

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького Національна академія наук України
Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КОЗАК ТАМАРА ПАВЛІВНА

УДК: 616-006:579.083.13

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

091 – Біологія

09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Козак Т.П.

Науковий керівник (консультант) Лихова Олександра Олександрівна, кандидат біологічних наук, старший дослідник.

Київ - 2025

АНОТАЦІЯ

Козак Т.П. *Bifidobacterium animalis* як модифікатор процесів гліколізу в клітинах ліній раку молочної залози різних молекулярних підтипів - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктор філософії у галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія. – Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національна академія наук України. Київ, 2025.

Рак молочної залози (РМЗ) залишається провідною онкологічною патологією серед жінок, а його агресивність значною мірою зумовлена здатністю пухлинних клітин до перебудови процесів енергетичного обміну. Метаболічна пластичність є однією із ключових властивостей злоякісно трансформованих клітин необхідною для забезпечення високих енергетичних потреб, виживаності, проліферації, метастазування і резистентності до дії протипухлинних препаратів. Метаболізм пухлинних клітин регулюється клітинними і розчинними компонентами пухлинного мікрооточення, до яких сьогодні відносять і мікробіом. Молочно-кислі бактерії, зокрема біфідобактерії, є важливими представниками мікробіоти молочної залози людини. Сьогодні відомо, що *Bifidobacterium* можуть інгібувати проліферацію злоякісно трансформованих клітин шляхом активації прокаспаз і посилення регуляції проапоптичних білків Вах. Також, на прикладі *B. animalis subsp. lactis BB-12* показана протизапальна активність біфідобактерій. Однак, існує припущення, що *Bifidobacterium* і потенційно інші молочнокислі бактерії здатні посилювати ефект Варбурга в пухлинних клітинах шляхом підвищення біодоступності лактату. Такі метаболічні зміни можуть призводити до прогресування пухлини і зниження ефективності хіміотерапії.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню впливу бактерій виду *Bifidobacterium animalis* на показники гліколізу, проліферацію, життєздатність і ефекти модифікаторів метаболізму глюкози в клітинах РМЗ людини різних молекулярних підтипів у новій експериментальній системі *in vitro*.

При виконанні дисертаційної роботи було вперше розроблено, оптимізовано та валідовано методику співкультивування клітин РМЗ різних молекулярних підтипів із живими бактеріями виду *B. animalis subsp. lactis* BB-12 *in vitro* в умовах оптимальних для культури клітин. Аналіз кінетики росту *B. animalis* у поживному середовищі для культур клітин шляхом визначення концентрації бактерій за їх оптичною щільністю при довжині хвилі 600 нм показав, що lag-фаза триває від 2 до 6 годин. log-фаза триває 24 години і при цьому кількість життєздатних клітин біфідобактерій досягає максимальної концентрації, а через 72 години інкубації кількість життєздатних бактерій починає знижуватись. Отримані результати підтверджені мікробіологічними методами. За допомогою біохімічних методів проведено аналіз метаболічної активності біфідобактерій, результати якого свідчать, що *B. animalis* споживають глюкозу і продукують лактат, однак не спричиняють виснаження поживного середовища, а рН не знижується до критичного для клітин РМЗ рівня. *B. animalis* поглинають не більше 13% від загального обсягу спожитої глюкози за умови їх співкультивування з РМЗ. Оцінка кінетики росту *B. animalis* в присутності клітин РМЗ з використанням математичної моделі Вейбула показала, що тривалість фаз росту бактеріальної популяції не змінюється. При цьому спостерігається збільшення приросту біомаси *B. animalis* на 20-30%. Колориметричними методами показано, що статистично достовірне зменшення кількості живих клітин РМЗ всіх досліджених ліній, в порівнянні з контролем, наявне лише через 48 годин інкубації з *B. animalis* при початковому співвідношенні еукаріотичних клітин до бактеріальних 1/400 та 1/100. За результатами проведених експериментів вперше було визначено умови співкультивування еукаріотичних і бактеріальних клітин (склад, рН і об'єм поживного середовища; температура, вологість, CO₂; співвідношення, кінетика росту і життєздатність клітин обох типів; час інкубації), контроль яких забезпечує інформативність та відтворюваність цієї експериментальної моделі.

Методами біохімічного аналізу вперше встановлено, що співкультивування клітин РМЗ з *B. animalis* призводить до підвищення швидкості споживання глюкози і продукції лактату, активності лактатдегідрогенази і змін активності глюкозо-6-

фосфатдегідрогенази в клітинах РМЗ як люмінального, так і базального молекулярних підтипів, що свідчить про посилення гліколітичного шляху метаболізму глюкози. Найбільш виражені зміни метаболічного профілю спостерігали в клітинах люмінального підтипу ліній MCF-7 і T47D. Статистично значуще підвищення швидкості споживання глюкози і продукції лактату в клітинах MDA-MB-231 показано лише через 48 годин експозиції цих клітин з пробіотиком.

За допомогою методу проточної цитометрії визначено експресію рецепторів інсуліну в клітинах РМЗ після їх співкультивування з *B. animalis*. Вперше показано, що в клітинах T47D, які характеризуються найвищим вихідним рівнем експресії рецептора інсуліну, *B. animalis* викликає зниження експресії трансмембранного білка, а в клітинах MCF-7 та MDA-MB-231 – посилення експресії рецептора.

Методом імуноцитохімічного аналізу вперше в клітинах РМЗ всіх ліній після співкультивування з *B. animalis* показано статистично значуще підвищення експресії фактору транскрипції STAT6 на 27-82%, а в клітинах люмінального підтипу посилення експресії транспортера глюкози GLUT1 на 30-80% в порівнянні з контролем клітин. Встановлено, що співкультивування клітин РМЗ всіх підтипів з *B. animalis* призводить до статистично достовірного зниження експресії маркера проліферації Ki-67 на 45-60%, а в клітинах люмінального підтипу до підвищення експресії проапоптичних білків Bax (у 2-5 разів) і p21^{WAF1} (у 2 рази) в порівнянні з інтактними клітинами. При цьому в клітинах T47D виявлено транслокацію білка p21^{WAF1} до ядра, що свідчить про його функцію як онкосупресора.

Методом проточної цитометрії в клітинах лінії MDA-MB-231 після експозиції з *B. animalis* показано підвищення продукції активних форм кисню в 3 рази в порівнянні з інтактними клітинами.

З метою підтвердження висновків щодо напрямку зміни метаболічної активності клітин РМЗ за умов їх співкультивування з *B. animalis* біохімічними і колориметричними методами вперше показано, що послідовна обробка клітин люмінального підтипу T47D та MCF-7 *B. animalis* та інгібітором гліколізу 2-дезоксиглюкозою призводить до зниження швидкості споживання глюкози і продукції лактату клітинами РМЗ, а також підвищення їх чутливості до

цитотоксичної дії 2-DG у 2 рази в порівнянні з інтактними клітинами. Отримані результати довели, що *B. animalis* посилюють в клітинах РМЗ люмінального підтипу гліколітичний шлях метаболізму глюкози.

Вперше доведено, що в клітинах РМЗ *B. animalis* впливають на метаболічні ефекти індуктора гліколізу метформіну. В клітинах MCF-7 *B. animalis* потенціює ефекти метформіну як активатора гліколізу, про що свідчить статистично значуще підвищення швидкості споживання глюкози і продукції лактату, а також активності лактатдегідрогенази. В клітинах T47D і MDA-MB-231 обробка *B. animalis* переспрямовує дію метформіну у бік посилення пентозофосфатного шляху, що підтверджується збільшенням швидкості споживання глюкози на фоні відсутності змін продукції лактату і посиленням активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. Такі метаболічні зміни свідчать, що *B. animalis* впливають на різні ланки гліколізу в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів.

Оскільки зміни метаболічної активності пухлинних клітин напряду впливають на їх чутливість до дії хіміопрепаратів, в даній роботі було досліджено цитотоксичну дію Паклітакселу на клітини РМЗ, які попередньо зазнавали метаболічної модифікації при співкультивуванні з *B. animalis*. 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 хіміопрепарату в порівнянні з клітинами, які інкубували з паклітакселом або *B. animalis* окремо. Такий ефект супроводжується синергічним посиленням гліколізу і пентозофосфатного шляху в клітинах MDA-MB-231, які зазнали впливу обох агентів.

Отримані фундаментальні дані розширюють існуючі уявлення про механізми взаємодії представників мікробіоти, зокрема біфідобактерій, і злоякісно трансформованих клітин, які відрізняються за своїм проліферативним потенціалом і метаболічним фенотипом.

Розроблена модель контрольованого співкультивування еукаріотичних клітин із життєздатними бактеріальними культурами *in vitro* є зручним

інструментом для подальшого вивчення складних взаємодій між елементами пухлинного мікрооточення і злоякісно трансформованими клітинами.

Результати, отримані в даній роботі, свідчать, що *B. animalis* можуть виступати впливовим регулятором метаболізму глюкози в клітинах РМЗ, що робить їх важливим учасником злоякісного процесу. Отримані дані обґрунтовують доцільність подальшого вивчення молочно-кислих бактерій як регуляторів метаболічного фенотипу злоякісно трансформованих клітин, що може стати основою для розробки інноваційних підходів до метаболічної терапії злоякісних новоутворень. Такий підхід відкриває нові можливості для підвищення ефективності лікування РМЗ та може не лише знизити резистентність до хіміотерапії, а й покращити показники виживаності, сприяючи переходу до персоналізованої мікробіомно-орієнтованої терапії злоякісних захворювань.

Ключові слова: рак молочної залози, *Bifidobacterium*, мікробіота, *in vitro*, метаболізм глюкози крива росту, рН, культура клітин, апоптоз, активні форми кисню, лактатдегідрогеназа, 3D культура, сфероїди, клітини карциноми, кондиціоноване середовище, проонкогенні ефекти, протипухлинний ефект, експресія, протеїнкіназа, проліферація, цитотоксичність, паклітаксел, рецептор інсуліну, GLUT1, STAT6, метформін, 2-дезоксиглюкоза, аналіз життєздатності клітин, протипухлинна терапія, транскрипційні фактори, протипухлинна резистентність, гліколіз, споживання глюкози, виробництво лактату, інгібітор, протипухлинний препарат, окисно-відновний стан, гомеостатична функція, вплив на транскрипцію, супероксидні радикали, оксидативний стрес, синергетична терапія раку.

ANNOTATION

Kozak T.P. *Bifidobacterium animalis* as a Modulator of Glycolytic Processes in Breast Cancer Cell Lines of Different Molecular Subtypes – Qualification Scientific Thesis Manuscript.

Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy in the Field of Knowledge 09 – Biology, Speciality 091 – Biology. – R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of the National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv, 2025.

Breast cancer (BC) remains the leading oncological pathology among women, and its aggressiveness is largely driven by the ability of tumor cells to reprogram their energy metabolism. Metabolic plasticity is one of the key features of malignantly transformed cells, essential for meeting their high energy demands, sustaining survival, proliferation, metastasis, and resistance to anticancer therapies. The metabolism of tumor cells is regulated by both cellular and soluble components of the tumor microenvironment, which now also includes the microbiome. Lactic acid bacteria, particularly bifidobacteria, are important constituents of the human breast microbiota. It is currently known that *Bifidobacterium* spp. can inhibit malignant cell proliferation by activating procaspases and upregulating the pro-apoptotic protein Bax. Furthermore, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 has been shown to exhibit anti-inflammatory activity. However, there is a hypothesis that *Bifidobacterium* and potentially other lactic acid bacteria may enhance the Warburg effect in tumor cells by increasing lactate bioavailability. Such metabolic alterations may contribute to tumor progression and reduce the efficacy of chemotherapy.

The dissertation is devoted to investigating the effects of *Bifidobacterium animalis* on glycolytic activity, proliferation, viability, and the action of glucose metabolism modulators in human breast cancer cells of different molecular subtypes, using a novel *in vitro* experimental system.

In this dissertation, a method for co-culturing human breast cancer cells of different molecular subtypes with live *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12

under *in vitro* conditions optimal for mammalian cell culture was developed, optimized, and validated for the first time. Analysis of the growth kinetics of *B. animalis* in cell culture medium, performed by measuring bacterial concentration based on optical density at 600 nm, revealed that the lag phase lasts approximately from 2 to 6 hours. The logarithmic (log) growth phase lasts for 24 hours, during which the number of viable *Bifidobacterium* cells reaches its maximum concentration. After 72 hours of incubation, the number of viable bacteria begins to decline. Standard microbiological methods confirmed these findings. The metabolic activity of *B. animalis* was assessed using biochemical assays, which demonstrated that the bacteria consume glucose and produce lactate; however, they do not deplete the nutrient medium nor cause a decrease in pH to levels critical for breast cancer cell viability. Under co-culture conditions with breast cancer cells, *B. animalis* consumed no more than 13% of the total available glucose. Evaluation of *B. animalis* growth kinetics in the presence of breast cancer cells, using a Weibull mathematical growth model, showed that the duration of the bacterial growth phases remained unchanged. Nevertheless, a 20–30% increase in *B. animalis* biomass accumulation was observed. Colorimetric assays demonstrated a statistically significant reduction in the number of viable breast cancer cells across all studied cell lines only after 48 hours of incubation with *B. animalis*, and only at initial eukaryotic-to-bacterial cell ratios of 1/400 and 1/100, compared to control conditions. Based on the results of these experiments, for the first time, the specific parameters required for the co-cultivation of eukaryotic and bacterial cells were defined. These parameters include the composition, pH, and volume of the culture medium; temperature, humidity, and CO₂ concentration; the cell ratio; growth kinetics and viability of both cell types; and incubation time. Careful control of these variables ensures the reliability, reproducibility, and informativeness of this experimental model.

Using biochemical analysis, it was established for the first time that co-cultivation of breast cancer cells with *B. animalis* leads to an increase in glucose consumption rate, lactate production, lactate dehydrogenase (LDH) activity, and alterations in glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity in both luminal and basal molecular subtype cells. These findings indicate an enhancement of the glycolytic pathway of glucose

metabolism. The most pronounced changes in the metabolic profile were observed in luminal subtype cell lines MCF-7 and T47D. In contrast, a statistically significant increase in glucose consumption and lactate production in MDA-MB-231 cells (a basal-like subtype) was detected only after 48 hours of exposure to the probiotic.

Using flow cytometry, the expression of insulin receptors in breast cancer cells was assessed following co-cultivation with *B. animalis*. For the first time, it was demonstrated that in T47D cells characterized by the highest basal level of insulin receptor expression *B. animalis* induces a reduction in the expression of this transmembrane protein. In contrast, an increase in insulin receptor expression was observed in MCF-7 and MDA-MB-231 cells following exposure to *B. animalis*.

Using immunocytochemical analysis, it was demonstrated for the first time that co-cultivation with *B. animalis* induces a statistically significant increase in the expression of the transcription factor STAT6 by 27–82% across all breast cancer cell lines. In luminal subtype cells, this co-cultivation also resulted in a 30–80% upregulation of the glucose transporter GLUT1 compared to control cells. Furthermore, co-cultivation with *B. animalis* led to a statistically significant reduction in the proliferation marker Ki-67 by 45–60% in all breast cancer subtypes. In luminal subtype cells, there was a concomitant increase in the expression of pro-apoptotic proteins Bax (2–5-fold) and p21^{WAF1} (2-fold) relative to untreated cells. Notably, in T47D cells, nuclear translocation of p21^{WAF1} was observed, indicating its functional role as a tumor suppressor.

A 3-fold increase in the production of reactive oxygen species was shown in MDA-MB-231 cells after exposure to *B. animalis* by the flow cytometry method.

To confirm the direction of changes in metabolic activity of breast cancer cells during co-cultivation with *B. animalis*, biochemical and colorimetric assays were employed for the first time to demonstrate that sequential treatment of luminal subtype cells T47D and MCF-7 with *B. animalis* followed by the glycolysis inhibitor 2-deoxyglucose (2-DG) results in a decrease in glucose consumption and lactate production by the cancer cells. Additionally, this treatment significantly increased their sensitivity to the cytotoxic effects of 2-DG by 2-fold compared to untreated cells. These results provide

strong evidence that *B. animalis* enhances the glycolytic pathway of glucose metabolism in luminal subtype breast cancer cells.

For the first time, it has been demonstrated that *Bifidobacterium animalis* modulates the metabolic effects of the glycolysis inducer metformin in breast cancer cells. In MCF-7 cells, *B. animalis* potentiates the effects of metformin as a glycolysis activator, as evidenced by a statistically significant increase in glucose consumption, lactate production, and lactate dehydrogenase activity. In contrast, in T47D and MDA-MB-231 cells, treatment with *B. animalis* redirects metformin's action towards enhancement of the pentose phosphate pathway, demonstrated by an increased glucose uptake without corresponding changes in lactate production and an elevated activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase. These metabolic alterations indicate that *B. animalis* differentially influences distinct steps of glycolysis in breast cancer cells of various molecular subtypes.

Since alterations in tumor cell metabolic activity directly affect their sensitivity to chemotherapeutic agents, this study investigated the cytotoxic effect of paclitaxel on breast cancer cells that were metabolically modified through prior co-cultivation with *Bifidobacterium animalis*. For the first time, it was demonstrated that co-cultivation of luminal subtype breast cancer cells with *B. animalis* does not affect their sensitivity to paclitaxel cytotoxicity. However, in basal subtype MDA-MB-231 cells, treatment with *B. animalis* enhances the cytotoxic effect of paclitaxel compared to cells treated with either paclitaxel or *B. animalis* alone. This synergistic effect is accompanied by amplified glycolytic and pentose phosphate pathway activity in MDA-MB-231 cells exposed to both agents.

The fundamental data obtained in this study expand current understanding of the mechanisms underlying interactions between microbiota members, particularly bifidobacteria, and malignant cells, which differ in their proliferative capacity and metabolic phenotype.

The developed model of controlled co-cultivation of eukaryotic cells with viable bacterial cultures *in vitro* represents a convenient and reliable tool for further

investigation of the complex interactions between components of the tumor microenvironment and malignant cells.

The results obtained in this study indicate that *Bifidobacterium animalis* can act as a significant regulator of glucose metabolism in breast cancer cells, positioning them as important participants in the malignant process. These findings provide a rationale for further investigation of lactic acid bacteria as modulators of the metabolic phenotype of malignant cells, which may serve as a foundation for the development of innovative metabolic therapy approaches for cancer. Such an approach opens new avenues to enhance the efficacy of breast cancer treatment, potentially reducing chemoresistance and improving survival outcomes, thereby facilitating the transition toward personalized, microbiome-oriented therapy for malignancies.

Keywords: breast cancer, *Bifidobacterium*, microbiota, *in vitro*, glucose metabolism, growth curve, pH, cell culture, apoptosis, reactive oxygen species, glucose, lactate, STAT6, GLUT1, lactate dehydrogenase, 3D culture, spheroids, carcinoma cells, conditioned medium, prooncogenic effects, antitumor effect, expression, protein kinase, proliferation, cytotoxicity, paclitaxel, insulin receptor, GLUT1, STAT6, metformin, 2-deoxyglucose, cell viability assay, anticancer therapy, transcription factors, antitumor resistance, glycolysis, glucose consumption, lactate production, lactate inhibitor, antitumor drug, redox state, homeostatic function, transcription influence, superoxide radicals, oxidative stress, synergistic cancer therapy.

