

РЕЦЕНЗІЯ

офіційного рецензента

на дисертаційну роботу

КОЗАК ТАМАРИ ПАВЛІВНИ

на тему

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

представлену до захисту у спеціалізовану вчену раду ID 10704 на здобуття
ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» зі спеціальності 091
«Біологія» (наукова спеціальність «Онкологія»)

Ступінь актуальності обраної теми

Вивчення ролі мікробіоти у виникненні та перебігу онкологічних захворювань є одним із найбільш динамічних та перспективних напрямів. Наукова увага поступово зміщується від виключно генетичних та клітинно-молекулярних механізмів онкогенезу до інтегративного підходу, який включає взаємодію пухлини з мікрооточенням та мікробіотою організму. Сьогодні доведено, що мікробні спільноти впливають на імунний статус, метаболічні шляхи та сигнальні каскади клітин, а відтак — можуть як сприяти, так і обмежувати розвиток злоякісного процесу. Особливе місце у цих дослідженнях посідають представники роду *Bifidobacterium*, зокрема штам *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12, який використовується у харчовій промисловості та медицині завдяки своїй безпечності. Однак потенціал цього штаму в онкології залишається недостатньо дослідженим. Традиційні підходи до оцінки впливу пробіотиків на пухлинні клітини часто не відображають складних біологічних взаємодій. Тому створення нової експериментальної моделі, яка дозволяє дослідити вплив *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 на проліферацію, апоптоз та сигнальні механізми пухлинних клітин, є надзвичайно важливим кроком для розвитку галузі. Враховуючи викладене, не викликає сумнівів актуальність дисертаційної роботи Козак Тамари Павлівни, оскільки вона

спрямована на розробку, апробацію та аналіз метаболічних змін внаслідок співкультивування нової експериментальної моделі, що дозволяє досліджувати взаємодію злоякісно трансформованих клітин раку молочної залози з бактеріями пухлинного мікрооточення — *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12. Застосування такого підходу відкриває принципово нові можливості для пошуку біологічних механізмів пригнічення пухлинного росту та цілеспрямованої модифікації мікрооточення пухлини.

Оцінка наукового рівня дисертації і наукових публікацій здобувача

Дисертаційна робота виконана у відділі моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Усі наукові положення ґрунтуються на достовірних фактичних даних, є чітко сформульованими, об'єктивно й науково обґрунтованими, містять нові важливі узагальнення та становлять логічний підсумок проведених досліджень. Використання сучасних методів, адекватних поставленим завданням, дало можливість отримати надійні результати, що підтверджують достовірність і обґрунтованість висновків дисертації.

За результатами дисертаційної роботи опубліковано 8 наукових праць, серед яких 4 статті у фахових журналах, включених до переліку, затвердженого МОН України (2 публікації в українських спеціалізованих виданнях та 2 у журналах, що індексуються у наукометричній базі Scopus). Крім того, оприлюднено 4 тези у збірниках наукових праць та матеріалах міжнародних і всеукраїнських конференцій і з'їздів.

Дисертаційне дослідження було проведене у відділі моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Робота виконувалася в межах програми «Клітинний банк ліній з тканин людини та тварин» (2020–2021 рр.), а також науково-дослідного проєкту «Вивчення впливу представників лактобактерій, біфідобактерій та умовно-патогенних представників мікробіоти людини на особливості реалізації механізмів

метаболических нарушений при опухолевом процессе» (2022–2026 гг., № государственной регистрации 0121U113840).

Крім того, частина роботи виконувалася у Лабораторії колоректального раку Едуарда Батльє при Інституті біомедичних досліджень IRB Barcelona (Colorectal Cancer Laboratory, Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona)), де дослідження підтримувалися завдяки фінансуванню Спеціальних стипендій для дослідників з України від Наукової фундації Іспанської асоціації проти раку (AECC) (2022–2023 гг., Ayudas extraordinarias investigadores de Ucrania – Fundacion cientifica asociacion española contra el cancer AECC 2022).

Окремі етапи роботи реалізовано також у межах 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 гг.).

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

Вперше розроблено та валідовано методику співкультивування клітин раку молочної залози (РМЗ) різних молекулярних підтипів із живими *Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 in vitro*. Визначено оптимальні умови співкультивування (поживне середовище, рН, температура, CO₂, співвідношення клітин, час інкубації), що забезпечують відтворюваність моделі.

