульованих у дисертаційній роботі

Для дисертаційної роботи обрано чітко визначені та науково обґрунтовані об'єкти — клітини раку молочної залози людини різних молекулярних підтипів: люмінального (лінії MCF-7, T47D) та базального (лінія MDA-MB-231), а також ліофілізована і життєздатна культура бактерій *Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12*.

Достовірність і наукова обґрунтованість положень, викладених у дисертації, забезпечується валідацією розробленої експериментальної моделі співкультивування клітин РМЗ різних молекулярних підтипів із живими бактеріями виду *B. animalis subsp. lactis BB-12* в середовищі для культури клітин *in vitro*, ретельним плануванням експериментальних досліджень та застосуванням широкого спектру методів, адекватних поставлених меті й завданням роботи, а також використанням відповідних методів статистичного аналізу отриманих даних.

Постановка завдань є чіткою та комплексною, а їхнє виконання реалізовано в повному обсязі. Висновки дослідження відповідають меті та завданням роботи, ґрунтуються на детальному аналізі та узагальненні власних результатів і є обґрунтованим та логічним завершенням проведеного дослідження.

Новизна представлених теоретичних та/або експериментальних результатів проведених здобувачем досліджень, повнота викладу в опублікованих працях

У дисертаційній роботі Козак Тамари Павлівни вперше розроблено, оптимізовано та валідовано методику співкультивування клітин РМЗ різних молекулярних підтипів із живими *Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 in vitro*: визначено основні ростові та метаболічні характеристики *B. animalis* у середовищі призначеному для культивування еукаріотичних клітин. Також встановлено, що співкультивування клітин РМЗ із *B. animalis* підвищує

споживання глюкози, продукцію лактату, активність лактатдегідрогенази та змінює активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в злоякісних клітинах, що вказує на посилення в них процесів гліколізу. Дисертантом було показано модулюючий вплив досліджуваних бактерій на сигнальні шляхи асоційовані з метаболізмом глюкози через регуляцію експресії рецепторів інсуліну, підвищення експресії транскрипційного фактору STAT6, а в клітинах РМЗ люмінального підтипу — також підвищення експресії транспортера глюкози GLUT1.

За допомогою інгібітора гліколізу 2-дезоксиглюкози вперше було підтверджено, що співкультивування клітин MCF-7 і T47D з *B. animalis* репрограмує метаболізм клітин у бік посиленого гліколізу. У клітинах MCF-7 *B. animalis* потенціюють вплив метформіну шляхом посилення гліколізу, а в T47D спрямовують його у бік пентозофосфатного шляху. Вперше показано, що співкультивування клітин РМЗ з *B. animalis* не змінює чутливість клітин люмінального підтипу до цитотоксичного впливу Паклітакселу, однак в клітинах базального підтипу MDA-MB-231 посилює дію цитостатика, що супроводжується посиленням гліколізу та пентозофосфатного шляху.

За матеріалами дисертації опубліковано 8 наукових робіт, зокрема 4 статті в журналах, які належать до фахових видань із переліку затверджених МОН України (2 статті в українських фахових виданнях і 2 статті в журналах, що входять до науково-метричної бази Scopus); 4 тез опубліковано в наукових збірниках і матеріалах міжнародних та українських наукових конференцій та з'їздів.

Наукова обґрунтованість отриманих результатів, наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Обґрунтованість та достовірність викладених у дисертаційній роботі наукових даних забезпечена достатньою кількістю експериментальних моделей - 3 лініями клітин раку молочної залози людини (MCF-7, T47D та MDA-MB-231), та базується на значному об'ємі статистично достовірних експериментальних даних. Науковий та методичний рівень дисертації є високим, а застосування сучасних методів дослідження та використання адекватних методів статистичної

обробки результатів дозволили отримати науково-обґрунтовані та достовірні висновки.

Комісія з питань біоетики ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України щодо дотримання етичних принципів при виконанні дисертаційного дослідження Козак Тамари Павлівни позитивно оцінила роботу «*Bifidobacterium animalis* як модифікатор процесів гліколізу в клітинах ліній раку молочної залози різних молекулярних підтипів» (протокол № 2 від 18.03.2025 року).

Таким чином, дисертаційна робота Козак Тамари Павлівни виконана відповідно до принципів належної наукової методології; представлені на захист результати є обґрунтованими та відповідають вимогам, встановленим нормативними документами для присудження наукового ступеня доктора філософії.

Рівень виконання поставленого наукового завдання, оволодіння здобувачем методологією наукової діяльності

Для досягнення поставленої мети дисертант використовував значну кількість сучасних та високоінформативних наукових методів різних галузей біології, які дозволили належним чином досягнути поставлених завдань, серед яких: методи культури клітин (культивування клітин РМЗ і різні способи співкультивування клітин РМЗ та бактерій, колориметричні тести, 3D-культури, конфокальна мікроскопія), мікробіологічні методи, біохімічні (визначення швидкості споживання глюкози/продукції лактату, активності лактатдегідрогенази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази) та імунологічні методи (визначення експресії GLUT1, STAT6, Bax, Bcl-2, Ki-67, p21^{waf1}), проточна цитометрія (оцінка рівня активних форм кисню, аналіз експресії рецептора інсуліну), статистичний аналіз.

