

РЕЦЕНЗІЯ

офіційного рецензента, кандидата біологічних наук, старшого наукового співробітника відділу патофізіології метастазування

Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології

ім. Р.Є. Кавецького НАН України

КОЛЕСНИКА ДЕНИСА ЛЕОНІДОВИЧА

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 обраної теми досліджень.

Рак молочної залози (РМЗ) залишається найпоширенішим видом злоякісного захворювання серед жінок у світі, складаючи приблизно 11,7% усіх випадків раку та призводячи до значної захворюваності та смертності. РМЗ – це гетерогенне захворювання, що складається з різних молекулярних підтипів, кожен з яких має різні прогностичні та терапевтичні наслідки. Ускладнює проблему гетерогенність пухлини, яка виражається у варіації морфології, транскрипційних профілів, метастатичного потенціалу і метаболізму злоякісних клітин. Різноманітність вуглецевих субстратів, що живлять злоякісні клітини, свідчить про метаболічну гетерогенність, навіть у пухлинах з однаковим клінічним діагнозом. Однією з фундаментальних ознак злоякісних клітин, що обумовлює їх агресивність, є метаболічна пластичність, яка сприяє їх виживаності та адаптації до засобів терапії. Домінування гліколізу за наявності кисню, активне поглинання глюкози через транспортери родини GLUT і сигнальна роль лактату відіграють стратегічну роль у пухлинному рості.

У цьому контексті зростає інтерес до молочно-кислих бактерій, що є представниками мікробіоти кишечника та молочної залози людини. Адже продуктами метаболічної активності цих мікроорганізмів є різні сполуки, зокрема ацетат і лактат, які потенційно можуть змінювали метаболічний

фенотип пухлинних клітин. Сьогодні доведено, що бактерії роду *Bifidobacterium* та їх метаболіти здатні пригнічувати проліферацію та активувати апоптоз у злоякісно трансформованих клітинах. Тож, численні докази впливу біфідобактерій на біологію злоякісних клітин підкреслюють необхідність ретельної оцінки змін метаболізму глюкози в клітинах РМЗ внаслідок взаємодії з молочно-кислими представниками мікробіому людини.

Втім, експериментальні моделі, що дозволяють вивчати особливості взаємодії живих мікроорганізмів із пухлинними клітинами, потребують подальшого вдосконалення. Найбільш інформативними є підходи, де використовуються життєздатні бактерії, однак це потребує оптимізації методики співкультивування анаеробних мікроорганізмів з еукаріотичними клітинами.

У межах дослідження Т.П. Козак було розроблено та оптимізовано модель співкультивування живих прокаріотичних та еукаріотичних клітин *in vitro*, а також ефективно використано цю модель для комплексного аналізу впливу *Bifidobacterium animalis* на метаболізм клітин РМЗ різних молекулярних підтипів. Особливий акцент був зроблений на глюкозозалежні шляхи енергетичного обміну і потенційну комбінацію пробіотичного агенту із хіміотерапією, зокрема Паклітакселом. Отримана модель та результати співкультивування можуть мати подальші перспективи для використання в дослідженнях мікробіому, як важливого елементу пухлинного мікрооточення, та терапії злоякісних пухлин із урахуванням їх метаболічної гетерогенності.

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), частина

роботи була виконана в 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 cientifica 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 обгрунтованості наукових положень, отриманих результатів, висновків і рекомендацій, сформульованих в дисертації.

Аналіз змісту дисертаційної роботи Козак Т.П. «*Bifidobacterium animalis* як модифікатор процесів гліколізу в клітинах ліній РМЗ різних молекулярних підтипів» та опублікованих рукописів свідчить про належне теоретичне і методологічне обгрунтування наукових положень та висновків проведених наукових досліджень, а також достовірність отриманих результатів. Для реалізації мети досліджень автором були визначені шість задач, які повністю відображають зміст роботи, є взаємопов'язаними і логічно обгрутовують необхідність їх виконання. Робота проведена на трьох модельних системах ліній клітин РМЗ людини *in vitro* із застосуванням сучасних біохімічних та імунологічних методів, методів проточної цитометрії, культури клітин, спектроскопії. Всі результати досліджень були статистично оброблені і викладені у висновках, які відображають основні результати дослідження, отримані згідно поставлених задач. Комісія з питань етики ІЕПОР ім. Р.Є.Кавецького НАН України щодо дотримання етичних принципів при виконанні наукових досліджень Козак Тамари Павлівни позитивно оцінила дисертаційне дослідження «*Bifidobacterium animalis* як модифікатор процесів гліколізу в клітинах ліній раку молочної залози різних молекулярних підтипів» (протокол №2 від 18.03.2025 року). Отже,

дисертаційна робота містить належний рівень доказовості та обґрунтованості наукових положень, результатів досліджень та висновків.