Список публікацій здобувача

1. Kozak, T., Lykhova, O., Serhiichuk, T., Bezdienieznykh, N., Chekhun, V. (2023). Optimization of experimental model systems for evaluating reciprocal influence of *Bifidobacterium animalis* and human breast cancer cells *in vitro*. *Experimental Oncology*, 45(4), 504–514. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2023.04.504>
2. Kozak, T., Lykhova, O. (2024). Пригнічення проліферації та підвищення експресії проапоптотичних білків в клітинах раку молочної залози людини після їх співкультивування з *Bifidobacterium animalis in vitro*. *Онкологія*, 25(1), 29–37. <https://doi.org/10.15407/oncology.2024.01.029>
3. Kozak, T., Lykhova, O., Chekhun, V. (2025). Reprogramming of glucose metabolism in human breast cancer cells after co-cultivation with *Bifidobacterium animalis*. *Experimental Oncology*, 47(1), 3–15. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2025.01.003>
4. Kozak, T. P., Lykhova, O. O., Virych, P. A., Chekhun. (2025). Modification of breast cancer cells' sensitivity to metformin due to co-cultivation with *B.animalis*. *Biotechnologia Acta*, 18(2), 54–56. <https://doi.org/10.15407/biotech18.02.054>
5. Козак Т.П., Лихова О.О., Безденежних, Н. О., Чехун, В. Ф. (11-13 вересня 2024). Зміни метаболізму глюкози в клітинах РМЗ людини після їх співкультивування з *Bifidobacterium animalis in vitro*. 7-й з'їзд Всеукраїнської громадської організації «Українське товариство клітинної біології» з міжнародним представництвом. Інститут біології клітини Львівського національного університету імені Івана Франка. Львів, Україна. 2024. С. 38.
6. Козак, Т. П., Лихова, О. О., Безденежних, Н. О. (19-20 вересня 2024). *Особливості впливу Bifidobacterium animalis на життєздатність клітин РМЗ людини in vitro*. Міжнародна наукова конференція «Єдине здоров'я – 2024». Факультет ветеринарної медицини НУБіП України. Київ, Україна. 2024. С. 13-14.
7. Kozak, T., Lykhova, O., Bezdienieznykh, N. (April 08-11 2025). The increase in sensitivity of ER+PR+ breast cancer cells to 2-deoxyglucose as a result of co-cultivation with *Bifidobacterium animalis in vitro*. Proceedings of the XIV International Scientific

and Practical Conference. Tokyo, Japan. 2025. P. 46–48.
<https://doi.org/10.46299/isg.2025.1.14>

8. Козак Т.П., Лихова О.О. (23-25 квітня 2025). *Bifidobacterium animalis* and metformin as modifiers of glucose metabolism by breast cancer cells *in vitro*. XXII Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення в науках про життя». Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Київ, Україна. 2025. С. 185-187.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

2-DG	- 2-дезоксиглюкоза
MTF	- метформін
PAX	- паклітаксел
АФК	- активні форми кисню
ВА	- <i>Bifidobacterium animalis</i>
Г6ФД	- глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа
ЛДГ	- лактатдегідрогеназа
PI	- рецептор інсуліну
PMЗ	- рак молочної залози
ШПЛ	- швидкість продукції лактату
ШСГ	- швидкість споживання глюкози

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	14
ВСТУП	18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	26
1.1. Особливості метаболізму глюкози у злоякісно трансформованих клітинах	26
1.2. Фактори мікробіому у формуванні пухлинного мікрооточення.....	30
1.3. Вплив мікробіоти на особливості біології пухлинної клітини.....	35
1.4. Сучасні підходи до метаболічного репрограмування злоякісно трансформованих клітин	37
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	41
2.1. Матеріали.....	42
2.2. Методи.....	45
2.2.1. Методи культури клітин.....	45
2.2.2. Мікробіологічні методи.....	56
2.2.3. Біохімічні методи	58
2.2.4. Імуноцитохімічний аналіз	60
2.2.5. Проточна цитометрія	61
2.2.6. Статистичний аналіз	63
РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МОДЕЛІ СПІВКУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ З <i>B. ANIMALIS</i> В СИСТЕМІ <i>IN VITRO</i>	64
3.1. Ростові і метаболічні характеристики <i>B. animalis</i> у повному поживному середовищі для культури еукаріотичних клітин.....	66

3.2. Порівняльний аналіз життєздатності клітин РМЗ різних молекулярних підтипів за умов їх прямого і безконтактного співкультивування з живими та інактивованими теплом <i>B. animalis</i>	70
3.3. Кінетика росту <i>B. animalis</i> за умов їх співкультивування з клітинами РМЗ людини різних молекулярних підтипів	77
РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ <i>B. ANIMALIS</i> НА ПРОЦЕСИ ГЛІКОЛІЗУ В КЛІТИНАХ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ РІЗНИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ ПІДТИПІВ.....	84
4.1. Зміни швидкості поглинання глюкози та продукції лактату клітинами РМЗ різних молекулярних підтипів після їх співкультивування з <i>B. animalis</i>	85
4.2. Аналіз впливу <i>B. animalis</i> на експресію рецептора інсуліну в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів	92
4.3. Зміни експресії GLUT1 та STAT6 в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів після співкультивування з <i>B. animalis</i>	93
4.4. Вплив <i>B. animalis</i> на активність ферментів лактатдегідрогенази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів	97
4.5. Оцінка впливу індуктора або інгібітора гліколізу на метаболізм глюкози клітинами РМЗ різних молекулярних підтипів після співкультивування з <i>B. animalis</i>	100
4.6. Модифікуючий вплив <i>B. animalis</i> на чутливість клітин РМЗ різних молекулярних підтипів до цитотоксичної дії паклітакселу.....	117
РОЗДІЛ 5. ОЦІНКА ВПЛИВУ <i>B. ANIMALIS</i> НА ПРОДУКЦІЮ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ ТА ЕКСПРЕСІЮ МАРКЕРА ПРОЛІФЕРАЦІЇ І БІЛКІВ-РЕГУЛЯТОРІВ АПОПТОЗУ В КЛІТИНАХ РМЗ РІЗНИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ ПІДТИПІВ <i>IN VITRO</i>	125
5.1. Рівень активних форм кисню в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів після їх співкультивування з <i>B. animalis</i>	126

5.2. Оцінка експресії маркера проліферації та білків-регуляторів апоптозу в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів після співкультивування з живими <i>B. animalis</i>	127
РОЗДІЛ 6. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	135
ВИСНОВКИ.....	Помилка! Закладку не визначено.
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	150
ДОДАТОК А.....	180

ВСТУП

Актуальність теми. Рак молочної залози є найпоширенішим злоякісним новоутворенням серед жінок у всьому світі та пов'язаний із високим рівнем смертності, незважаючи на постійне вдосконалення стратегій лікування [1–3]. Однією з фундаментальних ознак злоякісно трансформованих клітин є їх здатність до метаболічного репрограмування — зміни метаболізму у відповідь на фізіологічні або патологічні чинники, що сприяє їх кращій адаптації, росту та виживаності [4,5]. Агресивність РМЗ значною мірою зумовлена здатністю пухлинних клітин до перебудови процесів енергетичного обміну. Особливу увагу привертає метаболізм глюкози, оскільки саме гліколіз, навіть за наявності кисню, стає домінантним енергетичним шляхом у більшості пухлин, забезпечуючи клітини як енергією, так і проміжними метаболітами для синтезу макромолекул. У злоякісно трансформованих клітинах активне поглинання глюкози забезпечується високою експресією транспортерів GLUT, а кінцеві продукти метаболізму, зокрема лактат, відіграють сигнальну роль, забезпечуючи підтримку злоякісного фенотипу пухлинних клітин [6]. Метаболізм злоякісно трансформованих клітин регулюється клітинними, позаклітинними і розчинними компонентами пухлинного мікрооточення [4]. Сьогодні новим компонентом пухлинного мікрооточення визнано мікробіом, який має надзвичайно тісний та складний взаємозв'язок з пухлиною [5]. Молочно-кислі бактерії, зокрема біфідобактерії, є важливими представниками мікробіоти молочної залози людини. Відомо, що *Bifidobacterium* можуть інгібувати проліферацію злоякісно трансформованих клітин шляхом активації прокаспаз і посилення регуляції проапоптичних білків Вах [7,8]. Також, на прикладі *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 показана протизапальна активність біфідобактерій [9]. Однак, деякі автори, зокрема Mizuta (2016) [10] та Zaharuddin (2019) [11], висувують припущення, що *Bifidobacterium* як і інші молочнокислі бактерії здатні посилювати ефект Варбурга в пухлинних клітинах шляхом підвищення біодоступності лактату і впливати на прогресування пухлини.

На сьогодні бракує цільових досліджень, присвячених аналізу впливу *Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12* на метаболізм глюкози саме в клітинних моделях РМЗ, особливо з урахуванням різних молекулярних підтипів клітин. Актуальність таких досліджень зумовлена тим, що різні підтипи РМЗ характеризуються відмінним метаболічним фенотипом, що включає варіабельність у споживанні глюкози, активності пентозофосфатного шляху або компенсаційного ОХРНOS [12,13]. Слід відмітити, що найчастіше для проведення експериментів із мікроорганізмами в системі *in vitro* застосовують інактивовані теплом бактерії [14]. Однак, хоча вони і зберігають цілісність компонентів клітинної стінки, ефекти, отримані від взаємодії еукаріотичних клітин саме з живими бактеріями, є більш інформативними та наближеними до умов *in vivo* [15]. Враховуючи все викладене вище, актуальність даної роботи обумовлена необхідністю комплексного аналізу впливу живих *Bifidobacterium animalis* на певні показники гліколізу та експресії білків, асоційованих з метаболізмом глюкози в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами

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» (2020-2021pp.), 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 pp., № 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 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).

Мета дослідження. З'ясувати вплив *Bifidobacterium animalis* (*B. animalis*) на показники гліколізу, проліферацію, життєздатність і ефекти модифікаторів метаболізму глюкози в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів у новій експериментальній системі *in vitro*.

Завдання дослідження.

1. Розробити та оптимізувати *in vitro* експериментальну модель співкультивування клітин РМЗ людини різних молекулярних підтипів та *B. animalis* в умовах стандартних для культур еукаріотичних клітин.
2. Охарактеризувати вплив *B. animalis* на швидкість споживання глюкози і продукції лактату, а також активність лактатдегідрогенази і глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів *in vitro*.
3. Дослідити експресію рецепторів інсуліну, транспортера глюкози GLUT1 і транскрипційного фактору STAT6 в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів після їх співкультивування з *B. animalis*.
4. Оцінити продукцію АФК, експресію маркера проліферації Ki-67 і білків асоційованих з регуляцією апоптозу в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів за умов їх експозиції з *B. animalis*.
5. Порівняти характер змін біохімічних показників метаболізму глюкози в клітинах РМЗ після їх співкультивування з *B. animalis* і подальшої обробки інгібітором гліколізу 2-дезоксиглюкозою або індуктором гліколізу метформіном.
6. Дослідити ефекти комплексного впливу *B. animalis* і паклітакселу на показники гліколізу і життєздатність клітин РМЗ різних молекулярних підтипів.

Об'єкт дослідження - клітини РМЗ людини люмінального підтипу ліній MCF-7, T47D і базального підтипу MDA-MB-231, ліофілізована і життєздатна культура бактерій виду *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12.

Предмет дослідження - оптимальні умови співкультивування клітин РМЗ різних молекулярних підтипів з *B. animalis in vitro*; вплив *B. animalis* на швидкість споживання глюкози і продукції лактату, активність лактатдегідрогенази і

глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, експресію рецепторів інсуліну, GLUT1 і STAT6 в клітинах РМЗ *in vitro*; вплив *B. animalis* на продукцію АФК, проліферацію і регуляцію апоптозу в клітинах РМЗ; вплив 2-дезоксиглюкози або метформіну на життєздатність, швидкість споживання глюкози і продукції лактату, активність лактатдегідрогенази і глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в клітинах РМЗ після їх співкультивування з *B. animalis*; вплив *B. animalis* на чутливість клітин РМЗ до цитотоксичної дії паклітакселу *in vitro*.

Методи дослідження. Життєздатність клітин РМЗ визначали колориметричним методом шляхом їх фарбування кристалічним фіолетовим, в тесті з трипановим синім або методом проточної цитометрії після фарбування клітин пропідій йодидом. Кінетику росту *Bifidobacterium animalis* в поживному середовищі для культур клітин аналізували за допомогою методу турбідиметрії шляхом визначення концентрації бактерій за їх оптичною щільністю при довжині хвилі 600 нм. Паралельно визначали життєздатність біфідобактерій в новій експериментальній системі співкультивування за допомогою стандартного мікробіологічного методу – посіву десятикратних розведень бактеріальної суспензії на елективне поживне середовище для біфідобактерій. Швидкість споживання глюкози і продукції лактату, а також внутрішньоклітинну активність лактатдегідрогенази і глюкозо-6-фосфатдегідрогенази оцінювали біохімічними методами з використанням відповідних діагностичних наборів і автоматичного біохімічного аналізатора. Дихальну активність клітин РМЗ визначали за допомогою МТТ-тесту. Методом імуноцитохімічного аналізу оцінювали експресію білків, асоційованих з регуляцією процесів гліколізу (GLUT1, STAT6), проліферації (Ki-67) і апоптозу (Bax, Bcl-2, p21^{WAF1}) в клітинах РМЗ. Експресію рецепторів інсуліну в клітинах РМЗ визначали шляхом їх короткотривалої інкубації з FITC-інсуліном і подальшого аналізу кількості FITC⁺ клітин та інтенсивності флуоресценції на клітині з використанням проточного цитометра. Продукцію активних форм кисню вимірювали за допомогою методу проточної цитометрії шляхом фарбування клітин 2',7'-дихлорфлуоресцеїндіацетатом. 3D-культури клітин РМЗ культивували у матриксомому гелі. Візуалізацію сфероїдів і

оцінку їх ростових характеристик здійснювали методом конфокальної мікроскопії. Статистичний аналіз результатів проводили з використанням пакету програмного забезпечення GraphGad Prism 8.0.1.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше розроблено, оптимізовано та валідовано методику співкультивування клітин РМЗ різних молекулярних підтипів із живими бактеріями виду *B. animalis subsp. lactis* BB-12 в середовищі для культури клітин *in vitro*. При цьому встановлено умови співкультивування еукаріотичних і бактеріальних клітин (склад, рН і об'єм поживного середовища; температура, вологість, CO₂; співвідношення, кінетика росту і життєздатність клітин обох типів; час інкубації), контроль яких забезпечує інформативність та відтворюваність цієї експериментальної моделі.

В роботі поглиблено наукові знання щодо ростових і метаболічних характеристик *B. animalis* за умови їх культивування в нетиповому для них поживному середовищі для культур еукаріотичних клітин. Показано, що lag-фаза росту *B. animalis* триває від 2 до 6 годин, log-фаза – 24 години і при цьому кількість життєздатних бактеріальних клітин досягає максимальної концентрації. *B. animalis* споживають глюкозу і продукують лактат.

Вперше показано, що співкультивування клітин РМЗ з *B. animalis* призводить до підвищення швидкості споживання глюкози і продукції лактату, активності лактатдегідрогенази і змін активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в клітинах РМЗ як люмінального, так і базального молекулярних підтипів, що свідчить про посилення гліколітичного шляху метаболізму глюкози. Найбільш виражені зміни метаболічного профілю спостерігали в клітинах люмінального підтипу ліній MCF-7 і T47D.

Вперше встановлено, що *B. animalis* модулює в клітинах РМЗ всіх ліній експресію рецепторів інсуліну, підвищує експресію транскрипційного фактора STAT6, а в клітинах люмінального підтипу посилює експресію транспортера глюкози GLUT1, які залучені у процеси метаболізму глюкози.

Доповнено наукові дані про те, що співкультивування всіх досліджених клітин РМЗ з *B. animalis* призводить до зниження експресії маркера проліферації

Ki-67. Також, в клітинах T47D і MCF-7, оброблених *B. animalis*, виявлено підвищення експресії проапоптичних білків Вах і p21^{WAF1}, а в клітинах MDA-MB-231 на фоні підвищення експресії Вах виявили посилення експресії антиапоптичного білка Bcl-2 і зниження експресії p21^{WAF1}.

Вперше за допомогою інгібітора гліколізу 2-дезоксиглюкози підтверджено, що співкультивування клітин РМЗ люмінального підтипу ліній MCF-7 і T47D з *B. animalis* призводить до репрограмування метаболічного профілю клітин у бік посилення гліколізу.

Вперше встановлено, що в клітинах MCF-7 *B. animalis* потенціює ефекти метформіну як активатора гліколізу. В клітинах T47D обробка *B. animalis* переспрямовує дію метформіну у бік посилення пентозофосфатного шляху.

Вперше доведено, 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. Такий ефект супроводжується синергічним посиленням гліколізу і пентозофосфатного шляху в клітинах MDA-MB-231, які зазнали впливу обох агентів.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблена модель контрольованого співкультивування еукаріотичних клітин із життєздатними бактеріальними культурами *in vitro* є зручним інструментом для подальшого вивчення складних взаємодій між елементами пухлинного мікрооточення і злоякісно трансформованими клітинами.

Отримані фундаментальні дані розширюють існуючі уявлення про механізми взаємодії представників мікробіоти, зокрема біфідобактерій, і злоякісно трансформованих клітин, які відрізняються за своїм проліферативним потенціалом і метаболічним фенотипом.

Результати проведених досліджень обґрунтовують доцільність подальшого вивчення молочно-кислих бактерій як регуляторів метаболічного фенотипу

злякiсно трансформованих клiтин, що може стати основою для розробки iнновацiйних пiдходiв до метаболiчної терапiї злякiсних новоутворень.

Особистий внесок здобувача. Дисертацiйна робота є закінченим дослідженням, виконаним безпосередньо автором. Спільно з науковим керівником сформовано мету і завдання, розроблено дизайн та план дослідження, узагальнено отримані результати та сформульовано висновки дисертацiйної роботи. Автором здiйснено iнформацiйний пошук та аналіз сучасної лiтератури за тематикою роботи. Здобувачем особисто виконано експериментальну частину роботи та статистичну обробку отриманих даних. Дисертантом повністю виконано iндивiдуальний план наукової роботи та iндивiдуальний навчальний план. Дисертант брав безпосередню участь у пiдготовцi наукових публiкацiй до друку.