Таким чином, використання сучасних методологічних підходів, комплексність досліджуваних методів та адекватність проведеного статистичного опрацювання даних забезпечують повну відповідність результатів дослідження його меті та завданням. Висновки є надійними, науково аргументованими та логічно сформованими на основі отриманих даних.

Теоретичне і практичне значення результатів дослідження

Розроблена в дисертаційній роботі модель контрольованого співкультивування еукаріотичних клітин із життєздатними бактеріальними культурами в системі *in vitro* може бути використана як ефективний інструмент для дослідження складних взаємодій між компонентами пухлинного мікрооточення та злоякіснотрансформованими клітинами. Отримані фундаментальні дані поглиблюють розуміння механізмів взаємодії мікробіоти, зокрема біфідобактерій, з пухлинними клітинами, які мають різний проліферативний потенціал і метаболічний фенотип. Результати роботи підтверджують перспективність подальшого вивчення молочнокислих бактерій як регуляторів метаболічного профілю пухлинних клітин і створюють підґрунтя для розробки нових стратегій метаболічної терапії злоякісних новоутворень.

Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому

Дисертаційна робота викладена на 182 сторінках друкованого тексту. Дисертація містить наступні розділи: анотація, вступ, огляд літератури, матеріали та методи, 3 розділи результатів власних досліджень, аналізу та обговорення отриманих результатів, висновків та списку використаних джерел. Список використаних джерел налічує 229 джерел, розміщених на 30 сторінках. Робота проілюстрована 10 таблицями та 49 рисунками.

Анотація містить стисле викладення основного змісту дисертаційного дослідження та перелік публікацій, у яких представлені ключові результати роботи. Вона подана українською та англійською мовами.

«Вступ» дисертаційної роботи містить опис об'єкта та предмета дослідження, дані про апробацію отриманих результатів, обґрунтування актуальності, формулювання мети й завдань, перелік застосованих методів та відомості про наукову новизну та прикладну значущість дослідження.

У розділі «Огляд літератури» детально проаналізовано сучасні уявлення про метаболізм глюкози у злоякіснотрансформованих клітинах, а також представлені дані щодо впливу мікробіоти на формування пухлинного мікрооточення та біологічні властивості пухлинних клітин. Окрім цього, розглянуті сучасні підходи до метаболічного репрограмування злоякіснотрансформованих клітин, що є перспективними для розробки

терапевтичних стратегій. Розділ структуровано у чотири логічні частини, які охоплюють ключові аспекти досліджуваної проблеми, а саме особливості метаболізму глюкози пухлинними клітинами та мікробіоту, яка може бути залучена в цей процес. При підготовці огляду літератури дисертантом проведено ґрунтовний аналіз значного обсягу джерел, переважна більшість яких складається з рецензованих наукових статей іноземних видань, опублікованих протягом останніх років, що дозволяє забезпечити актуальність і наукову обґрунтованість викладеного матеріалу.

Розділ «Матеріали і методи» складається з опису матеріалів, обладнання, та методів що були використані дисертантом для проведення дослідження. Автор детально описує загальний дизайн експериментів, характеризує використані в роботі модельні об'єкти, представляє різні способи співкультивування пухлинних та бактеріальних клітин, проводить валідацію розробленої моделі співкультивування двох типів клітин. Крім того, дисертант описує використані сучасні наукові методи, застосовані для отримання адекватних і достовірних результатів аналізу метаболічних та проліферативних показників пухлинних клітин в системі *in vitro*. Наприкінці даного розділу наведено використаний для отриманих експериментальних даних метод статистичної обробки даних.

«Результати досліджень» дисертаційної роботи викладено у 3 розділах, які проілюстровані графіками та таблицями. У кожному розділі результатів власних досліджень дисертант наводить посилання на власні публікації. Третій розділ роботи зосереджений на розробці експериментальної моделі співкультивування клітин раку молочної залози з бактеріями *B. animalis* в системі *in vitro*. В першому підрозділі третього розділу описані ростові і метаболічні показники досліджуваних бактерій в поживному середовищі для еукаріотичних клітин. В другому підрозділі третього розділу дисертант проводить порівняльний аналіз життєздатності клітин раку молочної залози при різних способах співкультивування з *B. animalis* в системі *in vitro*. У третьому підрозділі цього розділу описані зміни кінетики росту бактеріальних клітин в присутності клітин раку молочної залози різних молекулярних підтипів. Четвертий розділ присвячений аналізу впливу *B. animalis* на процеси гліколізу в клітинах раку

молочної залози у розробленій та описаній в розділі 3 моделі співкультивування. Проведено оцінку змін швидкості споживання глюкози та продукції лактату пухлинними клітинами, показано зміни експресії рецептора інсуліну, транскрипційного фактору STAT6 та транспортера глюкози GLUT1, виміряно активність ферментів лактатдегідрогенази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. Висновки про зміни метаболічного фенотипу пухлинних клітин на основі отриманих результатів підтверджено через застосування індуктора та інгібітора гліколізу. Показано здатність *B. animalis* модифікувати чутливість клітин раку молочної залози людини до Паклітакселу. У п'ятому розділі дисертант проводить оцінку впливу *B. animalis* на показники життєздатності і проліферативної активності клітин раку молочної залози в даній моделі співкультивування, а саме рівень активних форм кисню та експресію білків-регуляторів апоптозу Bcl-2, Bax, p21^{WAF1} і маркера проліферації Ki-67.