Встановлено, що співкультивування *Bifidobacterium animalis* з клітинами РМЗ підвищує споживання глюкози, продукцію лактату, активність лактатдегідрогенази та змінює активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, особливо у клітинах люмінального підтипу MCF-7 і T47D, що свідчить про посилення гліколізу.

Показано, що *Bifidobacterium animalis* модулює експресію рецепторів інсуліну, транскрипційного фактора STAT6 та GLUT1, знижує Ki-67 і впливає

на баланс про- та антиапоптичних білків у клітинах різних молекулярних підтипів. За допомогою 2-дезоксиглюкози підтверджено репрограмування метаболізму люмінальних клітин у бік гліколізу. У MCF-7 бактеріальні клітини потенціюють ефект метформіну (активатора гліколізу), а в T47D — спрямовують дію метформіну на пентозофосфатний шлях. Досліджено, що співкультивування не змінює чутливості люмінальних клітин до паклітакселу, тоді як у MDA-MB-231 підсилює його цитотоксичність, супроводжуючи синергічне посилення гліколізу та пентозофосфатного шляху.

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

Дисертаційна робота Козак Тамари Павлівни представляє собою завершене наукове дослідження, виконане на високому методичному рівні. Результати наукової роботи дисертантки спираються на застосування сучасних методів дослідження, включаючи ґрунтовний аналіз наукової літератури, методи культури клітин, мікробіологічні методи, біохімічні та імуноцитохімічні методи, проточну цитометрію, а також проведення відповідної статистичної обробки отриманих даних. Висновки дисертації логічно випливають із отриманих результатів, що гарантує їх наукову обґрунтованість і достовірність.

Здобувачка продемонструвала високий рівень професійної компетентності під час проведення дослідження, що дало змогу отримати нові результати комплексної взаємодії клітин РМЗ із пробіотичними бактеріями. Отримані результати дозволяють охарактеризувати особливості метаболічних змін досліджуваних клітин внаслідок співкультивування. Детальний аналіз отриманих даних та їх комплексна оцінка на основі сучасних наукових публікацій надали дисертантці факти, що підтверджують значимість роботи для онкології як у теоретичному, так і у практичному аспекті.

Комісія з питань етики ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України позитивно оцінила дотримання етичних принципів у проведенні досліджень Козак Тамари Павлівни, зокрема у роботі «*Bifidobacterium animalis* як модифікатор процесів гліколізу в клітинах ліній раку молочної залози різних

молекулярних підтипів» (протокол № 2 від 18.03.2025 р.). Таким чином, наукові положення та висновки дисертаційної роботи є обґрунтованими.

Рівень виконання поставленого наукового завдання, оволодіння здобувачем методологією наукової діяльності

Для вирішення поставлених завдань авторка дисертаційної роботи застосувала сучасні методи, адекватні меті дослідження, зокрема мікробіологічні методи, методи культури клітин, імуноцитохімічні методи, біохімічні методи, проточну цитометрію та статистичний аналіз. Під час виконання роботи здобувачка продемонструвала високий рівень професійних компетентностей, теоретичних знань, практичних умінь та навичок, оволоділа методологією наукової діяльності, що забезпечило отримання нових науково обґрунтованих результатів та дозволило вирішити конкретне завдання щодо розробки та оптимізації моделі співкультивування клітин РМЗ з *Bifidobacterium animalis* та із використанням зазначеної моделі оцінити метаболічні зміни пухлинних клітин в присутності бактеріальних компонентів мікрооточення.

Сучасний методичний рівень роботи, інформативність використаних методів та відповідність статистичного аналізу дозволяють стверджувати, що результати дослідження повністю відповідають поставленій меті та завданням, а висновки є достовірними та науково обґрунтованими.

Теоретичне і практичне значення результатів дослідження

Розроблена в дисертаційній роботі модель співкультивування *in vitro* еукаріотичних клітин із життєздатними бактеріальними культурами є потужним та ефективним інструментом для детального вивчення складних взаємодій між компонентами пухлинного мікрооточення та злоякісно трансформованими клітинами. Використання цієї моделі дозволяє не лише відтворювати фізіологічні умови росту клітин, а й систематично досліджувати вплив різних бактеріальних штамів на метаболічну активність, проліферативний потенціал і сигнальні шляхи пухлинних клітин.

Отримані фундаментальні дані значно поглиблюють сучасне розуміння механізмів взаємодії мікробіоти, зокрема представників роду *Bifidobacterium*, із злоякісно трансформованими клітинами, що мають різні молекулярні підтипи,

метаболичні фенотипи та рівні проліферативної активності. Ці результати демонструють, що молочнокислі бактерії здатні модулювати ключові процеси клітинного метаболізму, включаючи гліколіз та шляхи окисно-відновного потенціалу, що безпосередньо впливає на життєздатність та функціональні характеристики пухлинних клітин.