Апробацiя результатiв дисертацiї. Основні положення та результати дисертацiйної роботи були представлені на наукових конференцiях рiзного рiвня. Матерiали дослідження оприлюднені у вигляді усної доповіді та тез на Мiжнародній науковій конференцiї «Єдине здоров'я – 2024» (19–20 вересня 2024, м. Київ, Україна); у вигляді постерної доповіді та публiкацiї тез на VII Конгресі Всеукраїнської громадської організації «Українське товариство клiтинної бiологiї» з мiжнародною участю (11-13 вересня, м. Львів, Україна, 2024); на Конференцiї молодих науковцiв «Актуальні проблеми бiохiмiї та бiотехнологiї – 2025» (5-6 травня, м. Київ, Україна); у вигляді публiкацiї тез на XIV Мiжнародній науково-практичній конференцiї «Transformations of the individual and society: challenges of the future» (8-11 квітня 2025 р., Токіо, Японія); та XXII Мiжнародній науковій конференцiї студентiв та молодих вчених «Шевченківська Весна – 2025» (23-25 квітня, 2025, м. Київ, Україна).

Публiкацiї. За матерiалами дисертацiї опублiковано 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 опублiковано в наукових збiрниках і матерiалах мiжнародних та українських наукових конференцiй та з'їздiв.

Структура та обсяг дисертації

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.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Особливості метаболізму глюкози у злоякісно трансформованих клітинах

Злоякісно трансформовані клітини відзначаються глибокою перебудовою метаболічних шляхів, що є однією з ключових ознак канцерогенезу. Метаболічне перепрограмування включає переважно зміни в обміні глюкози, амінокислот та ліпідів, які забезпечують енергетичні та пластичні потреби клітин, що інтенсивно проліферують [16]. Найбільш характерні зрушення стосуються саме метаболізму глюкози, який в умовах злоякісної трансформації зазнає низки змін як на рівні споживання, так і на рівні подальшої утилізації субстрату.

Однією з найважливіших характеристик метаболізму пухлинних клітин є переважання аеробного гліколізу навіть за наявності кисню — явище, відоме як ефект Варбурга [17]. Цей феномен дозволяє клітинам швидко генерувати енергію та метаболіти, необхідні для біосинтетичних процесів, одночасно підтримуючи редокс-гомеостаз і пристосовуючись до умов гіпоксії, характерних для мікрооточення пухлин. У результаті ефекту Варбурга глюкоза швидко перетворюється на лактат, який виводиться з клітини. Цей процес забезпечує не лише швидке отримання енергії у вигляді АТФ, але й створення сприятливого мікрооточення для пухлинного росту [17,18].

Гліколіз у злоякісно трансформованих клітинах виконує не лише енергетичну функцію. Його проміжні продукти активно залучаються до синтезу нуклеотидів, амінокислот, ліпідів та інших біомолекул, необхідних для клітинного росту. Це дозволяє пухлинним клітинам не лише активно проліферувати, а й адаптуватися до умов нестачі поживних речовин або кисню [18].

У процесі метаболізму глюкози першочергове значення має транспорт глюкози всередину клітини. Це відбувається за допомогою спеціальних мембранних білків — транспортерів родини GLUT. У багатьох типах пухлин виявлено підвищену експресію GLUT1, який забезпечує інтенсивне надходження глюкози з навколишнього середовища [19]. Після транспортування глюкоза

метаболізується в цитоплазмі, проходячи через кілька ферментативних перетворень і зрештою утворюючи піруват.

У більшості злоякісно трансформованих клітин піруват не надходить до мітохондрій, а швидко перетворюється на лактат. Такий напрям обміну супроводжується активним виведенням лактату через монокарбоксилатні транспортери та створенням кислого мікрооточення, що сприяє інвазії та уникненню імунного контролю [20,21]. Паралельно з цим клітина отримує енергію у вигляді АТФ та продукує метаболіти для біосинтезу.

Окрім гліколізу, злоякісно трансформовані клітини активують пентозофосфатний шлях. Цей метаболічний маршрут має два важливі завдання: забезпечення клітини рибозо-5-фосфатом — основою для синтезу ДНК і РНК, — та утворення NADPH. Останній є ключовим для підтримання антиоксидантного захисту та синтезу жирних кислот [22,23]. Завдяки цьому клітина може не лише розмножуватися, а й ефективно протистояти шкідливим факторам середовища.

Встановлено, що активність пентозофосфатного шляху тісно пов'язана з агресивністю пухлинного процесу. Підвищена експресія ферментів, які забезпечують цей шлях, часто супроводжується гіршим прогнозом та розвитком резистентності до протипухлинної терапії [24–26]. Таким чином, пентозофосфатний шлях не лише обслуговує базові потреби клітини, а й сприяє виживанню в умовах терапевтичного тиску.

Ще одним важливим напрямком перетворення глюкози у злоякісно трансформованих клітинах є серин-гліциновий каскад. Цей метаболічний шлях забезпечує синтез амінокислот серину та гліцину, які необхідні для побудови білків, нуклеотидів і мембранних структур. Крім того, продукти цього каскаду залучаються до процесів, що регулюють внутрішньоклітинний рівень окисно-відновного балансу, включаючи участь у відновленні глутатіону — ключового антиоксиданта клітини [27].

Активність серин-гліцинового каскаду може бути підвищеною в клітинах з високими темпами росту. Це пов'язано з потребою в додаткових джерелах одновуглецевих одиниць для синтезу пуринів і тимідилату, що необхідні для

реплікації ДНК. Такий тип метаболічної адаптації є типовим для пухлин, що швидко прогресують, особливо в умовах дефіциту зовнішніх джерел амінокислот [27].

Разом із гліколізом і пентозофосфатним шляхом, серин-гліциновий каскад формує функціонально взаємопов'язану систему, яка дозволяє злоякісно трансформованим клітинам оптимізувати використання глюкози для різних цілей: енергетичних, пластичних, антиоксидантних і регуляторних. Завдяки цьому глюкоза стає універсальним субстратом, що підтримує життєздатність і стійкість пухлинних клітин.

Крім того, в умовах злоякісного росту спостерігається зростання продукції активних форм кисню (АФК), які є побічними продуктами підвищеної метаболічної активності. Надлишок АФК може спричиняти ушкодження білків, ліпідів і ДНК. Тому підтримання редокс-гомеостазу набуває особливого значення. Гліколіз і пентозофосфатний шлях відіграють у цьому процесі захисну роль: перший — зменшуючи залежність від мітохондріального дихання, другий — продукуючи NADPH, який використовується для нейтралізації вільних радикалів [23].

Таким чином, метаболізм глюкози в пухлинних клітинах не обмежується виробленням енергії. Він є основою для широкого спектра адаптацій, які забезпечують зростання, виживання та стійкість злоякісної популяції у несприятливих умовах мікрооточення.

Формування зміненого метаболізму глюкози в пухлинних клітинах регулюється на рівні внутрішньоклітинної сигналізації. У цьому процесі беруть участь низка сигнальних каскадів, серед яких найбільш вивченими є PI3K/АКТ, AMPK і mTOR. Ці шляхи контролюють як експресію, так і активність основних ферментів гліколізу та транспортерів глюкози [28].

Сигнальний шлях PI3K/АКТ стимулює поглинання глюкози шляхом підвищення експресії транспортерів GLUT та їх переміщення до плазматичної мембрани [28]. Крім того, він активує ферменти гліколізу, сприяючи швидшому

перетворенню глюкози на енергетичні та синтетичні продукти [29]. Цей шлях часто активується в пухлинних клітинах внаслідок мутацій або порушень регуляції.

Інший важливий регулятор — АМРК. Його активація, як правило, є відповіддю на зниження рівня енергії в клітині. У контексті злоякісного росту АМРК може сприяти виживанню клітин, адаптуючи їх метаболізм до нестачі поживних речовин. Він також впливає на транспорт глюкози, регулюючи активність GLUT4 [30].

Система mTOR функціонує як центральний метаболічний сенсор, який координує клітинний ріст із доступністю поживних речовин. Вона активується через каскад PI3K/АКТ і включає два основні комплекси — mTORC1 та mTORC2. Перший стимулює синтез білків і гліколіз, зокрема через активацію HIF-1 α — фактора транскрипції, який індукує експресію генів гліколітичного профілю [31]. Другий активує АКТ, створюючи зворотний зв'язок, що підсилює поглинання глюкози та проліферацію [32].

Загалом, PI3K/АКТ, АМРК і mTOR формують складну регуляторну мережу, яка не лише контролює надходження та використання глюкози, але й адаптує метаболічні процеси до умов навколишнього середовища. Їхня активація в пухлинних клітинах забезпечує гнучкість і ефективність метаболічних перебудов, необхідних для підтримання злоякісного фенотипу.

Окрім сигнальних шляхів, важливу роль у регуляції метаболізму глюкози відіграють транскрипційні фактори, які безпосередньо впливають на експресію генів, пов'язаних із поглинанням і перетворенням глюкози. Одним із таких факторів є c-Мус — універсальний регулятор клітинного росту, що підвищує транскрипцію генів, відповідальних за синтез ферментів гліколізу та транспортерів глюкози [33]. Його надекспресія часто спостерігається в пухлинних клітинах і асоціюється з високою проліферативною активністю.

Гіпоксія — типове явище у внутрішніх зонах пухлин — активує ще один критичний транскрипційний фактор: HIF-1 α . У нормальних клітинах його рівень швидко знижується після відновлення кисню, однак у злоякісно трансформованих клітинах його стабілізація може відбуватись незалежно від гіпоксії. HIF-1 α

підвищує експресію ряду гліколітичних ферментів (гексокінази 2, фосфофруктокінази та лактатдегідрогенази А) і транспортерів глюкози (GLUT1, GLUT3), сприяючи переходу клітини до гліколітичного типу обміну [34]. Окрім цього, він пригнічує активність мітохондрій, посилюючи домінування анаеробного обміну.

Мутації гена p53, що часто фіксуються у пухлинних клітинах, також можуть змінювати метаболізм глюкози. У нормі p53 пригнічує експресію деяких транспортерів глюкози і ферментів гліколізу, однак при втраті його функції спостерігається зворотний ефект — активація гліколізу та зростання метаболічної активності [35].

Важливим етапом завершення гліколізу є виведення лактату з клітини. Це здійснюється за допомогою білків-переносників — монокарбоксилатних транспортерів MCT1 і MCT4. Надекспресія цих транспортерів у злоякісно трансформованих клітинах корелює з агресивністю пухлини, високою швидкістю росту та несприятливим прогнозом [36]. Лактат не лише знижує рН у мікрооточенні, а й сприяє імуносупресії та активації ангиогенезу.

Таким чином, регуляція метаболізму глюкози у злоякісно трансформованих клітинах є складним і багаторівневим процесом. Вона охоплює сигнальні каскади, транскрипційні фактори та ферментативні механізми, які взаємодіють між собою для формування адаптивного метаболічного фенотипу. Така перебудова створює сприятливі умови для росту, інвазії та резистентності пухлинних клітин, що робить метаболічні шляхи перспективними мішенями для терапевтичного впливу.

1.2. Фактори мікробіому у формуванні пухлинного мікрооточення

Пухлинне мікрооточення (tumor microenvironment, TME) є ключовим фактором у підтриманні росту, інвазивності та терапевтичної стійкості пухлин. Воно включає не лише клітини пухлини, але й фібробласти, клітини імунної системи, ендотеліальні елементи, позаклітинний матрикс, а також резидентні

мікроорганізми, зокрема бактерії [37]. Через особливості TME — зниження оксигенації, порушення васкуляризації, надлишок метаболітів та імунні зміни — пухлинна тканина створює сприятливу екологічну нішу для колонізації мікробіомом.

Накопичені дані свідчать, що бактерії здатні не лише виживати, а й адаптуватися до умов мікрооточення та модифікувати його функціональні властивості. Встановлено, що внутрішньопухлинні мікроорганізми можуть бути локалізовані всередині клітин — як пухлинних, так і імунних — або перебувати у позаклітинному просторі. Часто це бактерії з ушкодженими клітинними стінками або атиповою морфологією, що утруднює їхнє виявлення традиційними методами.

Мікроорганізми в складі TME беруть участь у регуляції низки ключових процесів пухлинного росту. Вони можуть модулювати проліферацію та апоптоз, сприяти ангіогенезу, впливати на формування протипухлинної імунної відповіді, а також спричиняти розвиток терапевтичної резистентності. Зокрема, бактерії мають здатність змінювати імунну поляризацію, впливати на активність CD8⁺ Т-клітин, регулювати утворення активних форм кисню та сприяти активації регуляторних Т-клітин, створюючи імуносупресивне мікросередовище [38].

У різних типах пухлин мікробний склад мікрооточення суттєво відрізняється, що зумовлено анатомічною специфікою тканин, доступом до васкулярної мережі, особливостями імунного контролю та метаболічного стану. Подібні закономірності описано і при раку молочної залози, зокрема в жінок молодого віку, де мікробіом має вікову та гормональну специфіку [39]. Видовий склад, кількісна представленість та функціональна активність мікробіому змінюються не лише між пухлинами різної локалізації, а й протягом різних стадій пухлинного прогресування [40].

Внутрішньопухлинний мікробіом за своїм складом і впливом на перебіг захворювання є надзвичайно варіабельним. У низці досліджень було показано, що бактеріальні популяції у пухлинах здатні як стимулювати імунну відповідь проти пухлини, так і пригнічувати її. Наприклад, бактеріальні метаболіти можуть активувати STING-каскад і сприяти залученню CD8⁺ Т-клітин, що посилює

протипухлинний імунітет. Водночас деякі види здатні підвищувати рівень оксидативного стресу, стимулювати продукцію запальних цитокінів і активувати регуляторні Т-клітини, формуючи імуносупресивне середовище [38,41].

Окрім впливу на імунітет, мікробіота пухлинного мікрооточення здатна модулювати відповідь на протипухлинну терапію. Виявлено, що деякі бактерії змінюють чутливість до хіміотерапевтичних препаратів. Зокрема, певні штами здатні метаболізувати або інактивувати препарати, що застосовуються у лікуванні злоякісних новоутворень. Наприклад, представники родів *Mycoplasma* та *Fusobacterium* асоціюються з порушенням метаболізму гемцитабіну або індукцією стовбуровості пухлинних клітин, що ускладнює досягнення терапевтичного ефекту [42,43].

Інші мікроорганізми, навпаки, потенційно здатні підвищувати ефективність лікування. Деякі метаболіти бактерій, зокрема коротколанцюгові жирні кислоти (SCFA) або продукти амінокислотного обміну, сприяють залученню ефекторних імунних клітин, зменшують імунну толерантність і можуть посилювати чутливість пухлин до імунотерапії.

Формування резистентності до лікування також пов'язане з впливом бактерій на сигнальні шляхи пухлинних клітин. Деякі види здатні активувати рецептори клітинної поверхні (наприклад, NOD1), що призводить до проліферації, підвищення стовбуровості й послаблення дії хіміопрепаратів. Описано експериментальні підходи, які передбачають одночасне використання інгібіторів бактеріальних рецепторів і протипухлинних засобів, що дозволяє зменшити проліферацію пухлинних клітин і підвищити чутливість до терапії [44].

Таким чином, внутрішньопухлинний мікробіом не є пасивним елементом мікрооточення. Його представники активно впливають на функціональні характеристики пухлинної тканини, змінюють хід пухлинного процесу та ефективність лікування. Це відкриває перспективу використання бактерій як біомаркерів перебігу захворювання або навіть як терапевтичних мішеней.

Важливу роль у взаємодії мікробіому з пухлинним мікрооточенням відіграє бактеріальний метаболізм. Бактерії, що колонізують пухлинну тканину,

продукують широкий спектр біологічно активних молекул, серед яких SCFA, вітаміни, гормоноподібні сполуки, нейромедіатори та бактеріоцини. Ці метаболіти не лише змінюють локальні умови ТМЕ, але й здатні безпосередньо впливати на сигнальні шляхи пухлинних клітин, їхню проліферацію, апоптоз і міграційні властивості.

SCFA, як-от ацетат, бутират і пропіонат, можуть регулювати експресію генів, відповідальних за клітинний цикл, а також впливати на епігенетичні механізми. Деякі з них сприяють посиленню протипухлинного імунітету, активуючи Т-лімфоцити, тоді як інші — можуть діяти імуносупресивно, залежно від концентрації та контексту [45].

Бактеріоцини — антимікробні пептиди, що пригнічують ріст конкурентних мікроорганізмів, — також демонструють потенційні протипухлинні властивості. Вони можуть змінювати проникність клітинних мембран або порушувати сигнальні шляхи пухлинних клітин. Зокрема, біфідоцин А, лактацин і подібні до них сполуки досліджуються як перспективні агенти для модуляції мікробного складу ТМЕ та пригнічення росту пухлин [46].

Іншим важливим класом бактеріальних продуктів є сполуки з імуномодулювальними властивостями. Наприклад, ліпополісахарид грамнегативних бактерій активує Toll-подібні рецептори (зокрема TLR4) на клітинах мікрооточення. Це стимулює каскадну відповідь вродженого імунітету, яка може впливати на протипухлинну активність як прямо (через активацію імунних клітин), так і опосередковано — змінюючи профіль цитокінів та імуносупресивних факторів [47].

Водночас, порушення балансу мікробіому, зменшення різноманіття або домінування патогенних штамів можуть спричинити хронічне запалення, стимулювати проліферацію пухлинних клітин і сприяти метастазуванню. Саме тому мікробний компонент мікрооточення розглядається не лише як пасивний елемент, а як динамічний фактор, що може виконувати як онкогенну, так і протипухлинну роль [48].

Роль мікробіому як формуванні пухлинного мікрооточення дедалі більше визнається ключовою у сучасній онкології. Мікроорганізми, що колонізують пухлинну тканину, беруть участь у ремоделюванні мікрооточення шляхом регуляції клітинного метаболізму, змін васкуляризації, впливу на склад і функцію імунних клітин, а також через взаємодію з позаклітинним матриксом [37,40].

Бактерії здатні індукувати локальні запальні реакції, які сприяють неоангіогенезу, формуванню фіброзу або, навпаки, деградації міжклітинного матриксу, створюючи сприятливі умови для пухлинної інвазії [49]. Залежно від бактеріального виду та метаболітів, що ним продукуються, ці ефекти можуть бути як протипухлинними, так і онкогенними. Такі подвійні ефекти мікробного впливу пояснюють складність передбачення клінічного значення мікробіому без детального видового й функціонального аналізу [48].

Особливу увагу привертає здатність бактерій формувати локальні мікробні ніші всередині пухлинного мікрооточення, які можуть діяти як незалежні регуляторні одиниці. У межах таких ніш спостерігається активна комунікація між бактеріальними клітинами та клітинами пухлини або імунної системи. Взаємодія відбувається через секрецію сигнальних молекул, контакт через рецепторні комплекси або зміну доступності метаболітів у мікросередовищі [45].

Крім того, доведено, що наявність або відсутність певних бактеріальних таксонів корелює зі змінами у складі імунних інфільтратів пухлини, профілю експресії цитокінів та здатністю пухлини уникати імунного контролю [38]. Це вказує на те, що мікробіом слід розглядати як інтегральний функціональний компонент ТМЕ, який може змінювати як локальну, так і системну протипухлинну відповідь.

Таким чином, ідентифікація специфічних мікробних патернів, що асоціюються з певними фенотипами ТМЕ, може дати змогу розробити мікробіом-орієнтовані підходи до модифікації мікрооточення з метою підвищення ефективності традиційної протипухлинної терапії або імунотерапії [50]. Подібний підхід відкриває нові перспективи для персоналізованого впливу на пухлинний процес.