У розділі «Обговорення результатів» дисертант аналізує отримані результати, на основі літературних джерел проводить оцінку змін, спричинених *B. animalis* та висловлює обґрунтовані припущення про напрямки цих змін. У дисертаційній роботі виклад матеріалу є зрозумілим, чітким, послідовним та змістовним, отримані результати мають логічне пояснення на основі сучасних опублікованих наукових даних.

«Висновки» відповідають поставленій меті та завданням, базуються на результатах проведених досліджень.

«Список використаних джерел» дисертаційної роботи включає 229 посилань на публікації у вітчизняних та міжнародних наукових виданнях. Це свідчить про те, що дисертація Козак Тамари Павлівни відповідає чинним вимогам та являє собою завершене наукове дослідження, результати якого спрямовані на розв'язання актуальної проблеми сучасної онкології та мають як теоретичну, так і прикладну цінність.

Рекомендації щодо подальшого використання результатів дисертації в практиці

Отримані результати дисертаційного дослідження Козак Тамари Павлівни щодо впливу *B. animalis* на процеси гліколізу в клітинах раку молочної залози

різних молекулярних підтипів можуть бути використані для проведення подальших досліджень складних взаємодій представників мікробіоти, як елементів пухлинного мікрооточення, та злоякіснотрансформованих клітин на основі розробленої моделі співкультивування живих еукаріотичних та бактеріальних клітин в системі *in vitro*. Крім того, ця дисертаційна робота вказує на значний потенціал молочно-кислих бактерій як регуляторів метаболічного профілю пухлинних клітин, що може стати підґрунтям для розробки та удосконалення нових напрямків метаболічної терапії злоякісних захворювань.

Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації, запитання до здобувача

Дисертаційна робота оформлена згідно затверджених вимог для дисертаційних робіт (Наказ МОН України №40 від 12.01.2017).

Принципових зауважень щодо оформлення і змісту дисертаційної роботи, а також щодо отриманих результатів немає. Однак, в процесі рецензування виявлені наступні запитання, які не впливають на її позитивну оцінку:

1. Чим обґрунтовано використання саме живих бактерійних клітин *Bifidobacterium animalis*, а не, скажімо, фільтрату їх культурального середовища чи їх лізату для вивчення їх взаємодії з клітинами РМЗ?
2. Як автор пояснює поєднання посилення гліколізу з одночасним зниженням проліферації та активацією апоптозу в клітинах РМЗ?
3. Робота виконана на трьох клітинних лініях РМЗ. Наскільки результати можна узагальнити для інших підтипів РМЗ або первинних клітинних культур та наскільки результати можна екстраполювати на умови *in vivo*?
4. У дослідженні доведено модифікуючий вплив *B. animalis* на чутливість клітин РМЗ до метформіну та паклітакселу. Яким чином автор оцінює потенційні ризики проонкогенного ефекту бактерій (наприклад, посилення ефекту Варбурга) при можливому терапевтичному використанні?
5. Чи можна вже розглядати *B. animalis* як потенційний ад'ювант у протипухлинній терапії, якщо так, то за яких умов, і з урахуванням яких можливих ризиків?

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

Дисертаційне дослідження Козак Тамари Павлівни «*Bifidobacterium animalis* як модифікатор процесів гліколізу в клітинах ліній раку молочної залози різних молекулярних підтипів», представлене на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія» є самостійною завершеною науковою роботою, що містить новітні наукові положення, які обґрунтовані отриманими результатами і розв'язують важливу наукову задачу – визначення впливу *Bifidobacterium animalis* на показники гліколізу, проліферацію, життєздатність і ефекти модифікаторів метаболізму глюкози в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів *in vitro* з метою створення підґрунтя для розробки інноваційних підходів до метаболічної терапії злоякісних новоутворень.

За актуальністю, методичним рівнем виконання, обсягом проведених досліджень, науковою новизною результатів, повнотою публікацій матеріалів дослідження, їх апробації на наукових конференціях дисертаційне дослідження відповідає наказу МОН України «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» від 12 січня 2017 р. №40 та положенню Постанови Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. №44 «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», (зі змінами, внесеними згідно із постановою Кабінету Міністрів України №341 від 21.03.2022р. та постановою Кабінету Міністрів України №502 від 19.05.2023р.), а її автор заслуговує присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 – «Біологія».

Офіційний опонент:

Член-кореспондент НАН України,

доктор біологічних наук, професор,

головний науковий співробітник відділу молекулярної імунології

Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України



Денис КОЛИБО