Таким чином, результати роботи підтверджують високу перспективність подальшого вивчення молочнокислих бактерій як потенційних регуляторів метаболічного профілю пухлинних клітин і створюють наукову базу для розробки нових стратегій метаболічної терапії злоякісних новоутворень. Використання подібних моделей відкриває можливості для інтеграції мікробіологічних підходів у сучасні онкологічні дослідження та терапевтичні концепції, спрямовані на оптимізацію лікування і підвищення ефективності існуючих протипухлинних методів.

Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому

Дисертаційна робота викладена на 182 сторінках друкованого тексту та є логічно структурованим завершеним науковим дослідженням. Вона містить анотацію, вступ, огляд літератури, розділ «Матеріали та методи», три розділи з результатами власних експериментальних досліджень, обговорення отриманих даних, висновки та список використаних джерел. Список використаних джерел налічує 229 публікацій, розміщених на 30 сторінках, що включають сучасні рецензовані наукові статті вітчизняних і міжнародних видань. Робота ілюстрована 10 таблицями та 49 рисунками, що забезпечує наочне відображення експериментальних результатів.

Анотація подана українською та англійською мовами, містить стислий виклад основного змісту дисертації та перелік публікацій, у яких представлені ключові результати дослідження.

Вступ дисертації включає опис об'єкта та предмета дослідження, обґрунтування актуальності теми, формулювання мети та завдань, перелік використаних методів, а також відомості про наукову новизну та практичне значення роботи. У вступі дисертаційної роботи дисертантка пояснює актуальність обраної теми, окреслює мету та завдання дослідження, демонструє

наукову новизну й практичну значущість отриманих результатів, а також зазначає власний внесок у проведену роботу.

Огляд літератури систематизовано у чотири логічні частини, у яких детально проаналізовано сучасні уявлення про метаболізм глюкози у злоякісно трансформованих клітинах, вплив мікробіоти на формування пухлинного мікрооточення та біологічні властивості пухлинних клітин. Особлива увага приділена сучасним підходам до метаболічного репрограмування пухлинних клітин, що є перспективними для розробки нових терапевтичних стратегій. При підготовці огляду літератури дисертантка провела ґрунтовний аналіз значного обсягу джерел, переважна більшість яких складається з рецензованих статей іноземних видань, опублікованих протягом останніх років, що дозволяє забезпечити актуальність та наукову обґрунтованість викладеного матеріалу.

Розділ «Матеріали і методи» включає детальний опис використаних матеріалів, лабораторного обладнання та методів дослідження. Авторка описує загальний дизайн експериментів, характеристику модельних об'єктів, різні способи співкультивування пухлинних та бактеріальних клітин, а також валідацію розробленої моделі. Окремо подано опис сучасних біологічних методів, застосованих для оцінки метаболічних і проліферативних показників клітин у системі *in vitro*, та наведено метод статистичної обробки отриманих даних, що забезпечує достовірність результатів.

Результати власних досліджень представлені у вигляді 3 розділів (Розділи 3–5), кожен із яких проілюстровано графіками та таблицями, з посиланням на відповідні публікації дисертанта. Важливим є розділ 3, присвячений розробці експериментальної моделі співкультивування клітин раку молочної залози з бактеріями *B. animalis in vitro*. У ньому детально описано ростові та метаболічні характеристики бактерій у середовищі для еукаріотичних клітин, а також проведено порівняльний аналіз життєздатності клітин раку молочної залози при різних умовах співкультивування з *B. animalis*. Додатково проаналізовано зміни кінетики росту бактеріальних клітин у присутності пухлинних клітин різних молекулярних підтипів. Крім того, у розділі оцінюється вплив *B. animalis* на процеси гліколізу клітин, включаючи споживання глюкози, продукцію лактату,

експресію рецептора інсуліну, транскрипційного фактора STAT6 та транспортера GLUT1, а також активність ферментів лактатдегідрогенази і глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. Результати метаболічних змін підтверджено за допомогою індукторів і інгібіторів гліколізу, а вплив *B. animalis* на чутливість пухлинних клітин до паклітакселу оцінено експериментально. Також проведено детальний аналіз життєздатності та проліферативної активності клітин (Ki-67), включно з визначенням маркерів апоптозу (Bcl-2, Bax, p21^{WAF1}) та активних форм кисню.