1.3. Вплив мікробіоти на особливості біології пухлинної клітини

Останні дослідження переконливо свідчать, що мікробіота людини, зокрема асоційована з епітеліальними тканинами, здатна безпосередньо впливати на поведінку пухлинних клітин. У різних типах новоутворень ідентифіковано внутрішньопухлинні бактерії, які проникають до клітинної цитоплазми, модулюють сигнальні шляхи, впливають на метаболізм глюкози, індукують або пригнічують апоптоз та змінюють відповідь на терапію [37,40].

Одним із важливих механізмів взаємодії є метаболічна коадаптація між бактеріями та пухлинними клітинами. Деякі бактерії можуть стимулювати вироблення лактату або ж самі продукують його у значних кількостях, що, у свою чергу, підсилює ефект Варбурга — метаболічний зсув до аеробного гліколізу. Накопичення лактату асоціюється з прогресією пухлин, розвитком імуносупресивного середовища, стимуляцією ангиогенезу та метастатичним потенціалом [51–53].

Певні штами мікроорганізмів демонструють здатність до біотрансформації проліків у активні цитотоксичні метаболіти. Наприклад, експресія ферментів, таких як цитозиндезаміназа, забезпечує локальне перетворення 5-фторцитозину на 5-фторурацил, що пригнічує проліферацію злоякісно трансформованих клітин [54]. Інші бактеріальні метаболіти, як-от ентеролактон або гінзенозиди, мають антипухлинні властивості, впливаючи на сигнальні каскади, що регулюють апоптоз та клітинний цикл [55,56].

Крім впливу на метаболізм, мікробіота бере участь у регуляції експресії генів, пов'язаних із канцерогенезом. У доклінічних моделях показано, що певні пробіотичні штами знижують активність ферментів, які метаболізують канцерогени, а також індукують продукцію цитокінів, пов'язаних з протипухлинною відповіддю [57]. Здатність мікробіоти модифікувати реактивність пухлинних клітин до терапії, впливати на імунні шляхи та регулювати обмінні процеси визначає її як значущий компонент у формуванні клітинного фенотипу новоутворень.

Крім метаболічної взаємодії, важливим напрямом досліджень є вплив мікробіоти на імунну поведінку пухлинних клітин. Бактерії можуть впливати на диференціацію Т-клітин, зокрема сприяти утворенню Treg-клітин, які асоціюються з пригніченням протипухлинного імунітету. Це відбувається як за рахунок секреції імуносупресивних цитокінів, таких як IL-10, так і через індукцію експресії імуnoreгуляторних генів [58,59].

У доклінічних дослідженнях встановлено, що мікроорганізми можуть змінювати імунне середовище пухлини, підвищуючи або, навпаки, знижуючи ефективність імунотерапії. Наприклад, деякі пробіотичні комбінації здатні посилювати інфільтрацію CD8⁺ Т-клітин у пухлинну тканину, що корелює з кращою відповіддю на терапію блокаторами PD-L1 [60]. Натомість за умов домінування мікроорганізмів, які сприяють імуносупресії, відповідь на імунні чекпойнт-інгібітори може знижуватись [61].

Імуносупресивні Т-клітини, індуковані в кишечнику, можуть мігрувати в пухлинне мікрооточення за певних умов — наприклад, при порушенні експресії молекул утримання на кишковому ендотелії. Такий механізм може бути залучений у формування стійкості до імунотерапії у випадках пухлин поза кишечником [61]. Окрім того, встановлено, що деякі бактерії здатні стимулювати проліферацію пухлинних стовбурових клітин шляхом активації метаболізму жирних кислот або впливу на обмін лактату, що створює умови для резистентності до лікування [5,43,62]. Мікробіота є активним учасником у формуванні функціонального фенотипу пухлинних клітин. Її вплив охоплює широкий спектр біологічних процесів — від модифікації метаболізму глюкози до впливу на механізми імунної втечі та хіміорезистентності.

Попри наявність переконливих доклінічних доказів участі мікробіоти у регуляції біології пухлинних клітин, клінічні дані залишаються неоднозначними. Результати досліджень свідчать, що ефективність пробіотичного впливу значною мірою залежить від індивідуальних особливостей мікробіому, генетичного профілю пацієнта та типу терапії [63]. Так, у частини пацієнтів введення пробіотиків асоціюється з поліпшенням функції епітеліального бар'єру,

зменшенням хіміотерапевтичного дисбіозу та зниженням частоти інфекційних ускладнень [64,65]. Водночас інші дослідження не виявили істотного впливу на запальні маркери або імунну відповідь у пацієнтів, які отримували поєднану пробіотичну терапію під час онкологічного лікування [66].

Окрему увагу привертають повідомлення про можливий зв'язок між певними бактеріальними метаболітами та несприятливим прогнозом. Наприклад, підвищена концентрація продуцентів лактату в мікробіоті асоціюється з резистентністю до хіміотерапії у пацієток з епітеліальним раком яєчників [67]. Це може бути пов'язано з підсиленням ефекту Варбурга в пухлинних клітинах, що супроводжується активацією ангиогенезу, ЕМТ-переходу та пригніченням протипухлинного імунітету.

Отже, мікробіота має двобічний потенціал впливу — як терапевтичний, так і патогенетичний. Її участь у регуляції біології пухлинних клітин є складною, залежною від контексту і не зводиться до універсально сприятливого або несприятливого ефекту.

Таким чином, наукове осмислення ролі мікробіоти в онкології має спиратися на функціональні дослідження, які враховують специфіку пухлинного мікрооточення, метаболічний контекст та тип онкотерапії.

1.4. Сучасні підходи до метаболічного репрограмування злоякісно трансформованих клітин

Як вже було зазначено, одним із ключових метаболічних зрушень, характерних для злоякісно трансформованих клітин, є ефект Варбурга. Це явище супроводжується підвищеним споживанням глюкози та накопиченням лактату, що змінює кислотно-лужний баланс мікрооточення та сприяє прогресії пухлини, інвазії та імунній втечі клітин [68,69]. Показано, що активація гліколітичного метаболізму безпосередньо пов'язана з формуванням резистентності до хіміотерапевтичних агентів [70,71]. Зокрема, доведено, що гіперінсулінемія або підвищений інсуліновий вплив здатні посилювати гліколітичну активність

пухлинних клітин і, відповідно, підвищувати їхню резистентність до доксорубіцину при РМЗ [72].

У численних типах злоякісних новоутворень спостерігається зниження активності мітохондріального дихального ланцюга та компенсаційне посилення гліколізу, що супроводжується надекспресією переносників глюкози, зокрема GLUT1. Інгібування GLUT1 у поєднанні з хіміопрепаратами достовірно підвищує терапевтичну чутливість клітин, що свідчить про його роль як мішені для терапії [5,73]. Подібну ефективність демонструє інгібування гексокінази 2 — ферменту, що ініціює гліколіз шляхом фосфорилування глюкози. Молекула 2-дезоксі-D-глюкоза (2-DG), яка є конкурентним інгібітором глюкозного метаболізму, перебуває у фокусі експериментальної онкотерапії, особливо у схемах з комбінованим застосуванням хіміопрепаратів [74,75].

Попри наявний терапевтичний потенціал, інгібітори гліколізу мають суттєві обмеження. Побічні ефекти 2-DG включають гіпоглікемію, кардіотоксичність, порушення когнітивних функцій та нейропатії, що значно ускладнює їхнє клінічне застосування [76]. Крім того, тривале пригнічення гліколізу може спричинити вторинне метаболічне перепрограмування — активацію альтернативних шляхів, таких як β -окислення жирних кислот або утилізація глутаміну, що забезпечує виживання клітин навіть в умовах енергетичного дефіциту [77,78].

Ключовими ферментами гліколітичного шляху, що залучені до формування агресивного фенотипу злоякісно трансформованих клітин, є гексокіназа 2, фосфофруктокіназа-1 (PFK1) та піруваткіназа (PK), зокрема її ізоформа PKM2. Надекспресія цих ферментів посилює використання глюкози, що, в свою чергу, сприяє проліферації, інвазивності та ангіогенезу. Гексокіназа 2, наприклад, виявляється на мітохондріальній мембрані та бере участь у запобіганні апоптозу. Її інгібування не лише порушує метаболізм глюкози, але й сенсibiliзує клітини до дії протипухлинних агентів [79–81].

Фермент PFK1, що каталізує одне з найважливіших регуляторних перетворень гліколізу — фосфорилування фруктозо-6-фосфату, активується під впливом PFKFB3. Цей білок відповідає за продукцію фруктозо-2,6-бісфосфату,

потужного алостеричного активатора PFK1. Надекспресія PFKFB3 виявлена в широкому спектрі злоякісних пухлин і корелює з метастазуванням та поганим прогнозом. Інгібітори PFKFB3, зокрема PFK15, демонструють синергічну дію з традиційною хіміотерапією та мають потенціал для подолання лікарської стійкості [5,82].

Піруваткіназа ізоформи M2 (PKM2) відіграє важливу роль у забезпеченні метаболічної пластичності пухлинних клітин. PKM2 підтримує рівень пірувату, який може або вступати в цикл Кребса, або перетворюватися на лактат у присутності лактатдегідрогенази. Активність PKM2 зумовлює гнучке регулювання між проліферативними потребами клітини та потребами в енергії. Її інгібування знижує адаптацію до гіпоксії та підвищує чутливість до цисплатину [83,84].

Завершальний етап гліколізу — перетворення пірувату в лактат — каталізується лактатдегідрогеназою, переважно ізоформою А. Підвищена активність лактатдегідрогенази А призводить до накопичення лактату, який сприяє пригніченню протипухлинного імунітету та стимулює експресію ангіогенних факторів [85]. Інгібітори лактатдегідрогенази А, зокрема FX-11, блокують продукцію лактату, зменшують агресивність пухлин та потенціюють ефект хіміопрепаратів [86].

Попри те, що більшість пухлин характеризуються переважно гліколітичним метаболізмом, накопичено свідчення про здатність злоякісно трансформованих клітин до метаболічного переключення у напрямку окисного фосфорилювання (OXPHOS), особливо після дії хіміотерапевтичних засобів. Цей процес забезпечує клітинам виживання у несприятливих умовах, таких як дефіцит глюкози або інгібування гліколізу [87]. Активація OXPHOS дозволяє ефективніше продукувати АТФ, що підтримує енергетичний гомеостаз навіть в умовах терапевтичного стресу.

Фармакологічне таргетування компонентів мітохондріального дихального ланцюга розглядається як перспективна стратегія сенсibilізації пухлин до протипухлинного лікування. Наприклад, застосування метформіну — інгібітора комплексу I — показало здатність підвищувати чутливість пухлинних клітин до

цисплатину, а також знижувати проліферацію [88]. Однак чутливість до метформіну суттєво залежить від пухлинного мікрооточення [89]. Інші агенти, як-от ротенон, демонструють протилежні ефекти — пригнічення OXPHOS у деяких випадках знижує чутливість до терапії, підкреслюючи складність у виборі цільового втручання [90].

Крім гліколізу та OXPHOS, важливу роль у підтримці метаболічної гомеостазу відіграє пентозофосфатний шлях, що забезпечує клітини NADPH та рибозофосфатами для біосинтетичних процесів і захисту від окисного стресу. Активація пентозофосфатного шляху асоціюється з розвитком резистентності до радіо- та хіміотерапії, особливо в умовах мутації K-ras [91]. Застосування інгібіторів глюкозо-6-фосфатдегідрогенази — ключового ферменту пентозофосфатного шляху — знижує рівень NADPH, послаблює антиоксидантний захист пухлинних клітин та потенціює дію хіміопрепаратів [92–94].

Таким чином, репрограмування метаболізму глюкози є не лише ознакою злоякісної трансформації, але й універсальним адаптаційним механізмом, що забезпечує виживання пухлинних клітин, сприяє розвитку резистентності та впливає на ефективність лікування. Сучасні підходи до терапії раку дедалі частіше базуються на концепції метаболічної вразливості, що відкриває нові горизонти для створення комбінованих схем лікування з залученням метаболічних інгібіторів як сенситизаторів до хіміотерапії. Проте для широкого клінічного впровадження необхідні подальші дослідження щодо специфічності, безпеки та ефективності таких втручань.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для досягнення поставленої мети та виконання сформульованих завдань провели наступні дослідження:

1) на **першому етапі** з'ясували найбільш оптимальні умови співкультивування клітин РМЗ різних молекулярних підтипів і живих бактерій *B. animalis in vitro*. Для чого в динаміці аналізували ростові характеристики і життєздатність еукаріотичних і бактеріальних клітин в такий системі в залежності від вихідного співвідношення двох типів клітин. Також, оцінювали метаболічну активність бактеріальних клітин (споживання глюкози, продукція лактату) та зміни рН культурального середовища в присутності живих бактерій. При цьому враховували умови культивування клітин (склад і об'єм поживного середовища; температура, вологість, CO₂) і час інкубації.

Окрім того, визначали вплив *B. animalis* на життєздатність і проліферацію клітин РМЗ при різних способах співкультивування бактеріальних та пухлинних клітин:

- пряма контактна взаємодія еукаріотичних і бактеріальних клітин – клітини РМЗ співкультивували з живим або інактивованими теплом *B. animalis* в умовах, які забезпечували взаємодію клітин не лише через метаболіти але і за рахунок прямого контакту клітина-клітина;
- безконтактне співкультивування клітин РМЗ і живих *B. animalis* – спосіб, який забезпечує взаємодію еукаріотичних і бактеріальних клітин лише через секреторні метаболіти. У форматі 2D культури безконтактне співкультивування клітин здійснювали за допомогою мембранної системи інсерт, в 3D культурі пухлинні клітини культивували у матричному гелі в присутності живих *B. animalis* у поживному середовищі;

2) на **другому етапі** дослідження вивчали вплив живих *B. animalis* на метаболізм глюкози в клітинах РМЗ. Визначали комплекс показників гліколітичного шляху метаболізму глюкози, зокрема, швидкість споживання глюкози і продукції лактату, внутрішньоклітинну активність лактатдегідрогенази (ЛДГ) та глюкозо-6-

фосфатдегідрогенази (Г6ФД). З метою пошуку можливих механізмів впливу *B. animalis* на метаболічну активність клітин РМЗ дослідили зміни експресії рецепторів інсуліну, транспортера глюкози GLUT1, і транскрипційного фактора STAT6;

3) з метою підтвердження висновків щодо напрямку зміни метаболічної активності пухлинних клітин за умов їх співкультивування з *B. animalis* на **третьому етапі** дослідження модифіковані бактеріями клітини РМЗ обробляли інгібітором гліколізу – 2-дезоксиглюкозою (2-DG) або активатором цього метаболічного шляху в клітинах РМЗ – метформіном. Також, на цьому етапі роботи дослідили вплив *B. animalis* на чутливість клітин РМЗ до цитотоксичної дії паклітакселу.

4) на **четвертому етапі** роботи визначали вплив *B. animalis* на експресію маркера проліферації Ki-67 та білків-регуляторів апоптозу Вах, Bcl-2 і p21^{WAF1}, а також продукцію активних форм кисню в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів.

Поетапна схема проведення дослідження зображена на рис. 2.1.

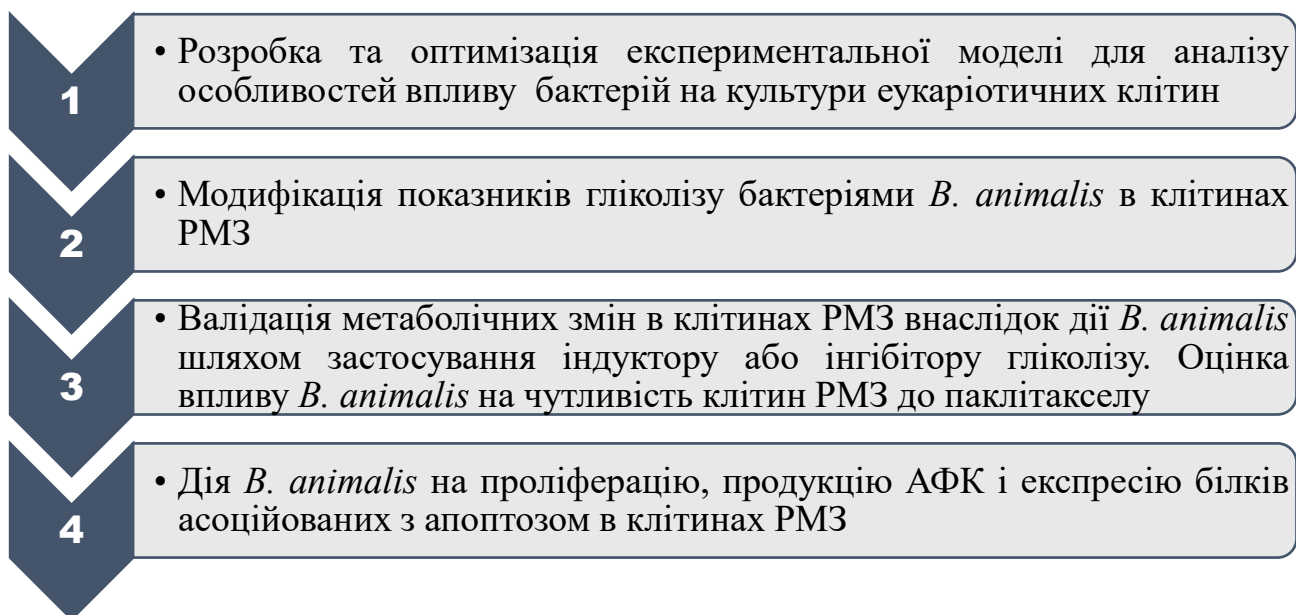


Рис. 2.1 Дизайн дослідження.

2.1. Матеріали

Клітинні лінії: Клітинні лінії РМЗ людини різних молекулярних підтипів: T47D – адгезивні клітини карциноми протоки молочної залози людини

люмінального підтипу; MCF-7 – адгезивні клітини аденокарциноми молочної залози людини люмінального підтипу; MDA-MB-231 – адгезивні клітини аденокарциноми молочної залози людини базального підтипу (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Характеристика клітинних ліній раку молочної залози людини [95–97]

Клітинна лінія	Експресія рецептора/ Молекулярний підтип	ER	PR	HER2	Тип пухлини (походження)	Морфологія
T47D	Люмінальний А	+	+	–	Інвазивна протокова карцинома	Епітеліальні
MCF-7	Люмінальний А	+	+	–	Інвазивна протокова карцинома	Епітеліальні
MDA-MB-231	Базальний В	–	–	–	Аденокарцинома	Мезенхімальні

Усі клітинні лінії були надані Банком клітинних ліній із тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України (постанова Кабінету Міністрів України №1709 від 19 грудня 2001 р., Свідоцтво реєстрації серія АН №41 від 19.02.2009 р).

Бактеріальні клітини: Бактеріальні клітини представників мікробіоти людини виду *Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12* виділяли з пробіотика виробництва Lek Pharmaceuticals, Любляна, Словенія.

Середовище: DMEM High Glucose (Biowest, Франція), RPMI 1640 (Biowest, Франція).

Сироватка: фетальна сироватка теляти (FBS) (Biowest, Франція).

