

ВІДГУК

офіційного опонента - доктора біологічних наук, професора кафедри цитології, гістології та репродуктивної медицини ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Островської Галини Віталіївни
на дисертацію Козак Тамари Павлівни на тему: «*Bifidobacterium animalis* як модифікатор процесів гліколізу в клітинах ліній раку молочної залози різних молекулярних підтипів», подану до захисту на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю
091-Біологія

Актуальність обраної теми дисертації

Рак молочної залози (РМЗ) належить до найпоширеніших злоякісних новоутворень серед жінок у всьому світі та є причиною високого рівня смертності, незважаючи на постійне вдосконалення стратегій лікування. Однією з фундаментальних характеристик злоякісних клітин є їх метаболічна пластичність. Перебудова енергетичного обміну, насамперед активація гліколізу замість окисного фосфорилування (так званий ефект Варбурга), веде до швидкої продукції АТФ та деяких попередників синтезу нуклеїнових кислот та інших макромолекул забезпечує пухлинним клітинам необхідні умови для швидкої проліферації і виживання в несприятливому середовищі, в тому числі при зниженій оксигенації та формування резистентності до протипухлинних агентів. Саме тому вивчення механізмів регуляції метаболізму злоякісних клітин залишається одним із найактуальніших напрямів сучасної експериментальної онкології.

Сьогодні значна увага приділяється мікробіоті як інтегральному компоненту пухлинного мікрооточення. Мікроорганізми, зокрема молочнокислі бактерії, здатні впливати на обмін речовин в пухлинних клітинах, модифікуючи як гліколітичні шляхи, так і альтернативні метаболічні маршрути. Представники роду *Bifidobacterium*, які традиційно відомі своєю пробіотичною активністю, привертають увагу завдяки здатності впливати на проліферацію і життєздатність пухлинних клітин. Водночас, наслідки цього впливу на метаболічну активність злоякісних клітин, зокрема клітин РМЗ, залишаються малодослідженими,

особливо в контексті різних молекулярних підтипів цього злоякісного новоутворення.

Слід відмітити, що найчастіше для проведення експериментів із мікроорганізмами в системі *in vitro* застосовують інактивовані теплом бактерії. Отже, особливу увагу при цьому привертає розроблена і описана дисертанткою нова експериментальна модель співкультивування клітин РМЗ саме з живими бактеріями виду *Bifidobacterium animalis in vitro*. Принципова новизна такої моделі полягає у можливості безпосереднього аналізу метаболічних змін пухлинних клітин під впливом життєздатних мікроорганізмів у контрольованих умовах, наближених до умов *in vivo*. Такий підхід дозволяє простежити динаміку споживання глюкози, продукції лактату, активність ключових ферментів гліколізу та пентозофосфатного шляху, а також оцінити функціональні наслідки метаболічного репрограмування — від проліферації до апоптозу клітин РМЗ та змін їх чутливості до хіміопрепаратів.

Таким чином, дисертація Козак Т.П. спрямована на вирішення актуальної наукової задачі — виявлення механізмів впливу *Bifidobacterium animalis* на метаболізм злоякісно трансформованих клітин молочної залози різних молекулярних підтипів. Запропонована модель поєднує підходи клітинної біології та мікробіології, відкриваючи нові перспективи для цілеспрямованого впливу на метаболічний фенотип пухлинних клітин і створюючи підґрунтя для розвитку інноваційних напрямів метаболічної та мікробіом-орієнтованої терапії раку.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота Козак Тамари Павлівни виконана у відділі моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України та безпосередньо пов'язана з плановими науковими дослідженнями установи. Зокрема, робота здійснювалася в рамках програми «Клітинний банк ліній з тканин людини та тварин» (2020–2021 рр.). Подальший розвиток дисертаційних досліджень відбувався у рамках виконання науково-дослідної роботи за темою «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). Крім того, окремі фрагменти досліджень дисертантки реалізовані у співпраці з міжнародними науковими центрами. Зокрема, частина експериментальної роботи виконувалася у Лабораторії колоректального раку Інституту біомедичних досліджень IRB Barcelona (Іспанія) за підтримки Спеціальних стипендій для дослідників з України від Наукової фундації Іспанської асоціації проти раку (AECC, 2022–2023 рр.). Також, робота була підтримана стипендією НАН України для молодих учених (2024–2025 рр.), присвяченою вивченню окремих ланок метаболізму глюкози і окисно-відновного потенціалу клітин РМЗ після їх співкультивування з бактеріями *Bifidobacterium animalis*. Таким чином, дисертаційна робота Козак Т.П. є невід'ємною частиною комплексних наукових програм, що реалізуються на рівні національних та міжнародних дослідницьких проєктів, і органічно вписується у пріоритетні напрями сучасних фундаментальних і прикладних досліджень у галузі експериментальної онкології та біології.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, та їх достовірність