Розділ «Обговорення результатів» містить критичний аналіз отриманих даних, зіставлення їх із сучасними літературними джерелами та формулювання обґрунтованих гіпотез щодо механізмів впливу *B. animalis* на пухлинні клітини. Виклад матеріалу є логічним, послідовним, зрозумілим і змістовним, а отримані результати мають чітке наукове пояснення на основі сучасних опублікованих даних.

Висновки дисертації повністю відповідають поставленій меті та завданням, базуються на отриманих експериментальних даних і підтверджують наукову обґрунтованість висновків.

Список використаних джерел включає 229 публікацій українських та міжнародних видань.

Таким чином, дисертаційна робота Козак Тамари відповідає існуючим вимогам та є завершеною науковою працею, результати якої вирішують актуальну наукову задачу сучасної експериментальної онкології.

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 відкривають нові перспективи для подальших наукових досліджень, спрямованих на вивчення складних взаємодій між компонентами пухлинного мікрооточення, зокрема бактеріями, та злоякісно трансформованими клітинами. Зокрема, розроблена дисертанткою модель співкультивування живих еукаріотичних та бактеріальних клітин *in vitro*

дозволяє систематично оцінювати вплив мікробіоти на метаболічні та проліферативні процеси пухлинних клітин, а також досліджувати взаємодії на різних рівнях регуляції клітинного метаболізму. Дана модель має потенціал до впровадження в практичну діяльність для дослідження комплексних взаємодій клітин людини з мікробіотою.

Крім того, робота демонструє значний потенціал молочнокислих бактерій як регуляторів метаболічного профілю пухлинних клітин, що створює наукову основу для подальшого розвитку та вдосконалення нових стратегій метаболічної терапії злоякісних новоутворень. Використання таких підходів може сприяти створенню більш персоналізованих методів лікування, які враховують взаємодію пухлинних клітин з мікробіотою, і відкрити нові можливості для підвищення ефективності існуючих протипухлинних терапевтичних схем.

Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності

У процесі проведення експертної оцінки дисертаційної роботи «*Bifidobacterium animalis* як модифікатор процесів гліколізу в клітинах ліній раку молочної залози різних молекулярних підтипів» за допомогою програмного забезпечення Strike Plagiarism було підтверджено, що текст дисертації є оригінальним і не містить ознак академічного плагіату, фальсифікації чи інших порушень наукової етики, що свідчить про високий рівень наукової доброчесності автора та самостійність проведеного дослідження.

Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації, запитання до здобувача

Дисертаційна робота Козак Тамари Павлівни є чітко структурованою, логічно побудованою та містить науково обґрунтовані положення. Водночас під час рецензування було виявлено окремі зауваження щодо оформлення, які носять допоміжний характер і не зменшують наукову цінність роботи, а лише спрямовані на її удосконалення.

Зауваження:

У тексті дисертації зустрічаються стилістичні та орфографічні помилки, що потребують коригування. Ці недоліки, однак, не впливають на загальну

якість дослідження та його значущість, і можуть бути легко виправлені при подальшому редагуванні.

У порядку дискусії бажано почути відповідь на деякі запитання:

1. Для визначення життєздатності еукаріотичних клітин Ви використовували декілька колориметричних методів, зокрема забарвлення кристалічним фіолетовим, трипановим синім або МТТ тест. Чим було обумовлене використання такого комплексу методів?

2. В різних серіях досліджень при співкультивуванні використані різні вихідні співвідношення еукаріотичних і бактеріальних клітин. Чим обумовлений вибір певного співвідношення клітин?

3. Отримані Вами результати свідчать, що посилення цитотоксичної дії паклітакселу після співкультивування з *B. animalis* спостерігали лише в клітинах РМЗ базального підтипу MDA-MB-231. Чим Ви можете пояснити такий ефект?

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які передбачені для здобуття наукового ступеня доктора філософії (PhD)

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 – відкривають особливості регуляції метаболізму глюкози в злоякісно трансформованих клітинах різних молекулярних підтипів молочно-кислими бактеріями.

За 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 рецензент:

провідн.н.с. відділу

моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії

Інституту експериментальної

патології, онкології і радіобіології

ім. Р.Є. Кавецького НАН України,

старший дослідник, кандидат біологічних наук

 Наталія ФЕДОСОВА



Підпис *Наталії Федосової*
ЗАСВІДЧУЮ
в відділу кадрів ін-ту
Тамара Лебедева