Розчини: розчин Версену (Vetline agrosience, Україна), фосфатно-сольовий буфер PBS (Sigma, США), фізіологічний розчин (Лекхим, Україна), пеніцилін-стрептоміцин 100X (BioWest, Франція), RIPA Lysis Buffer (Strong)

(MedChemExpress, США); Trypsin – EDTA 1X в PBS (BioWest, Франція), Біфідум середовище (Фармактив, Україна).

Фарбники: кристалічний фіолетовий (Sigma, США), трипановий синій (Appllichem, Німеччина), МТТ (3-(4,5-диметилтіазол-2)-2,5-дифенілтетразоліум бромід) (Appllichem, Німеччина), 2',7'-дихлорфлуоресцеїн-діацетату (DCFH-DA) (Sigma, США), гематоксилін-еозин (Sigma, США), FITC-інсулін (Sigma, США), пропідій йодид (Sigma, США).

Антитіла: моноклональні антитіла проти Ki-67 (Thermo Fisher Scientific, США), p21^{WAF1} (Thermo Fisher Scientific, США), Bcl-2 (Thermo Fisher Scientific, США), Вах (Thermo Fisher Scientific, США), GLUT1 (Vitro S.A., Іспанія), STAT6 (Vitro S.A., Іспанія).

Прилади: Бокс біологічної безпеки другого класу БЛ2-900 (Kupertek Brevia, Україна), бокс біологічної безпеки другого класу Bio II Advance Plus (Syntegon Telstar, Іспанія), CO₂-інкубатор (Heal Force, Китай), HERAcell CO₂-інкубатор (Thermo Fisher Scientific, США), інвертований мікроскоп Axiovert 25 (Carl Zeiss, Німеччина), мікроскоп AxioStar Plus (Carl Zeiss, Німеччина), камера Горяєва (Волес, Україна), Olympus scanR High Content Screening Station (Carl Zeiss, Німеччина), міні-шейкер PSU-2T (BioSan, Латвія), мультилунковий спектрофотометр (BioTek Synergy HT SIAFRTD, США), центрифуга для мікропробірок типу Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, США), центрифуга лабораторна (Biosan LMC-3000, Латвія), високошвидкісна центрифуга з охолодженням (Sigma, США), термостат лабораторний TC20 (MICROmed, Україна), автоматичний біохімічний аналізатор GBG ChemWell 2900 (Awareness Technology, США), автоматичні піпетки об'ємом до 20 мкл (Eppendorf AG, Німеччина), 200 мкл 15 (Thermo Fisher Scientific Oy, Фінляндія) та 1000 мкл (Eppendorf AG, Німеччина), морозильна камера -20°C (Snaige, Литва), холодильник (Snaige, Литва), рН-метр PHS-3C (Kelilong Electron, Китай), цифрова камера (Canon PowerShot G5, Великобританія) міні-шейкер (Biosan, Латвія), проточний цитофлуориметр DxFlex (Beckman Coulter, США).

Інші матеріали: паклітаксел (Ebewe Pharma, Австрія), 2-дезоксиглюкоза (Sigma-Aldrich, США), метформін (Sigma-Aldrich, США), пластиковий посуд для культури клітин (SPL, Корея), 96- лункові, 24-лункові та 48-лункові планшети для культури клітин (SPL, Корея), чашки Петрі (SPL, Корея), метанол (Merck, Німеччина), параформальдегід (Sigma, США), Insert для 24-лункових планшетів (діаметр пор 0,1 мкм) з полікарбонатною мембраною (Insert Hanging, Китай), предметні скельця (Aptaca, Італія), покривні скельця (Eprexia, Netherlands), імерсійне масло (Carl Zeiss, Німеччина), ацетон (Хімпрезерв, Україна), Master Polymer Plus Detection System (Peroxidase) (Vitro S.A., Іспанія), Faramount Aqueous Mounting Medium (Thermo Scientific, США), спирт етиловий (Укрспирт, Україна, 050219), диметилсульфоксид (Applichem, Німеччина), пробірки стерильні (Falcon, США), мікропробірки (Ratiolab, Німеччина), набір для визначення глюкози «Glucose (Ox) Liquid» (MedTest Dx, Pointe Scientific, США), набір для визначення лактату «Lactate» (Greiner Diagnostic GmbH, Німеччина), набір для визначення лактатдегідрогенази «Lactate Dehydrogenase» (Pointe Scientific, США), набір для визначення глюкозо-6-фосфату «Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase» (MedTest Dx, Pointe Scientific, США), Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, США), Cultrex Basement Membrane Extract Type 2 PathClear (R&D Systems, США).

2.2. Методи

2.2.1. Методи культури клітин

Культивування клітинних ліній. Клітини культивували у повному поживному середовищі: DMEM з 4 ммоль/л L-глутаміну, 10% фетальної бичачої сироватки (FBS) та розчину пеніциліну-стрептоміцину 1X. Інкубацію проводили за температури 37°C у зволоженій атмосфері при 5% CO₂. Зміну поживного середовища проводили кожні 2-3 дні стандартним методом [98]. Клітини пасували при досягненні моношару із використанням розчину Версена та Trypsin – EDTA 1X в PBS. В експериментах використовували клітини, які знаходились в експоненційній фазі росту.

Способи співкультивування клітин РМЗ і біфідобактерій в системі in vitro.
Співкультивування клітин РМЗ з інактивованими теплом біфідобактеріями.
 Пухлинні клітини висаджували на лунки 96-лункового планшету у повному поживному середовищі DMEM (150 мкл) з 10% FBS без антибіотика в концентрації $0,7 \times 10^4$ клітин/лунку та інкубували при 37°C в зволоженій атмосфері з 5% CO₂, а через 10 годин у планшетах повністю змінювали поживне середовище і вносили інактивовані теплом біфідобактерії у співвідношенні еукаріотичні/бактеріальні клітини 1/300 – 1/12000. Клітини інкубували 48 годин при 37°C та 5% CO₂.

Безконтактне співкультивування клітин РМЗ і живих біфідобактерій в системі Insert. Клітини РМЗ висаджували на лунки 24-лункового планшету в поживному середовищі DMEM з 10% FBS в кількості 2×10^4 /лунку. Клітини культивували за стандартних умов 24 години. Через добу до відповідних лунок планшету вкладали Insert з діаметром пор в мембрані 0,1 мкм. Такий розмір пор забезпечував ефективну дифузію низькомолекулярних метаболітів, водночас унеможлиблюючи фізичний контакт між клітинами бактерій і РМЗ [99]. В Insert вносили по 0,5 мл DMEM з 10% FBS, яке містило живі бактеріальні клітини *Bifidobacterium animalis* у співвідношенні еукаріотичні/бактеріальні клітини 1/1000, 1/100, 1/25. Інкубували клітини в CO₂-інкубаторі ще протягом 48 годин.

Співкультивування сфероїдів РМЗ та живих бактеріальних клітин. Для отримання культур сфероїдів [100] у 48-лункові планшети висаджували клітини РМЗ в кількості 1×10^4 клітин/20 мкл матричного гелю Cultrex BME Type 2 PathClear на лунку. Після полімеризації гелю у лунку вносили 500 мкл поживного середовища DMEM + 10% FBS (без антибіотика) та інкубували при 37°C та 5% CO₂ протягом 5 діб до утворення сфероїдів (рис. 2.2).

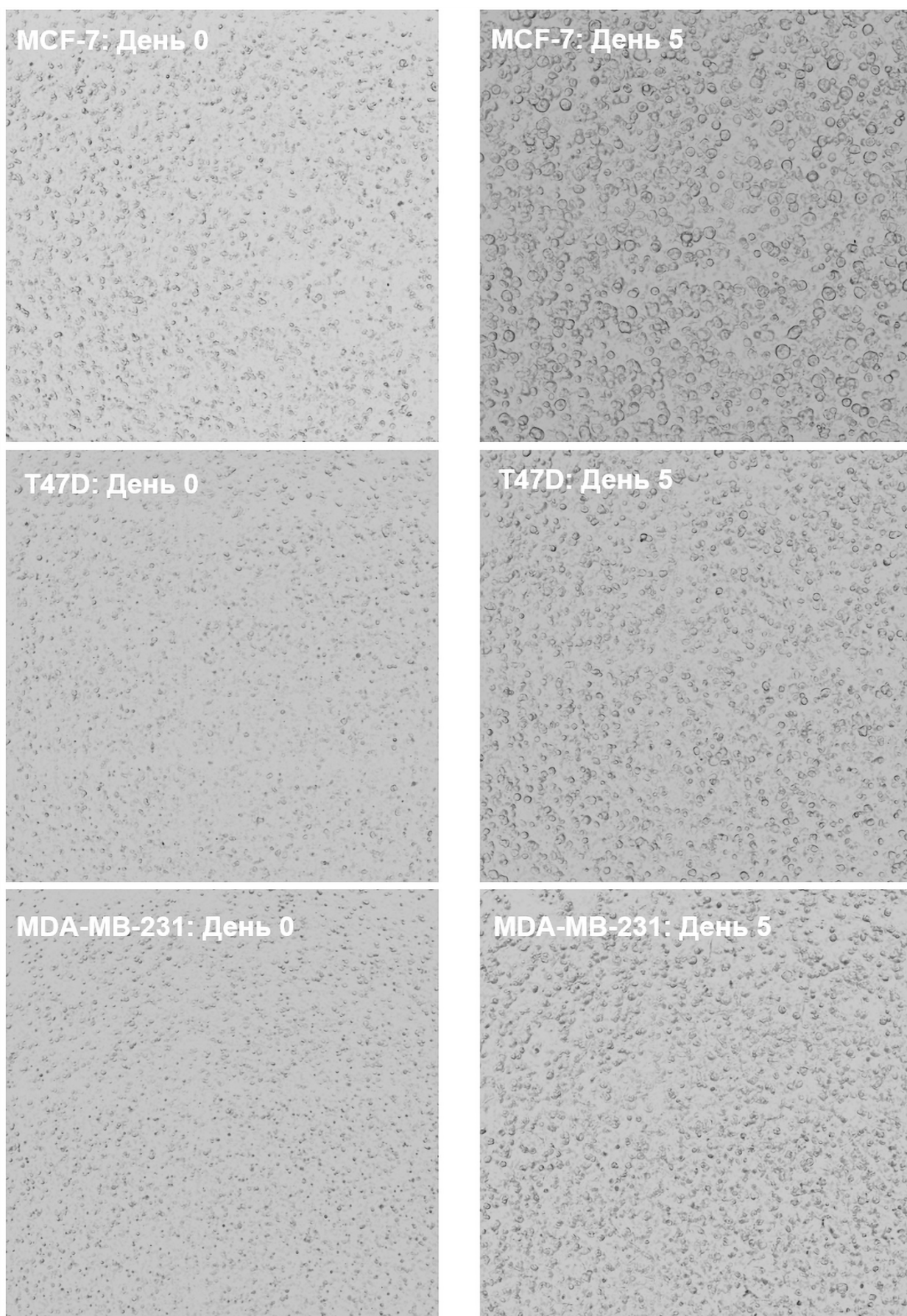


Рис. 2.2 Ріст сфероїдів клітин РМЗ протягом 5 діб.

Загалом було висаджено 5 планшетів – 0, 24, 48, 72 та 96 годин інкубації з бактеріями. Через 5 діб, сфероїди у планшеті «0 годин» трипсинізували та підраховували кількість клітин за допомогою камери Горяєва і трипанового синього. Після цього, у планшетах, що лишились, середовище з лунок обережно видаляли та замінювали на DMEM + 10% FBS (без антибіотику) із додаванням живих бактерій *Bifidobacterium animalis* у співвідношенні 1/1000, 1/100 та 1/25 еукаріотичні/бактеріальні клітини. Планшети культивували 24-96 годин за стандартних умов. Візуалізацію 3D-культур сфероїдів і оцінку їх ростових характеристик проводили за допомогою конфокальної мікроскопії з використанням Olympus scanR High Content Screening Station.

Конфокальна мікроскопія. Система Olympus ScanR забезпечує повністю автоматизовану роботу інвертованого мікроскопа для фіксації зображень великих площ, багатолункових планшетів та багатопозиційних зразків. Вона підтримує автоматичну зйомку живих клітин із контролем температури та CO₂, надстабільне освітлення для відтворюваного аналізу зображень із високим вмістом інформації, а також мікроскопію з повним внутрішнім відбиттям для отримання зображень із високим контрастом на поверхнях. З кожної лунки здійснювали серії знімків із різних фокусних площин (Z-стеки), що дозволяло отримати тривимірне представлення структури органоїдів вздовж осі Z. Z-стеки (Z-stacks) — це серії зображень, які отримуються на різних оптичних рівнях (вздовж осі Z) однієї і тієї ж ділянки зразка під мікроскопом. Це поняття походить від тривимірного уявлення зразка, де: X і Y — горизонтальні координати площини зображення (ширина і висота); Z — глибина або висота, тобто рівні фокусування на різній товщині зразка.

У випадку роботи з 3D-культурами (наприклад, органоїдами), які мають об'ємну структуру, звичайне плоске (2D) зображення не дозволяє адекватно оцінити клітинні або морфологічні особливості. Тому для повного охоплення всієї структури отримують Z-стек — серію «оптичних зрізів», які показують структуру на різній глибині.

Зображення отримували на множині полів зору, які покривали всю площу лунки. Для цього система виконувала автоматизоване сканування із заданням сітки

знімків. На кожному полі зору реєстрували серію Z-стеків, після чого обирали відповідну Z-проекцію (проекцію максимальної інтенсивності) для подальшого аналізу. Отримані зображення обробляли за допомогою програмного забезпечення ImageJ 1.49b 2014. Етапи аналізу зображень викладені на рис.2.3.

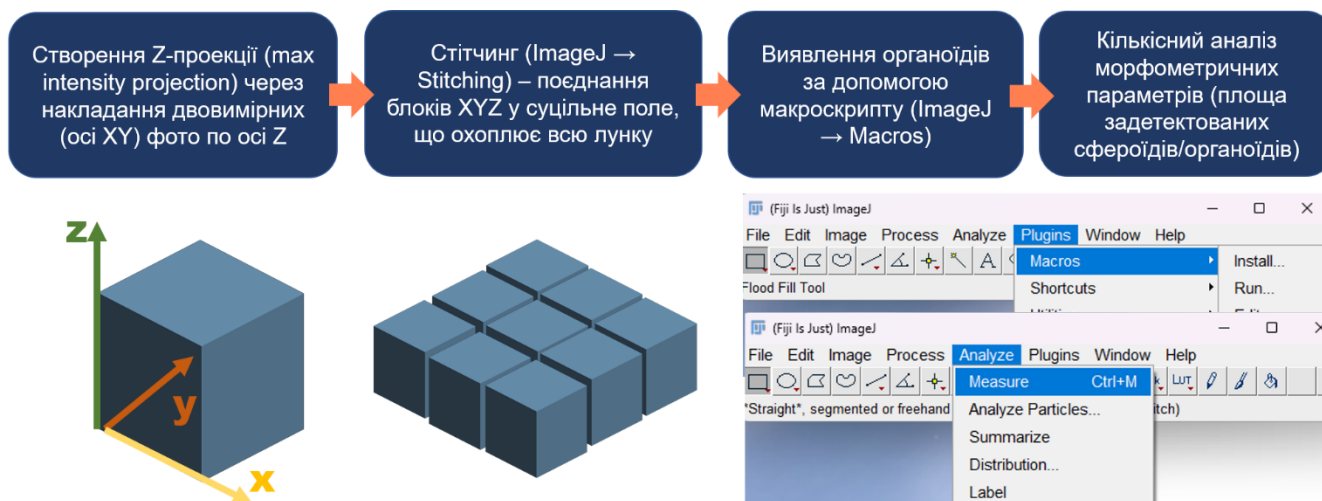


Рис. 2.3 Схема способу візуалізації 3D-культур сфероїдів і оцінки їх ростових характеристик методом конфокальної мікроскопії.

У результаті створювалися інтегровані візуальні та числові дані, що дозволяли проводити об'єктивну оцінку морфології та стану 3D-культур під впливом бактерій.

Співкультивування клітин РМЗ і живих біфідобактерій за умови їх прямої взаємодії. Для аналізу впливу живих *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 на клітини РМЗ, клітини висівали у пластиковий культуральний посуд у кількості, що відповідала вимогам конкретного експериментального етапу (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Умови співкультивування клітин РМЗ різних молекулярних підтипів з живими *Bifidobacterium animalis*

Тип посуду	К-сть висаджених клітин	Об'єм DMEM+ FBS	Початкове співвідношення клітин РМЗ/ <i>B. animalis</i>	Досліджувані показники
96-лунковий планшет	$0,7 \times 10^4$ - 1×10^4 /лунка	150 мкл/лунка	1/400, 1/100, 1/40, 1/25	Вплив <i>B. animalis</i> на життєздатність і дихальну активність клітин РМЗ; Вплив 2-DG/метформіну/паклітакселу на життєздатність і дихальну активність клітин РМЗ
6-лунковий планшет	$1,5 \times 10^5$ /лунка	5 мл/лунка	1/400, 1/100	Вплив <i>B. animalis</i> на показники гліколізу, продукцію АФК, рН середовища, рівень апоптозу, експресію рецептора інсуліну в клітинах РМЗ
Чашка Петрі з покривними скельцями (d=60 мм)	3×10^5	5 мл/чашка	1/400, 1/100	Вплив <i>B. animalis</i> на експресію білків асоційованих з гліколітичним шляхом метаболізму глюкози, проліферацією і регуляцією апоптозу в клітинах РМЗ
Флакон культуральний, 75 см ²	1×10^6	25 мл/флакон	1/400	Вплив 2-DG/метформіну/паклітакселу на життєздатність і біохімічні показники гліколізу в клітинах РМЗ після їх співкультивування з <i>B. animalis</i>

Клітини висаджували у поживному середовищі DMEM з 10% FBS без антибіотика. Клітини інкубували при 37°C в зволоженій атмосфері 5% CO₂ протягом 10 годин, після чого середовище повністю змінювали і вносили біфідобактерії у визначених в експерименті співвідношенні еукаріотичних та бактеріальних клітин (1/400, 1/100, 1/40, 1/25). Ці вихідні співвідношення двох типів клітин використовуються як маркер позначення кількості біфідобактерій впродовж всього дослідження не залежно від зміни даного співвідношення в динаміці розвитку популяції. Після внесення бактерій, клітини інкубували в термостаті при 37°C та 5% CO₂ 24, 48 та/або 72 години. В якості контролю еукаріотичних клітин використовували клітини РМЗ, які культивували за стандартних умов без бактерій. Для контролю росту бактеріальних клітин біфідобактерії культивували окремо від клітин РМЗ в стандартних умовах для культур еукаріотичних клітин.

Колориметричні методи визначення життєздатності еукаріотичних клітин. Вплив живих/інактивованих *Bifidobacterium animalis* на виживаність клітин РМЗ людини ліній MCF-7, T47D та MDA-MB-231 аналізували за допомогою колориметричних методів. В роботі використовували фарбування злоякісно трансформованих клітин кристалічним фіолетовим, трипановим синім або МТТ-тест.