Результати дисертаційного дослідження Козак Тамари Павлівни є достовірними та об'єктивними. Наукові положення та висновки дисертаційної роботи Козак Т.П. базуються на ґрунтовному експериментальному матеріалі, отриманому з використанням сучасних методичних підходів, що відповідають стандартам досліджень у галузі клітинної біології, мікробіології та експериментальної онкології. В основі роботи лежить розроблена та валідована *in vitro* модель співкультивування клітин РМЗ людини різних молекулярних підтипів із життєздатними клітинами *Bifidobacterium animalis*, що забезпечує високу відтворюваність і достовірність отриманих результатів.

Для вивчення змін метаболічного фенотипу клітин РМЗ дисертантка застосувала широкий спектр методів: біохімічні (визначення швидкості споживання глюкози і продукції лактату, активності ключових ферментів гліколізу та пентозофосфатного шляху), імуноцитохімічні (оцінка експресії білків асоційованих з метаболізмом глюкози, визначення проліферативного потенціалу, експресія білків-регуляторів апоптозу), проточну цитометрію

(оцінка експресії рецептора інсуліну, рівень активних форм кисню), а також статистичний аналіз, що підтверджує коректність та достовірність отриманих результатів.

Отримані результати в достатній мірі проілюстровані графіками та мікрофотографіями,

Наведені у дисертації дані є внутрішньо узгодженими, логічно пов'язаними та комплексно охоплюють різні рівні метаболічної регуляції — від біохімічних показників до клітинних функціональних характеристик. Висновки дисертантки повністю впливають із отриманих результатів і підтверджені достатнім обсягом експериментів, що проводилися на декількох клітинних лініях (MCF-7, T47D, MDA-MB-231), що дозволило врахувати специфіку різних молекулярних підтипів РМЗ.

Особливої уваги заслуговує підтвердження основних положень роботи за допомогою фармакологічних інгібіторів та активаторів гліколізу в клітинах РМЗ, що забезпечило додаткову перевірку адекватності інтерпретації результатів. Отримані дані узгоджуються з сучасними літературними відомостями, при цьому суттєво доповнюють і поглиблюють дані щодо розуміння ролі *Bifidobacterium animalis* у процесах забезпечення метаболічної пластичності злоякісних клітин.

Таким чином, сформульовані в дисертації наукові положення, висновки і рекомендації є науково обґрунтованими, достовірними та такими, що підтверджені комплексом незалежних методів дослідження.

Наукова новизна положень, результатів та висновків дисертаційної роботи

Наукова новизна дисертаційного дослідження Козак Тамари Павлівни чітко продемонстрована як на рівні визначення мети та завдань роботи, так і при формулюванні висновків. Для дослідження обрано маловивчений аспект — безпосередній вплив життєздатних пробіотичних бактерій *Bifidobacterium animalis* на метаболічний профіль клітин РМЗ людини різних молекулярних підтипів *in vitro*. Обраний напрямок реалізовано у запропонованій дисертанткою новій експериментальній моделі співкультивування пухлинних і бактеріальних клітин, дозволив вивчати цілісний спектр змін енергетичного обміну злоякісних

клітин в умовах прямої взаємодії з представником мікробіоти молочної залози людини.

У дисертаційній роботі показано, що співкультивування клітин РМЗ з *B. animalis* супроводжується істотними зрушеннями у бік посилення гліколітичного та пентозофосфатного шляхів метаболізму глюкози, про що свідчать зміни швидкості споживання глюкози і продукції лактату, а також активності ключових ферментів цих метаболічних шляхів. Отримані фундаментальні дані розширюють існуючі уявлення про механізми взаємодії представників мікробіоти, зокрема біфідобактерій, і клітин РМЗ різних молекулярних підтипів, які відрізняються за своїм проліферативним потенціалом і метаболічним фенотипом. Найбільш виражені зміни метаболічного профілю спостерігали в клітинах люмінального підтипу ліній MCF-7 і T47D, тоді як клітинна лінія MDA-MB-231, що відповідає тричі негативному раку молочної залози (аденокарцинома) демонструє більшу стійкість до впливу мікробіоти.