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

Наукова новизна дисертаційної роботи Козак Тамари Павлівни «*Bifidobacterium animalis* як модифікатор процесів гліколізу в клітинах ліній раку молочної залози різних молекулярних підтипів» безсумнівна і містить наступні здобутки:

- вперше розроблено, оптимізовано і валідовано експериментальну модель *in vitro* співкультивування живих бактерій виду *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 (*B. animalis*) та клітин РМЗ різних молекулярних підтипів. Зокрема, встановлено умови та час інкубації клітин, склад поживного середовища і співвідношення еукаріотичних/бактеріальних клітин;

- вперше підтверджено підвищення швидкості споживання глюкози і продукції лактату, збільшення активності лактатдегідрогенази і динамічні зміни активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в клітинах РМЗ внаслідок співкультивування із *B. animalis*, що свідчить про посилення гліколізу в пухлинних клітинах;

- вперше показано підвищення експресії транспортера глюкози GLUT1 і транскрипційного фактора STAT-6, а також зміни експресії рецепторів інсуліну в клітинах РМЗ внаслідок співкультивування із *B. animalis*;

- вперше встановлено, що співкультивування клітин РМЗ люмінального підтипу ліній T47D та MCF-7 з *B. animalis* призводить до підвищення їх чутливості до цитотоксичної дії 2-дезоксиглюкози, про що свідчить зниження показника IC50 в 2 рази. Такі зміни супроводжуються пригніченням гліколітичних метаболічних процесів в клітинах РМЗ і посиленням їх дихальної активності;

- вперше доведено, що *B. animalis* впливають на метаболічні ефекти Метформіну в клітинах РМЗ: в клітинах T47D та MDA-MB-231 клітинний

метаболізм зміщується у бік посилення пентозофосфатного шляху (PPP), а в клітинах MCF-7 показано посилення гліколізу;

- вперше показано, що співкультивування клітин РМЗ люмінального підтипу з *B. animalis* не впливає на їх чутливість до цитотоксичної дії Паклітакселу, однак в клітинах базального підтипу лінії MDA-MB-231 обробка *B. animalis* призводить до посилення цитотоксичної дії Паклітакселу в порівнянні з клітинами, які інкубували з Паклітакселом або *B. animalis* окремо.

Результати досліджень повністю відображені у 8 наукових роботах: у 4 статтях, які опубліковані у журналах, що належать до фахових видань із переліку затверджених МОН України; чотирьох тезах, опублікованих в наукових збірниках і матеріалах міжнародних та українських наукових конференцій та з'їздів, що підтверджує наукову вагомість отриманих результатів. Опубліковані праці відповідають вимогам п.8 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 січня 2022 р. №44. Окрім цього, результати досліджень були апробовані автором на численних вітчизняних та міжнародних наукових форумах у вигляді усних і постерних доповідей. Все висвітлене вище дозволяє стверджувати, що результати дисертаційного дослідження Козак Т.П. належним чином були представлені науковій спільноті для ознайомлення.

Практичне значення результатів дисертаційної роботи.

Результатом проведеного дисертаційного дослідження є розробка і оптимізація нової системи співкультивування злоякісних клітин людини, які характеризуються різним проліферативним потенціалом та метаболічним фенотипом, і живих біфідобактерій *in vitro* за умов їх прямої взаємодії. Створена експериментальна модель може використовуватись для широкого спектру досліджень клітинних і молекулярно-біологічних механізмів взаємодії еукаріотичних і бактеріальних клітин в різних галузях науки.

Окрім того, під час виконання роботи дисертанткою було створено

інтегральну панель показників метаболічної активності пухлинних клітин, які характеризують гліколітичний шлях метаболізму глюкози в цих клітинах.

Оцінка структури та змісту дисертації.

Робота викладена на 182 сторінках із дотриманням існуючих вимог, затверджених до оформлення дисертації, і складається із анотацій, вступу, огляду літератури та розділів, у яких представлено матеріали і методи дослідження, результати власних досліджень (3 розділи), аналіз та узагальнення отриманих даних, висновків. Список літературних джерел налічує 229 посилань, 81,2% яких опубліковані за останні 5 років. Роботу ілюстровано 49 рисунками та 10 таблицями.