Визначення життєздатності клітин в тесті з трипановим синім. Принцип методу заснований на здатності барвника проникати крізь пошкоджені клітинні мембрани. Живі клітини з інтактною мембраною не поглинають барвник, тоді як мертві клітини, в яких порушено мембранну цілісність, фарбуються в синій колір [101]. Клітини РМЗ після інкубації із бактеріями (умови співкультивування описані в табл.2.2) протягом 24-72 годин тричі промивали фосфатно-сольовим буфером для видалення залишків бактерій. Після цього клітини відокремлювали від субстрату розчином Версена із додаванням Trypsin – EDTA 1X і центрифугували при 1000 об/хв. Отриманий осад клітин розводили в 1 мл поживного середовища, далі 50 мкл клітинної суспензії переносили у мікропробірку типу епендорф, додавали аналогічний об'єм трипанового синього (розведення $\times 2$) та обережно

ресуспендовували. В камеру вносили по 10 мкл клітинної суспензії, підрахунок кожного зразку проводився стандартним методом [98,101] в чотирьох повторах за формулою:

$$A = \left(\frac{b}{80}\right) \times 10^6 \times c$$

де А – кількість клітин в 1 мл; b – кількість клітин у камері Горяєва в 5-ти квадратах по діагоналі; с – розведення.

Життєздатність клітин виражали у відсотках від загальної їх кількості в зразку і розраховували за формулою:

$$L = \left(\frac{d}{m}\right) \times 100$$

де L – життєздатність клітин, %; d – кількість живих клітин; m – загальна кількість клітин.

Визначення життєздатності клітин в тесті з кристалічним фіолетовим.

Принцип методу ґрунтується на здатності адгезивних клітин відокремлюватися від субстрату під час загибелі. При цьому життєздатні клітини зафарбовуються і фіксуються кристалічним фіолетовим, який зв'язується з ДНК і білками в клітині.

Після завершення інкубації клітин РМЗ з бактеріями (умови співкультивування описані в табл.2.2) протягом 24-72 годин культуральне середовище ретельно видаляли з лунок планшета шляхом аспірації. Для забезпечення максимальної чистоти та усунення залишкових бактеріальних компонентів, кожен лунку тричі промивали фосфатно-сольовим буфером. При цьому уникали прямого спрямування струменя рідини на клітинний моношар, щоб запобігти механічному ушкодженню адгезованих клітин. Після в кожен лунку додавали по 50 мкл розчину кристалічного фіолетового (5 мг/мл фарбника в 70%

метиловому спирті), який використовувався для фіксації та фарбування адгезованих до дна лунок клітин. Інкубацію з барвником проводили протягом 10 хвилин за кімнатної температури. Після завершення інкубації планшети ретельно промивали дистильованою водою, після чого їх висушували при кімнатній температурі до повного висихання [98,102].

Для елюції кристалічного фіолетового, зв'язаного з клітинами, у кожному лунку вносили по 100 мкл 95% етилового спирту. Планшет інкубували протягом 10 хвилин на платформі лабораторного міні-шейкера при 150 об/хв при кімнатній температурі. Абсорбцію барвника вимірювали спектрофотометрично за допомогою мікропланшетного рідера BioTek Synergy HT при довжині хвилі 540 нм.

Визначення дихальної активності клітин в МТТ-тесті. Принцип методу ґрунтується на здатності метаболічно активних клітин відновлювати тетразолієвий барвник МТТ (жовтого кольору) до нерозчинного кристалічного формагану фіолетового кольору. Цей процес відбувається за участі мітохондріальних дегідрогеназ і прямо залежить від інтенсивності клітинного дихання. Оскільки тільки живі клітини з активним енергетичним метаболізмом здатні каталізувати перетворення МТТ у тетраформаган, результати по МТТ-тесту дозволяють визначити життєздатність клітин за інтенсивністю їх дихання [103].

Після завершення інкубації клітин РМЗ з бактеріями (умови співкультивування описані в табл. 2.2) протягом 48 годин до кожної лунки 96-лункового планшету вносили по 10 мкл розчину тетразолієвої солі МТТ (5 мг/мл у фосфатно-сольовому буфері). Після внесення реагенту, планшет інкубували протягом 3 годин в CO₂-інкубаторі при температурі 37 °C. Впродовж цього часу в живих метаболічно активних клітинах відбувалося перетворення жовтого розчину МТТ на нерозчинний фіолетовий тетраформаган, який осаджувався у вигляді кристалів. По завершенні інкубації культуральне середовище ретельно видаляли з кожної лунки. Для розчинення утворених кристалів тетраформагану до кожної лунки додавали по 50 мкл диметилсульфоксиду. Оптичну щільність зразків визначали за допомогою мікропланшетного рідера BioTek Synergy HT при довжині хвилі 540 нм.

Розрахунок кількості живих клітин. В тестах з кристалічним фіолетовим або МТТ кількість життєздатних клітин визначали за допомогою стандартного аналітичного методу [104]. Результати виражали у відсотках, як кількість життєздатних клітин в експериментальній групі відносно контролю за формулою:

$$X = \frac{A540 (experiment)}{A540 (control)} \times 100\%$$

де X – кількість живих клітин в експериментальній групі; $A540 (experiment)$ — абсорбція при довжині хвилі 540 нм в лунці експерименту (клітини РМЗ з бактеріями); $A540 (control)$ — абсорбція при довжині хвилі 540 нм в контрольних лунках без бактерій (лише клітин РМЗ).

*Обробка клітин РМЗ 2-дезоксиглюкозою, метформіном або паклітакселом після їх співкультивування з *B. animalis*.* Схема даного етапу експерименту представлена на рис. 2.4.

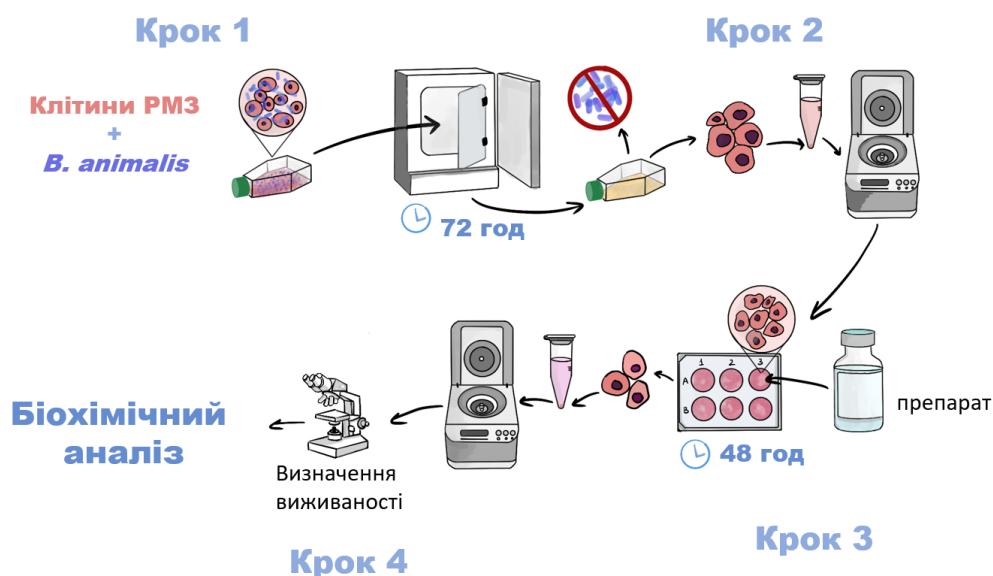


Рис. 2.4 Аналіз змін клітин РМЗ під дією 2-дезоксиглюкози, метформіну або паклітакселу після обробки *B. animalis*

Клітини РМЗ ліній MCF-7, MDA-MB-231 та T47D співкультивували з *B. animalis* (умови співкультивування описані в табл. 2.2) протягом 72 годин. Після інкубації, аліквоти поживного середовища (2 мл) відбирали для подальшого

визначення концентрації глюкози і лактату, клітини промивали PBS з пеніциліном-стрептоміцином, знімали з флаконів за стандартною методикою, підраховували в камері Горяєва з трипановим синім для визначення виживаності та використовували для подальших досліджень. При цьому також визначали швидкість поглинання глюкози, продукції лактату та зміну внутрішньоклітинної активності ферментів ЛДГ та Г6ФД біохімічними методами.

Оброблені *B. animalis* та відмиті від бактерій клітини РМЗ висаджували на лунки 96-лункового (визначення життєздатності клітин, розрахунок IC_{50}) або 6-лункового (оцінка показників гліколізу в клітинах РМЗ) планшетів. У 96-лунковий планшет клітини висаджували в кількості 1×10^4 клітин/лунку в повному поживному середовищі (150 мкл) із додаванням 1х пеніциліну-стрептоміцину та інкубували при 37°C з 5% CO_2 протягом 24 годин. Далі до клітин додавали 2-дезоксиглюкозу (0,08 – 50 ммоль) або метформін (0,78 – 100 ммоль) та інкубували за стандартних умов протягом 48 годин. Після завершення інкубації клітини фарбували кристалічним фіолетовим та МТТ за описаними вище методами. Індекс цитотоксичності (IC_{50}) визначали методом нелінійного регресійного аналізу за допомогою GraphGad Prism 8.0.1.

У 6-лункові планшети висівали клітини в кількості $1,5 \times 10^5$ /лунку в 5 мл повного поживного середовища з антибіотиком. Через 24 години до лунок додавали 2-дезоксиглюкозу (в концентрації 20 ммол для клітин Т47D, 5 ммоль для MCF-7, і 1 ммоль для MDA-MB-231), метформін (50 ммоль для клітин Т47D; 10 ммоль для клітин MCF-7 та MDA-MB-231) і паклітаксел в концентрації 0,5 мкг/мл. Після внесення препаратів клітини інкубували 48 годин. В експерименті були 4 групи: негативний контроль клітини РМЗ (інтактні клітини), позитивний контроль клітини РМЗ (клітини оброблені *B. animalis* і не оброблені препаратами), інтактні клітини оброблені препаратами, клітини модифіковані *B. animalis* і оброблені досліджуваними препаратами. Через 48 годин з клітин збирали аліквоти поживного середовища для подальшого визначення швидкості споживання глюкози і продукції лактату біохімічними методами. Клітини знімали з субстату 1х розчином трипсину в ФСБ, визначали їх життєздатність і кількість у тесті з трипановим синім

та лізували для подальшого аналізу активності ферментів ЛДГ та Г6ФД біохімічними методами.

2.2.2. Мікробіологічні методи

Підготовка бактеріальної суспензії. Ліофілізовану культуру *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 (Lek Pharmaceuticals, Словенія) промивали фізіологічним розчином та центрифугували при 400g протягом 15 хвилин. Після центрифугування надосад аспірували, а отриманий після центрифугування осад бактеріальних клітин розводили у поживному середовищі DMEM з 10% FBS без антибіотику.

Визначення концентрації біфідобактерій шляхом оцінки їх оптичної щільності при OD600. Кількість *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* визначали шляхом вимірювання оптичної густини бактеріальної суспензії в поживному середовищі згідно методики визначення концентрації сполук через їх оптичну щільність при довжині хвилі 600 нм [105,106]. В залежності від схеми експерименту бактеріальні клітини висаджували та інкубували на лунках 96 – лункового планшету або вносили для вимірювання оптичної густини у планшети такого типу. Оптичну щільність бактеріальної суспензії в середовищі DMEM з 10% FBS без антибіотику вимірювали за допомогою спектофотометра BioTek Synergy HT при довжині хвилі світла 600 нм. В якості негативного контролю використовували середовище DMEM з 10% FBS без антибіотику. Концентрацію бактеріальних клітин в середовищі визначали з використанням калібрувальної кривої, яка відображає залежність показників оптичної щільності бактеріальної суспензії від кількості колонієутворюючих одиниць (КУО) біфідобактерій.

Калібрувальну криву будували на основі показників оптичної щільності (при довжині хвилі 600 нм) серії розведень бактеріальної суспензії з відомою концентрацією КУО/мл. При цьому по осі ОХ відкладали концентрацію *Bifidobacterium animalis*, а по осі ОУ – рівень абсорбції при OD600.

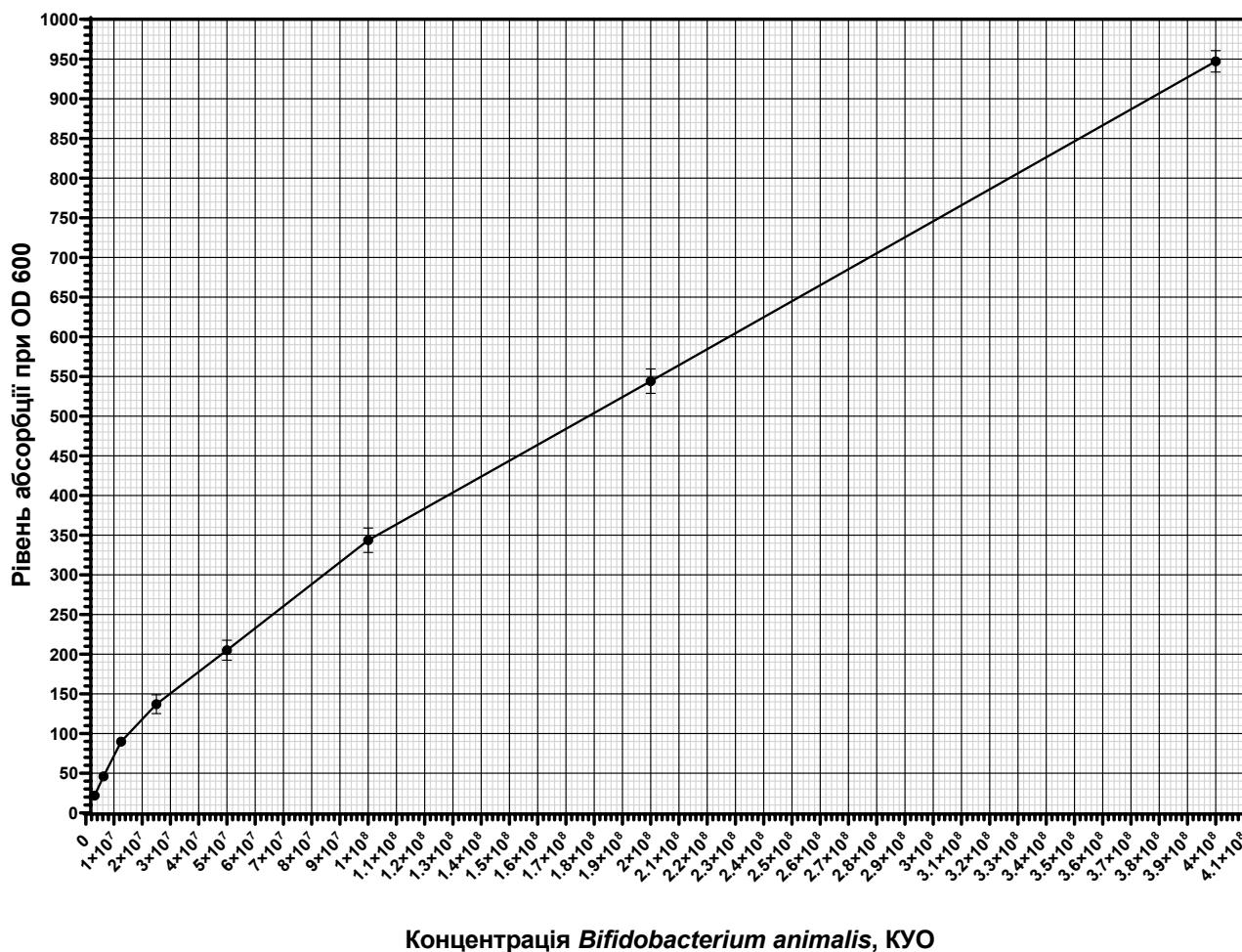


Рис. 2.5 Калібрувальна крива залежності концентрації бактеріальної суспензії *Bifidobacterium animalis* від її оптичної щільності при довжині хвилі 600 нм в поживному середовищі для культури клітин.

Оцінка кількості життєздатних біфідобактерій методом серійних десятикратних розведень. Кількість життєздатних клітин *B. animalis* визначали шляхом висіву їх 10-кратних розведень у фізіологічному розчині у пробірки з елективним середовищем для біфідобактерій Біфідум через 0, 6, 12, 24, 48 і 72 години з моменту висівання бактеріальних клітин в поживне середовище. Посіви інкубували 72 год при температурі 37°C, після чого підраховували кількість колоній у середовищі. Результати представляли як кількість колонієутворюючих одиниць в мл (КУО/мл).

Кінетика росту бактерій в поживному середовищі для культури клітин.
Кінетику росту бактерій аналізували за допомогою математичної моделі Вейбула [107]:

$$N(t) = N_{as} - (N_{as} - N_0) \times \exp(-(k \times t)^d)$$

де $N(t)$ — кількість клітин у момент часу t ; N_0 — початкова кількість клітин; N_{as} — гранична (асимптотична) кількість клітин (максимальна кількість клітин *B. animalis* за час спостереження); k — характеризує швидкість росту в експоненціальній фазі. Чим менша швидкість k тим нижча швидкість ділення; d — індикатор просторової неоднорідності. Характеризує вплив просторової неоднорідності в рості клітин на швидкість ділення в експоненційній фазі — чим менше d — тим нижча швидкість ділення; t — час, у годинах.

Параметри моделі визначали методом нелінійної регресії із найкращого наближення моделі до експериментальних даних.

Метод теплової інактивації бактерій. Ліофілізовані бактерії виду *Bifidobacterium animalis* вносили у середовище DMEM до кінцевої концентрації 1×10^6 КУО/мл. Бактеріальні клітини інкубували при 37°C в зволоженій атмосфері з 5% CO_2 . Через 24 години бактерії двічі відмивали фосфатно-сольовим буфером і розводили у фізіологічному розчині. Зразок бактеріальної суспензії відбирали для визначення кількості біфідобактерій мікробіологічним методом, як було описано вище. Решту бактеріальних клітин піддавали тепловій інактивації, прогрівачи суспензію біфідобактерій на водяній бані при 72°C протягом 30 хвилин [108]. Відсутність життєздатних бактерій після інактивації підтвердили шляхом висівання зразка інактивованих бактерій у селективне Біфідум середовище.

2.2.3. Біохімічні методи

Визначення швидкості споживання глюкози і продукції лактату клітинами.
Співкультивування клітин для аналізу впливу *B. animalis* на метаболізм глюкози клітинами РМЗ здійснювали відповідно до умов описаних в табл. 2.2. Через 24, 48

або 72 години після початку співкультивування еукаріотичних і бактеріальних клітин кондиційоване поживне середовище збирали у всіх експериментальних лунках, а також у відповідних контролях – клітин РМЗ і біфідобактерій, очищали від бактеріальних клітин шляхом центрифугування при 400g протягом 15 хвилин. Аліквоти відцентрифугованого поживного середовища відбирали і зберігали при -20°C не довше одного тижня для подальшого визначення концентрації глюкози і лактату. В якості негативного контролю поживного середовища використовували DMEM з 10% FBS без антибіотика, яке інкубували без клітин за стандартних умов.