Важливим аспектом новизни дисертаційної роботи Козак Тамари Павлівни, є встановлення функціональних наслідків бактеріально-індукованих метаболічних змін, зокрема: зниження проліферативної активності, активація апоптозу та модифікація експресії рецепторів і транспортних систем асоційованих з метаболізмом глюкози, що підтверджує безпосередній зв'язок між індукованими метаболічними зрушеннями та життєздатністю і проліферацією пухлинних клітин.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів дисертаційної роботи

Результати дисертаційної роботи Козак Тамари Павлівни мають як важливе теоретичне, так і практичне значення. З теоретичної точки зору, отримані дані поглиблюють сучасні уявлення про механізми метаболічного репрограмування пухлинних клітин у відповідь на взаємодію з представниками мікробіоти. Результати проведених досліджень обґрунтовують доцільність подальшого вивчення молочно-кислих бактерій як регуляторів метаболічного фенотипу пухлинних клітин, що може стати основою для розробки інноваційних підходів до метаболічної терапії злоякісних новоутворень. Окрім того, отримані

результати доповнюють наукові дані щодо особливостей метаболічного фенотипу клітин РМЗ в залежності від їх рецепторного статусу, а також впливу метформіну і паклітакселу на процеси гліколізу в досліджених клітинах.

Практичне значення представленого дослідження полягає у розробці експериментальної моделі контрольованого співкультивування еукаріотичних клітин із життєздатними бактеріальними культурами *in vitro*, яка надалі може стати зручним інструментом для вивчення різних аспектів складних взаємодій між елементами пухлинного мікрооточення і злоякісними клітинами. Результати дослідження можуть знайти застосування у практиці клітинних біотехнологій — при створенні моделей для тестування протипухлинних препаратів, у розробці інноваційних комбінованих схем лікування, що враховують як молекулярні особливості пухлини, так і роль мікробіоти в регуляції метаболічних процесів.

Повнота викладу основних результатів дисертації в опублікованих працях

Основні положення і матеріали дисертаційного дослідження з достатньою повнотою оприлюднені у наукових публікаціях. За матеріалами дисертації опубліковано всього 8 наукових робіт, серед них - 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). Також опубліковано 4 тези в наукових збірниках і матеріалах міжнародних та українських наукових конференцій та з'їздів.

Кількість і якість публікацій відповідають «Порядку присудження ступеня доктора філософії.....»

Оцінка змісту дисертації

Дисертаційна робота Козак Тамари Павлівни оформлена відповідно до Вимог щодо дисертацій, налічує 182 сторінки друкованого тексту та включає вступ, анотацію, огляд літератури, опис матеріалів і методів, три розділи з результатами власних досліджень, їх аналіз та узагальнення, висновки, а також список використаних джерел, який містить 229 посилань, переважна більшість з яких датовані останніми п'ятьма роками. Дисертація добре ілюстрована: в ній 49 рисунків і 10 таблиць, що значно сприяє кращому сприйняттю матеріалу. Структура роботи повністю відповідає поставленим цілям і завданням

дослідження та дозволяє авторці всебічно висвітлити об'єкт та предмет дослідження.

Текст роботи викладений дуже логічно і послідовно, хорошою науковою мовою. Аналіз тексту показав, що авторка дотрималася академічної доброчесності: анотація не містить інформації, відсутньої у самому рукописі, а її оформлення разом із текстом дисертації відповідає сучасним вимогам. У тексті дисертації наведено посилання на використані джерела у випадках цитування ідей, тверджень чи фактів. Крім того, авторка дотрималася норм законодавства про авторське право, надавши повну й достовірну інформацію про результати наукової діяльності та застосовані методики досліджень.

Дискусійні положення та зауваження щодо змісту дисертації

При аналізі дисертаційної роботи Т. Козак принципових зауважень наукового характеру щодо викладених результатів та їх представлення не виникло.

Окремі зауваження стосуються переважно редакційного оформлення тексту:

- У роботі (анотація) значно перебільшена кількість ключових слів - їх більше 40 при рекомендованих 5-15 згідно Наказу «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» (Наказ МОН № 40 від 12.01.2017, із змінами, внесеними згідно з Наказом Міністерства освіти і науки № 759 від 31.05.2019)
- до списку скорочень не внесені деякі скорочення, що не належать до загально розповсюджених, зустрічаються більш ніж двічі, розшифровуються в тексті при першому використанні терміну, але далі застосовуються без їх наявності у Списку скорочень. Це, наприклад, ТМЕ (пухлинне мікрооточення), КУО (колонієутворюючі одиниці), OXPHOS ((окисне фосфорилування) та деякі інші.

Висловлені зауваження не носять принципового характеру, не стосуються концепції дисертаційного дослідження і не впливають на його загальну позитивну оцінку.

Загальний висновок та оцінка дисертації

Дисертаційна робота Козак Тамари Павлівни «Вплив *Bifidobacterium animalis* на особливості процесів гліколізу в клітинах ліній раку молочної залози різних молекулярних підтипів» за спеціальністю 091 «Біологія» є самостійним,