У *вступі* обґрунтована актуальність теми дослідження, чітко сформульована мета та 6 завдань досліджень, викладені наукова новизна і практична значимість отриманих результатів, відомості про особистий внесок здобувача, апробацію та публікацію результатів виконаної дисертаційної роботи, що дає цілісне уявлення про суть і зміст роботи. Слід зазначити, що робота була успішно виконана згідно поставлених завдань, що відображено у висновках роботи.

В *огляді літератури* автор викладає матеріал, який виключно стосується теми дисертаційного дослідження і акцентує увагу на особливостях метаболізму глюкози злоякісно трансформованими клітинами і ролі мікробіоти в якості елементу мікрооточення пухлини, який потенційно здатен впливати на біологію і метаболічну пластичність пухлинних клітин різного гістогенезу. В цьому розділі автор також висвітлює підходи до метаболічного репрограмування злоякісно трансформованих клітин, що впливає на їх чутливість до терапії і обґрунтовує необхідність проведення запланованих досліджень.

Другий розділ дисертаційної роботи – «Матеріали і методи дослідження» відображає великий спектр методичних підходів, які використала дисертантка для вирішення завдань дослідження і досягнення поставленої мети, що заслуговує на схвалення. Всі застосовані при виконанні роботи методичні підходи детально описані і можуть бути відтворені.

Розділ 3. З використанням мікробіологічних методів (модифікація турбідиметрії при OD600 та культивування бактерій на елективному поживному середовищі) та методів культури клітин (культивування клітин *in vitro*, 3D-культури, системи Insert, колориметричні методи, мікроскопію) дисертантом перевірено різні способи співкультивування пухлинних клітин PM3 та *B. animalis*. Внаслідок проведених експериментів обрано спосіб співкультивування двох типів клітин, який є надзвичайно інформативним та найбільш наближений до умов *in vivo*. Дисертантом було оптимізовано обрану модель співкультивування еукаріотичних і бактеріальних клітин шляхом підбору умов, контроль яких забезпечує відтворюваність цієї експериментальної моделі. Встановлено особливості ростових характеристик *B. animalis* в поживному середовищі та умовах оптимальних для культури клітин PM3: lag-фаза триває 6 годин, тривалість log-фази становить 24 години і при цьому кількість життєздатних клітин біфідобактерій досягає максимальної концентрації, а через 72 години інкубації починає знижуватись.

Розділ 4. Представлені результати досліджень метаболічної активності клітин PM3 ліній MDA-MB-231, MCF-7 та T47D внаслідок співкультивування з *B. animalis*. Дисертантом були застосовані біохімічні методи, імунологічні та проточна цитометрія. Доведено, що співкультивування клітин PM3 з *B. animalis* призвело до статистично достовірного ($p < 0.05$) підвищення швидкості споживання глюкози і продукції лактату, а також активності ЛДГ в клітинах PM3 відносно інтактних клітин. Найбільш виражені зміни спостерігали в клітинах PM3 люмінального підтипу. Показано, що *B. animalis* впливає на сигнальні шляхи метаболізму глюкози шляхом модуляції експресії рецепторів інсуліну, підвищення експресії транскрипційного фактора STAT6, а в клітинах люмінального підтипу - посилення експресії транспортера глюкози GLUT1 на 30-80% в порівнянні з контролем клітин.

Для підтвердження напрямків зміни шляхів метаболізму глюкози досліджуваними пухлинними клітинами дисертантка використовувала відомі сполуки, які є інгібітором (2-дезоксиглюкоза) та індуктором (Метформін)

гліколізу в клітинах РМЗ. Показано, що комплексна послідовна обробка клітин РМЗ *B.animalis*, а потім 2-дезоксиглюкозою спричиняє в клітинах зниження швидкості споживання глюкози і продукції лактату, а також підвищення їх чутливості до цитотоксичної дії 2-DG у 2 рази в порівнянні з інтактними клітинами. Також, дисертанткою в роботі доведено, що *B.animalis* впливають на метаболічні ефекти метформіну в клітинах РМЗ. Показано, що як і *B.animalis* метформін зміщує клітинний метаболізм у бік гліколізу у вихідних клітинах РМЗ. Співкультивування злоякісних клітин з *B.animalis* призводить до репрограмування шляхів метаболізму глюкози в клітинах Т47D і MDA-MB-231 у бік посилення PPP.