Досліджувані показники визначали за допомогою автоматичного GBG ChemWell 2900. Калібрування прибору виконувалось за допомогою мультикалібратора та відносно стандартів перед кожним виміром відповідно до інструкцій виробника. Для визначення концентрації глюкози застосовували колориметричний ензиматичний метод з оксидазою глюкози, а для визначення концентрації лактату — ферментативний метод з використанням лактатоксидази. Визначення проводили за допомогою діагностичних наборів «Glucose (Ox) Liquid» та «Lactate» згідно з інструкціями виробника.

Показники енергетичного обміну клітин РМЗ – швидкість споживання глюкози (ШСГ) та продукції лактату (ШПЛ), визначали за допомогою формул [109]:

$$\text{ШСГ} = 2 \times \frac{(C_{gl}(t_i) - C_{gl}(t_{i+1})) \times V}{N(t_i) + N(t_{i+1})}$$

де t_i та t_{i+1} – два послідовні дні культивування; $C_{gl}(t_{i+1})$, $C_{gl}(t_i)$ – концентрація глюкози (gl) в ці дні; $N(t_i)$ та $N(t_{i+1})$ – це кількість клітин РМЗ, визначена у відповідні послідовні дні росту; V - об'єм інкубаційного середовища в одній лунці.

$$\text{ШПЛ} = 2 \times \frac{(C_L(t_{i+1}) - C_L(t_i)) \times V}{N(t_i) + N(t_{i+1})}$$

де t_i та t_{i+1} – два послідовні дні культивування; $C_L(t_i)$, $C_L(t_{i+1})$ – концентрація лактату (L) у вказані дні; $N(t_i)$ та $N(t_{i+1})$ – це кількість клітин РМЗ у досліджувані дні росту; V - об'єм інкубаційного середовища в одній лунці.

Загальну кількість спожитої глюкози клітинами РМЗ і біфідобактеріями в експерименті розраховували як різницю вихідного вмісту глюкози в поживному середовищі і вмісту цього моносахариду у певний момент часу після початку інкубації клітин із урахуванням вихідного об'єму середовища.

Вимірювання внутрішньоклітинної активності лактатдегідрогенази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. Для визначення активності ферментів гліколізу в клітинах РМЗ після інкубації з бактеріями (умови співкультивування описані в таблиці 2.2.1) протягом 24-72 годин, клітини знімали з субстрату 1х розчином трипсину в PBS, підраховували, промивали та лізували у 300 мкл RIPA-буферу [110] з додаванням коктейлю інгібіторів протеаз. Отриманий лізат центрифугували на високошвидкісній центрифугі з охолодженням при 13000 об/хв протягом 15 хв при 4°C, після чого відібрану надосадову рідину використовували для аналізу активності ферментів. Для вимірювання досліджених показників використовували кінетичний метод з L-лактатом набору «Lactate Dehydrogenase» і з глюкозо-6-фосфатом набору «Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase». Обидва аналізи проводили згідно інструкції виробника. Активність ферментів визначали з урахуванням кількості клітин у кожному зразку і виражали у Од/0,5x10⁶ клітин.

Аналіз рН поживного середовища. рН поживного середовища в експерименті визначали через 0, 6, 12, 24, 48 і 72 години після внесення *Bifidobacterium animalis* у співвідношенні 1/400, 1/100 і 1/40. рН зразків вимірювали з використанням рН-метру PHS-3C після калібрування за допомогою стандартних буферів на рН 4.0 та 7.0 відповідно до інструкції виробника.

2.2.4. Імуноцитохімічний аналіз

Покривні скельця з клітинами РМЗ після інкубації з бактеріями (умови співкультивування описані в табл. 2.2) протягом 48 годин фіксували за допомогою розчину метанолу і ацетону 1:1 протягом 2 годин при -20°C. Після фіксації, скельця

тричі промивали холодним фосфатно-сольовим буфером. Для проведення імуноцитохімічної реакції був використаний набір Master Polymer Plus Detection System (Peroxidase). Реакцію проводили згідно інструкції виробника. Первинні антитіла проти Ki-67, p21^{WAF1}, Bcl-2, Bax, GLUT1 та STAT6 наносили на скельця на 1 год. при кімнатній температурі. Після реакції, скельця дофарбовували розчином гематоксилін-еозину і фіксували в Faramount Aqueous Mounting Medium. Отримані препарати аналізували підраховуючи клітини з експресією (коричнєве забарвлення), враховуючи інтенсивність забарвлення, з використанням світлового мікроскопу AxioStar Plus при збільшенні x400, і фіксували за допомогою цифрової камери при збільшенні x1000. Аналізували не менше трьох випадкових полів зору. Оцінку експресії проводили за допомогою метода H-Score [111] за формулою:

$$S = 1 \times A + 2 \times B + 3 \times C$$

де S – показник «H-Score», значення якого знаходяться у межах від 0 (білок не експресується) до 300 (сильна експресія у 100% клітин); A – % «слабко» зафарбованих клітин; B – % «помірно» зафарбованих клітин; C – % «сильно» зафарбованих клітин.

2.2.5. Проточна цитометрія

Аналіз життєздатності клітин РМЗ. Клітини РМЗ після інкубації з живими бактеріями *B. animalis* (умови співкультивування описані в таблиці 2.2.1) протягом 48 годин промивали від бактерій, клітини відокремлювали від субстрату 1х розчином трипсину з PBS і отриману суспензію центрифугували при 1000 об/хв протягом 5 хвилин. Надосад зливали, а осаджені клітини промивали двічі PBS об'ємом по 5 мл. Після промивання клітини фарбували пропідій йодидом протягом 2 хвилин при кімнатній температурі і аналізували на проточному цитофлуориметрі DxFlex. Стратегія гейтування полягала у максимально широкому гейтуванні клітин з відсіканням тільки клітинного дебрису на дот плоті FSC-A/SSC-A та у виключенні

з аналізу дуплетів за допомогою дот плоту FSC-A/FSC-H. Для кожного зразка проводили аналіз не менше 10000 подій. Аналіз отриманих даних проводили за допомогою програми CytExpert для DxFlex.

Оцінка внутрішньоклітинного рівня активних форм кисню в клітинах РМЗ.

Клітини РМЗ після інкубації з живими бактеріями *B. animalis* (умови співкультивування описані в табл.2.2) протягом 48 годин промивали від бактерій, клітини відокремлювали від субстрату 1х розчином трипсину з PBS і отриману суспензію центрифугували при 1000 об/хв протягом 5 хвилин. Надосад зливали, а осаджені клітини промивали двічі PBS об'ємом по 5 мл. Після промивання $0,5 \times 10^6$ клітин суспендували у 0,5 мл 15 мкМ розчину 2',7'-дихлорфлуоресцеїн-діацетату (DCFH-DA) та інкубували 30 хвилин у середовищі RPMI 1640 з 5% CO₂ при температурі 37 °С. Після завершення інкубації клітини знову промивали PBS (1,5 мл), центрифугуючи при 1000 об/хв протягом 10 хвилин, після чого ресуспендували в 0,5 мл PBS для подальшого аналізу. Флуоресценцію клітин, забарвлених DCFH-DA, реєстрували в каналі FITC (фільтр 525/40 нм, діапазон пропускання). Значення посилення сигналу (gain) для каналу FITC було встановлено на рівні 2. Для кожної експериментальної умови дослідження виконували у трикратному повторі. Аналіз за допомогою проточної цитометрії здійснювався із застосуванням стандартної схеми гейтування, що включала:

- виключення клітинного дебрису за допомогою FSC-A/SSC-A дот-плоту;
- відсіювання мультиплетів за FSC-A/FSC-H;
- виокремлення популяції життєздатних (мінімально пошкоджених) клітин.

Для кількісного оцінювання флуоресценції використовували середнє значення інтенсивності сигналу (Mean FITC-A), отримане з гістограм флуоресцентного розподілу, побудованого в лінійній шкалі. Щоб скоригувати результати на рівень аутофлуоресценції, у кожній групі окремо визначали інтенсивність флуоресценції в клітинах, що не зазнавали дії бактерій. В подальшому ці значення віднімали від показників середньої інтенсивності відповідних дослідних зразків. У кожному зразку аналізували не менше ніж 25 000 подій. Виготовлені проби аналізували за допомогою проточного цитометра

DxFLEX. Первинну обробку та візуалізацію даних проводили з використанням програмного забезпечення CytExpert for DxFlex.

Оцінка експресії рецептора інсуліну в клітинах РМЗ. Експресію рецептора інсуліну на клітинах РМЗ після їх співкультивування з живими *B. animalis* (умови співкультивування описані в табл. 2.2) визначали через 24 та 48 годин інкубації. Далі клітини РМЗ знімали із субстрату 1х розчином трипсину у PBS, рахували і розводили у PBS. До $0,5 \times 10^6$ клітин додавали FITC-інсулін до кінцевої концентрації 3 мкг/мл та інкубували при 27°C протягом 1,5 год в темряві на платформі міні-шейкера при 200 об/хв. Після закінчення інкубації клітини фіксували 1% розчином параформальдегіду протягом 20 хв. Кількість FITC-інсулін мічених клітин та інтенсивність флуоресценції на клітині в експерименті визначали за допомогою методу проточної цитометрії. Аналіз проводили з використанням проточного цитофлуориметра DxFlex. Первинну обробку та візуалізацію даних проводили з використанням програмного забезпечення CytExpert for DxFlex.

2.2.6. Статистичний аналіз

Експерименти проводили тричі. Середнє значення досліджуваних показників (M), стандартне відхилення (SD) та t-критерій з поправкою Велча (Welch's t-test) розраховували через програмний пакет GraphGad Prism 8.0.1. Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МОДЕЛІ СПІВКУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ З *B. ANIMALIS* В СИСТЕМІ *IN VITRO*

Сучасні результати метаболомних та метагеномних досліджень свідчать, що процеси виникнення, розвитку або прогресії РМЗ людини тісно пов'язані з порушеннями нормального видового складу як мікробіоти тканин молочної залози, так і кишечника [46]. Тканини молочної залози та протоки колонізуються різноманітною спільнотою мікроорганізмів, що походять зі шкіри грудей, сосків, ареол молочної залози та ентеро-маммарних шляхів. Молочна залоза має свою власну мікробіоту, композиція якої є унікальною і відмінною від мікробіоти інших біотопів організму людини. При цьому, молочно-кислі анаеробні цукролітичні бактерії роду *Bifidobacterium* є важливим компонентом мікробіоти грудей, хоча є представниками переважно нормобіоти кишечника. Однак, сьогодні доведено, що непатогенні бактерії кишкового походження можуть транспортуватися в інші біотопи. Так, дендритні клітини можуть транспортувати кишкову мікробіоту до тканини молочної залози людини [112]. Окрім того, транслокація біфідобактерій з кишечника до молочної залози може відбуватись внаслідок підвищення проникності епітелію кишечника, що виникає в результаті фізіологічних і гормональних змін під час вагітності [113,114].

Відомо, що протипухлинні ефекти пробіотичних штамів біфідобактерій, зокрема і *Bifidobacterium animalis*, опосередковуються їх впливом на імунітет господаря, або продукцією метаболітів, зокрема, коротколанцюгових жирних кислот, які можуть спричиняти пригнічення проліферації злякано трансформованих клітин [115], індукувати в них продукцію цитокінів і апоптоз [7,116,117], а також можуть гальмувати ріст експериментальних пухлин *in vivo* [118].

Попри суттєвий прогрес у дослідженні взаємодії між мікробіотою людини та пухлинними клітинами на клітинному рівні, молекулярно-біологічні основи цих процесів залишаються недостатньо вивченими, що обумовлює необхідність їх

подальшого аналізу. Використання *in vitro* моделей, у яких клітини раку молочної залози (РМЗ) культивуються разом із бактеріальними штамами, є багатообіцяючим підходом для дослідження таких взаємодій, оскільки вони дають змогу вивчати різноманітні аспекти взаємовпливу мікроорганізмів і злоякісно трансформованих клітин у контрольованих лабораторних умовах [119]. Крім того, застосування сучасних експериментальних методів відкриває можливість створення таких варіантів *in vitro* моделей, які дозволяють розмежувати безпосередній та опосередкований впливи мікробіоти на еукаріотичні клітини.

У рамках побудови експериментальних клітинних моделей для дослідження взаємодії мікроорганізмів із клітинами людини *in vitro* широко застосовуються інактивовані термічно бактеріальні культури. Основною перевагою використання таких мікроорганізмів є стабільність їх кількісного складу протягом усього періоду експерименту, що забезпечує високий рівень відтворюваності та контрольованості умов дослідження. Такий підхід дозволяє уникнути неконтрольованого зростання бактерій, що є типовою проблемою при використанні живих бактеріальних клітин. Крім того, встановлено, що навіть після термічної інактивації бактеріальні клітини зберігають цілісність компонентів клітинної стінки, що дозволяє їм частково зберігати свою активність при взаємодії з клітинами організму людини [120].

Водночас, інформативність і цінність результатів отриманих за допомогою таких *in vitro* моделей, де в якості об'єктів дослідження використовують живі мікроорганізми не викликають жодних сумнівів: біологічні ефекти, спричинені життєздатними бактеріями набагато потужніші, ніж інактивованими теплом [14,121,122]. Різниця в ефекті свідчить про реалізацію взаємодії еукаріотичних і бактеріальних клітин за різними механізмами: фізичним (характерний для інактивованих теплом бактерій) та метаболічним (потребує присутності живих бактерій) [15]. Однак, моделювання *in vitro* взаємодії між живими еукаріотичними і прокаріотичними клітинами, зокрема між клітинами РМЗ людини та біфідобактеріями, є надзвичайно складним процесом, що включає створення багатокомпонентної системи і вимагає специфічної процедури перевірки її відтворюваності [123]. Додатковою перешкодою є те, що звичайні умови

культивування еукаріотичних клітин, зокрема стандартне поживне середовище та параметри інкубації, не є оптимальними для росту біфідобактерій, які мають потребу в специфічних поживних факторах [124].

Таким чином, метою цього розділу є визначення найбільш ефективного способу співкультивування клітин РМЗ з *B. animalis*, а також розробка, оптимізація та валідація такої нової експериментальної модельної *in vitro* системи. В експерименті було досліджено кінетику росту бактеріальних клітин на стандартному поживному середовищі для культури еукаріотичних клітин, а також ростові характеристики *B. animalis* в присутності клітин РМЗ. Окрім того, визначали життєздатність клітин РМЗ після їх співкультивування з *B. animalis* при їх прямій або безконтактній взаємодії. Також, з метою визначення умов співкультивування еукаріотичних і бактеріальних клітин, контроль яких забезпечує інформативність та відтворюваність цієї експериментальної моделі, аналізували кількість спожитої глюкози і синтезованого лактату бактеріальними клітинами, а також провели моніторинг змін рівня кислотності (pH) поживного середовища.

3.1. Ростові і метаболічні характеристики *B. animalis* у повному поживному середовищі для культури еукаріотичних клітин

На цьому етапі було перевірено здатність бактерій виду *B. animalis* рости на поживному середовищі DMEM з додаванням 10% FBS та досліджено кінетику їх росту в таких умовах. Використовували різні вихідні концентрації посівного матеріалу бактерій, зокрема: $(28 \pm 1.7) \times 10^5$ КУО/мл, $(6,5 \pm 0.9) \times 10^5$ КУО/мл та $(2,5 \pm 0.3) \times 10^5$ КУО/мл, які в подальших дослідженнях будуть відповідати співвідношенням 1/400, 1/100 та 1/40 еукаріотичних клітин РМЗ до бактеріальних клітин. Аналіз кінетики росту *B. animalis* показав, що бактерії розвиваються за класичним для свого виду типом життєвого циклу. Зокрема, було встановлено, що тривалість адаптаційної (lag) фази знаходиться в прямій залежності від щільності вихідного посіву: чим вищою була початкова концентрація клітин *B. animalis*, тим коротшою виявлялась тривалість цієї фази. Так, при максимальному інокуляті —

$(28 \pm 1.7) \times 10^5$ КУО/мл — lag-фаза становила приблизно 2 години, тоді як при нижчих початкових концентраціях — $(6,5 \pm 0.9) \times 10^5$ КУО/мл і $(2,5 \pm 0.3) \times 10^5$ КУО/мл — вона тривала відповідно близько 4 і 6 годин (рис.3.1).

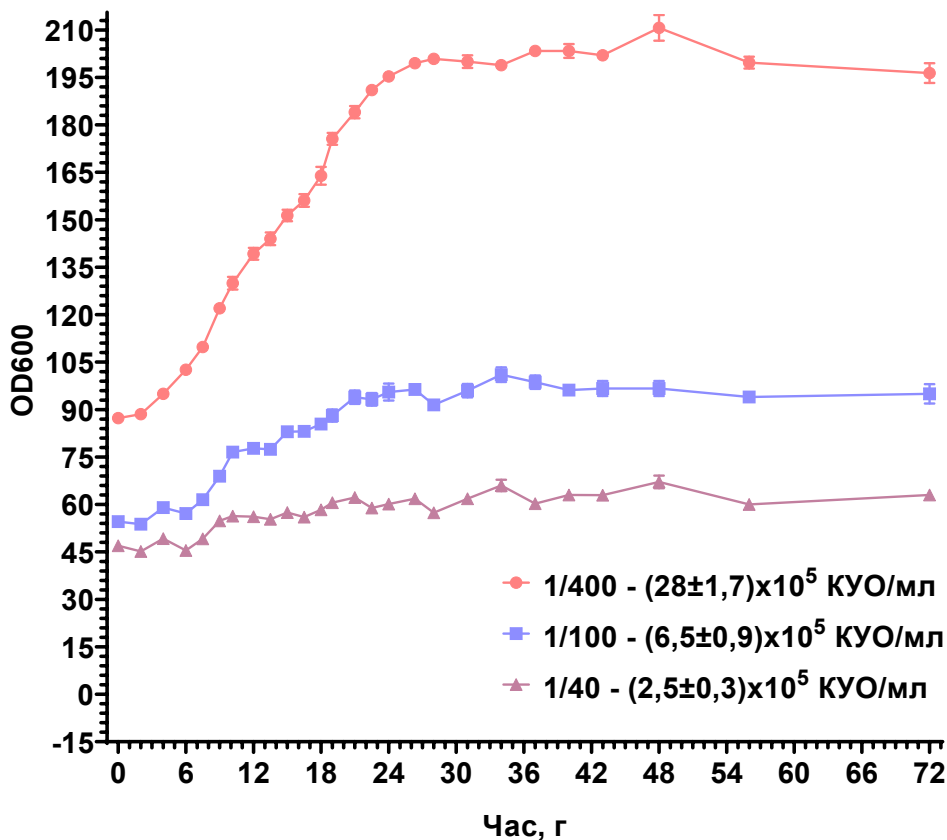


Рис. 3.1 Кінетика росту *B. animalis* у повному поживному середовищі DMEM протягом 72 годин за різних вихідних посівних концентрацій. 1/400 – $(28 \pm 1.7) \times 10^5$ КУО/мл, 1/100 – $(6,5 \pm 0,9) \times 10^5$ КУО/мл, 1/40 – $(2,5 \pm 0,3) \times 10^5$ КУО/мл.