Також, у цьому розділі представлені результати щодо дослідження впливу *B.animalis* на чутливість клітин РМЗ різних молекулярних підтипів до хіміопрепаратів. Зокрема, автором представлені результати модифікації біфідобактеріями чутливості пухлинних клітин до цитотоксичної дії Паклітакселу. Було показано, що для тричі-негативного раку MDA-MB-231 після їх співкультивування з *B. animalis* наявне посилення цитотоксичної дії Паклітакселу, в порівнянні з клітинами, які інкубували з Паклітакселом або *B. animalis* окремо. Для двох інших досліджуваних клітинних ліній РМЗ – MCF-7 та Т47D такого ефекту дисертантом відмічено не було.

Розділ 5. В цьому розділі, базуючись на результатах, отриманих і представлених в розділах 3 та 4, дисертант проводить дослідження впливу *B.animalis* на проліферацію (Ki-67) та зміну рівня експресії проапоптотичних (Bax, p21^{Waf1}) та протиапоптотичних (Bcl-2) білків клітинами РМЗ. Також, аналізується рівень продукції активних форм кисню пухлинними клітинами при застосуванні бактерій. Показано, що співкультивування клітин РМЗ з *B. animalis* призводить до зниження експресії маркера проліферації Ki-67 на 45-60% і підвищення експресії проапоптотичних білків Bax (у 2-5 разів) і p21^{Waf1} (у 2 рази) в злоякісно трансформованих клітинах. Експозиція клітин РМЗ з *B. animalis* супроводжувалась статистично достовірним підвищенням продукції активних форм кисню в клітинах РМЗ, причому найбільш виражені зміни продукції активних форм кисню відмічали в клітинах MDA-MB-231.

Обговорення та узагальнення отриманих результатів проведено добре, шляхом послідовного аналізу результатів своєї роботи. Пояснення щодо виявлених нових фактів з урахуванням сучасних даних літератури, обґрунтовують переваги нової адаптованої моделі співкультивування живих бактеріальних клітин з пухлинними клітинами в системі *in vitro*, перед раніше відомими, що доводить перспективність її застосування у різних галузях біології. Також проаналізовано і підтверджено висновки дисертантки щодо зміни метаболізму пухлинних клітин РМЗ шляхом посилення гліколізу та/або активації пентозофосфатного шляху внаслідок дії біфідобактерій в розробленій системі, що вказує на валідність моделі для подібних досліджень.

Висновки, які логічно випливають із проведеного дослідження, сформульовані чітко і ясно, вони цілком відповідають поставленим завданням та повністю ґрунтуються на отриманих результатах.

Академічна доброчесність.

Станом на 25.06.2024 року унікальність даної роботи становить 98,08%, що підтверджено експертним висновком про перевірку на наявність академічного плагіату. У разі звернень до результатів та тексту інших авторів у дисертаційній роботі наведенні посилання.

Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації, запитання до здобувача.

В загальному робота складає гарне враження, логічно викладені результати дослідження, отримані на високому методологічному рівні, які супроводжуються якісним ілюстративним матеріалом. Попри це є незначні зауваження, що стосуються наступного:

1. На рис. 3.10 наявний текст англійською мовою.
2. В таблицях 4.1 та 4.5 відсутні позначки статистично достовірної різниці між контрольними та експериментальними групами, однак ці відмінності детально описані в тексті.

Окрім зауважень, в ході рецензування роботи виникли **запитання**:

1. Чому для комплексного дослідження впливу бактерій на пухлинні клітини раку молочної залози були обрані саме *Bifidobacterium animalis*?

2. Чому в якості хіміопрепарату був використаний Паклітаксел?

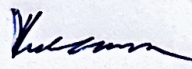
Зазначенні зауваження, які виникли в процесі рецензування роботи, не зменшують загальну позитивну оцінку роботи та її наукову цінність.

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» за спеціальністю 091 «Біологія» є самостійним, завершеним науковим дослідженням, результати якого спрямовані на вирішення актуальної задачі онкології – визначення ролі представників сапрофітної мікробіоти людини біфідобактерій на метаболічний фенотип клітин РМЗ людини, в якості компонента мікрооточення і модифікуючого фактора злоякісності клітин. Актуальність теми, новизна дослідження, теоретичне і практичне значення отриманих результатів, а також сучасний методичний рівень проведених досліджень, свідчать про високі наукові досягнення здобувача, а дисертаційне дослідження повністю 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.). Тому вважаю, що здобувач заслуговує присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 - Біологія за спеціальністю 091 - Біологія.

Офіційний рецензент:

кандидат біол. наук,
старший науковий співробітник
відділу патологічної метастазування
ІЕПОР ім. Р.С. Кавецького НАН України

 **Денис КОЛЕСНИК**



Підпис Дениса Колесника

ЗАСВІДЧУЮ

Нач. відділу кадрів ін-ту

Т.В. Тамара Лебедева