Фаза експоненційного або прискореного росту (log-фаза), навпаки, демонструвала меншу варіативність щодо тривалості та менш залежала від початкової концентрації посівного матеріалу. Усі експериментальні групи, незалежно від стартового інокуляту, досягали стаціонарної фази розвитку популяції на 24-й годині культивування.

У ході проведених досліджень встановлено наявність прямої залежності між початковою концентрацією інокуляту біфідобактерій та кінцевими показниками їх кількісного розвитку протягом культивування (рис. 3.1). Згідно з отриманими результатами, чисельність життєздатних клітин *B. animalis* через 24 години після інокуляції становила: $(100,0) \times 10^5$ КУО/мл при максимальному рівні вихідного

інокуляту (умовне співвідношення 1/400), $(55,0 \pm 2,7) \times 10^5$ КУО/мл — при середньому рівні (1/100), та $(7,8 \pm 0,6) \times 10^5$ КУО/мл — при найнижчому (1/40). Це свідчить про суттєвий вплив кількості внесеного посівного матеріалу на кінцеву чисельність популяції. На 72-й годині культивування спостерігалось зниження життєздатності клітин на 10–15% порівняно з максимальними показниками, отриманими на 24-й годині.

Параметри виживаності та метаболічної активності *B. animalis* у середовищі DMEM протягом 72 годин культивування визначали, зокрема, шляхом кількісного аналізу рівня споживання глюкози та продукції лактату — одного із основних метаболітів їх ферментативної активності.

Згідно з експериментальними даними (рис. 3.2 А) найвища інтенсивність засвоєння глюкози реєструвалася в інтервалі між 6-ю та 24-ю годинами інкубації. У подальшому, в період з 24-ї до 72-ї години, спостерігалось зниження інтенсивності енергетичного обміну про що свідчить зменшення показників споживання глюкози і продукції лактату бактеріальними клітинами.

Зміна концентрації лактату, що утворюється *B. animalis* протягом 72 годин культивування (рис. 3.2 Б). Отримані результати свідчать про поступове зростання рівня лактату в період між 6-ю та 48-ю годинами інкубації у поживному середовищі.

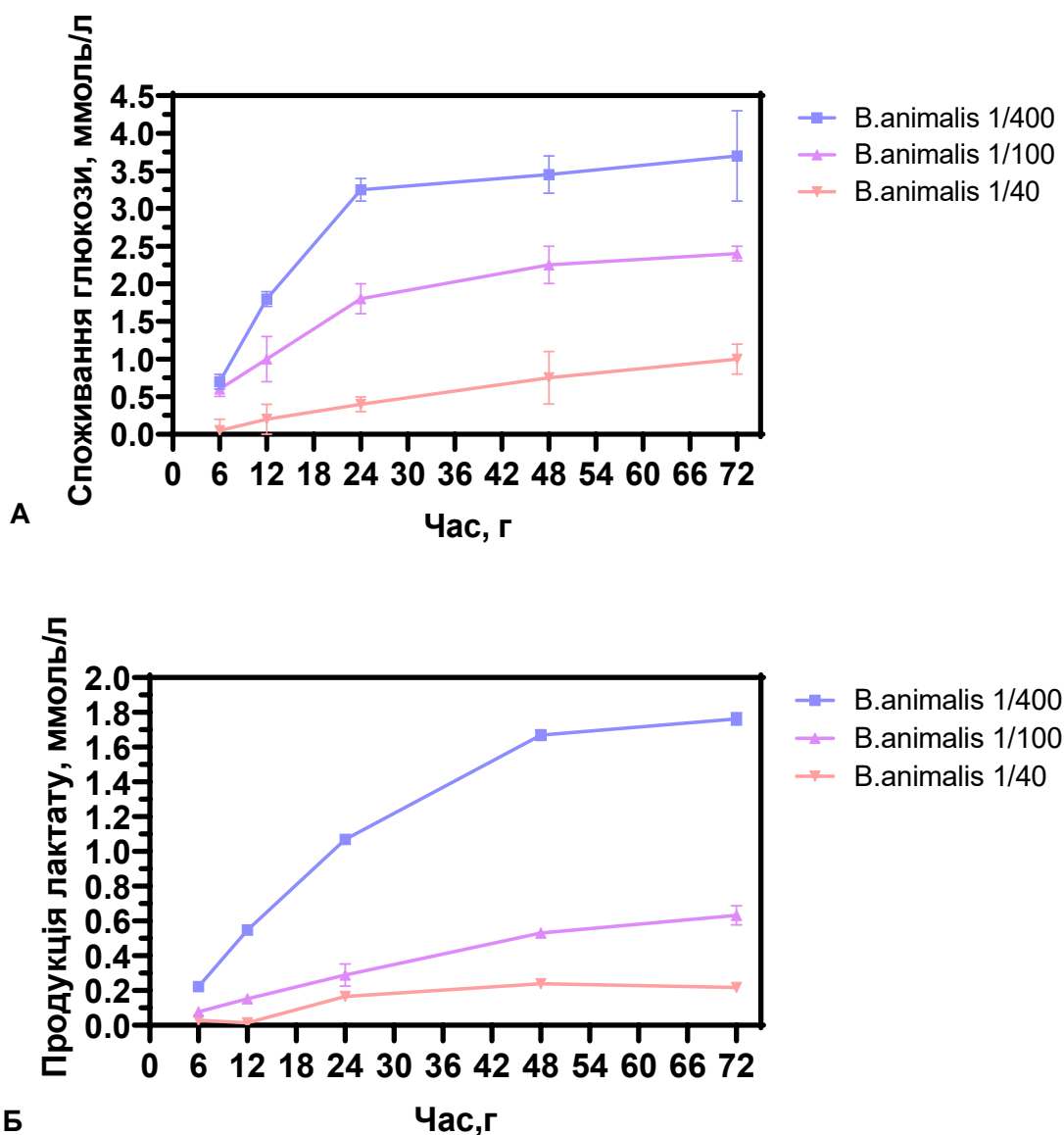


Рис. 3.2 Споживання глюкози (А) і продукція лактату (Б) *B. animalis* у середовищі DMEM.

Аналіз змін рН поживного середовища DMEM в експерименті протягом 72 годин інкубації *B. animalis* встановив, що значення рівня кислотності культурального середовища при початковому співвідношенні еукаріотичних/бактеріальних клітин 1/400 змінювалися статистично достовірно у дозозалежний спосіб. Зокрема, спостерігалось зниження рН із початкового рівня 7,6 до 7,36 на 48-й годині інкубації та до 7,33 на 72-й годині спостереження (рис. 3.3)

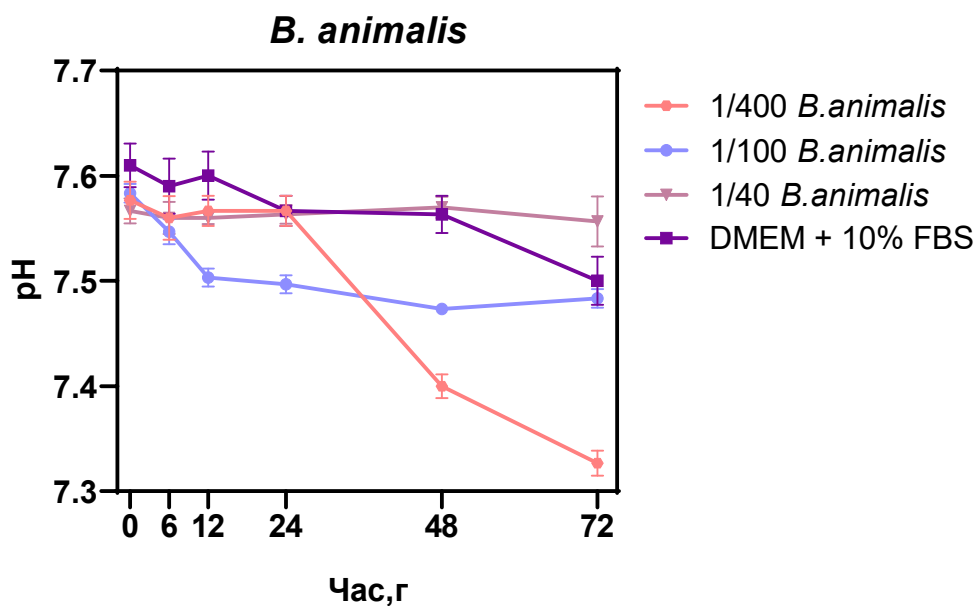


Рис. 3.3 Зміни pH середовища DMEM при культивуванні *B. animalis*.

У той же час, в експериментальних групах з іншими співвідношеннями клітин — 1/100 та 1/40 — статистично значущих змін pH, порівняно з контрольними зразками середовища, виявлено не було.

Отримані результати підтвердили, що *B. animalis* здатні рости у поживному середовищі та умовах інкубації придатних для культур еукаріотичних клітин. При цьому в кондиційованому поживному середовищі не відбувалось виснаження глюкози, а концентрація лактату і показник pH не досягали значень критичних для культур еукаріотичних пухлинних клітин протягом усього експерименту. Такі дані свідчать, що зміни біологічних властивостей злоякісно трансформованих клітин, які можуть бути виявлені, зумовлені саме впливом бактеріальних агентів, а не варіаціями умов їх співкультивування.

3.2. Порівняльний аналіз життєздатності клітин РМЗ різних молекулярних підтипів за умов їх прямого і безконтактного співкультивування з живими та інактивованими теплом *B. animalis*

Для виконання поставлених завдань і досягнення мети дослідження на наступному етапі роботи необхідно було визначити найбільш ефективний спосіб співкультивування клітин РМЗ і *B. animalis*. З метою оцінки впливу *B. animalis* на пухлинні клітини за певними контакт-залежними та контакт-незалежними механізмами клітини РМЗ різних молекулярних підтипів ліній Т47D, МСF-7 і MDA-MB-231 культивували в присутності інактивованих теплом або живих бактеріальних клітин або їх метаболітів (системи безконтактного співкультивування клітин – через мембрану Insert або 3D культури). В експерименті визначали вплив *B. animalis* на життєздатність клітин РМЗ.

Вплив термічно інактивованих клітин *B. animalis* на лінію РМЗ МСF-7 супроводжувався статистично достовірним зменшенням кількості життєздатних клітин на 25–75% при співвідношеннях РМЗ/*B. animalis* у діапазоні 1/3000–1/12000 ($p < 0,05$) (рис. 3.4).

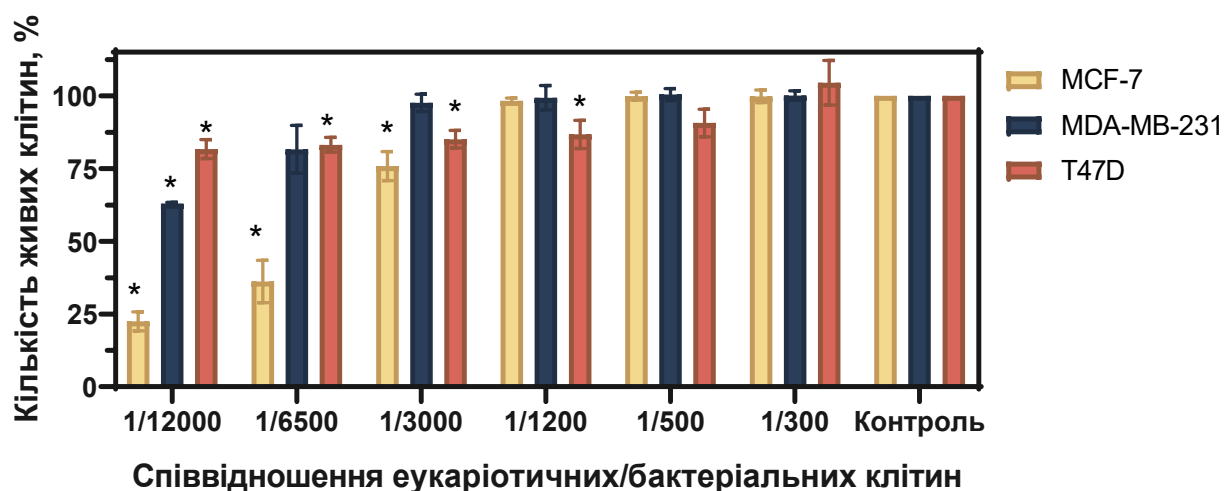


Рис. 3.4 Вплив термічно інактивованих клітин *B. animalis* на життєздатність клітин РМЗ людини *in vitro*. Значення для контрольної групи (інтактні клітини) позначені на графіку сірою лінією, що відповідає рівню 100%. * $p < 0,05$ — статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами.

Обробка клітин лінії T47D інактивованими теплом біфідобактеріями також призводила до значущого зниження чисельності життєздатних клітин РМЗ — на 10–20% при співвідношеннях 1/1200–1/12000 ($p < 0,05$). Найменшу чутливість до антипроліферативного впливу термічно інактивованих *B. animalis* продемонстрували клітини лінії MDA-MB-231: статистично достовірне зменшення їх життєздатності спостерігалось лише за умови експозиції з бактеріями при співвідношенні РМЗ/*B. animalis* 1/12000 ($p < 0,05$) (рис. 3.4).

За умов прямої безпосередньої взаємодії клітин РМЗ лінії T47D з *B. animalis* у співвідношенні еукаріотичні/бактеріальні клітини 1/1000 і 1/100 виявили статистично достовірне зменшення кількості живих злоякісно трансформованих клітин на 97,5% і на 12%, відповідно, в порівнянні з контролем. Найбільш чутливими до антипроліферативного впливу досліджуваних бактерій були клітини лінії MCF-7. Експозиція MCF-7 з *B. animalis* у співвідношенні 1/1000 призводила до статистично значущого зменшення кількості живих клітин на 98,5%, у співвідношенні 1/100 - на 28%, а у співвідношенні 1/25 на 13%, в порівнянні з контролем. В клітинах РМЗ базального підтипу лінії MDA-MB-231 співкультивування з *B. animalis* у співвідношенні 1/1000 і 1/100 супроводжувалось статистично достовірним зниженням кількості живих клітин на 42-44% і 18%, відповідно, в порівнянні з контролем (рис. 3.5).

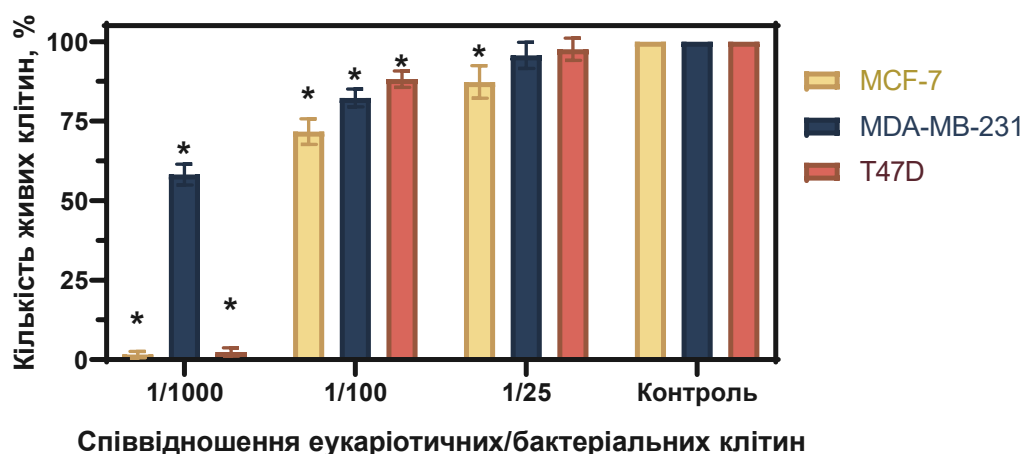


Рис. 3.5 Життєздатність клітин РМЗ людини різних молекулярних підтипів після їх співкультивування з живими бактеріями *B. animalis*.

Для дослідження впливу метаболітів живих пробіотичних мікроорганізмів на життєздатність клітин РМЗ використовували моделі їх безконтактного співкультивування. Зокрема, досліджувані об'єкти безконтактно співкультивували в системі Insert (клітини РМЗ висівали в лунки планшета, а клітини бактерій – на мембрану Insert). Така система дозволяє ізолювати бактеріальні клітини від еукаріотичних, забезпечуючи їх взаємодію лише через обмін розчинними факторами, які дифундують крізь мембрану з порами діаметром 0,1 мкм. Отримані результати представлені на рис. 3.6.

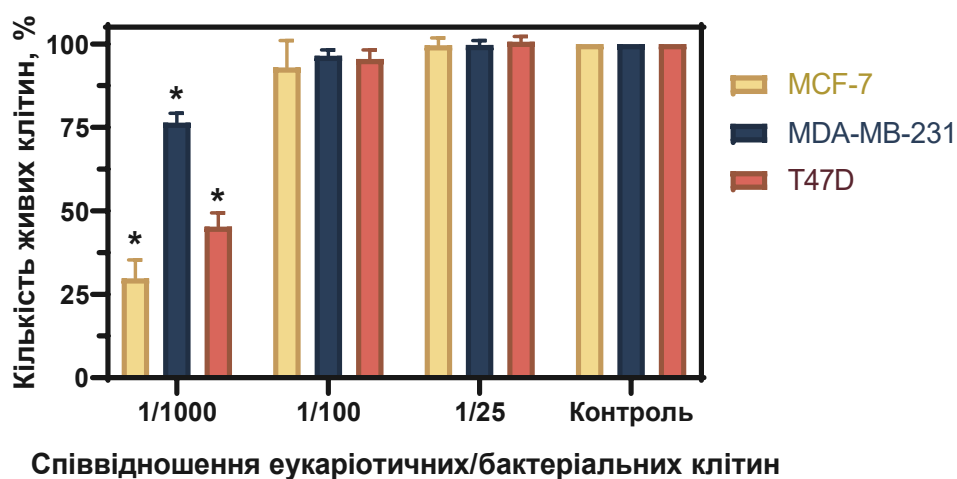


Рис. 3.6 Життєздатність клітин РМЗ після їх безконтактного співкультивування з *B. animalis* в системі Insert. * $p < 0,05$ — статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами.

Встановлено, що при безконтактному співкультивуванні клітин лінії MCF-7 з *B. animalis* у співвідношенні еукаріотичних/бактеріальних клітин 1/1000 в системі Insert спостерігали статистично значуще зменшення кількості живих клітин на 70% у порівнянні з контролем. Аналогічну тенденцію виявляли і для клітин лінії T47D, де зменшення кількості живих клітин становило 55% за аналогічних умов експерименту. Разом з тим, клітини MDA-MB-231 виявилися найменш чутливими до впливу бактеріальних метаболітів: при співвідношенні клітин РМЗ/*B. animalis* 1/1000 спостерігали статистично достовірне зниження проліферації клітин на 24%

відносно інтактних клітин. При цьому експозиція клітин РМЗ з біфідобактеріями у менших співвідношеннях не впливала на життєздатність пухлинних клітин.

Ще один спосіб безконтактного співкультивування клітин РМЗ з *B. animalis* – 3D культура клітин РМЗ у матричному гелі з додаванням живих бактеріальних клітин у рідку фазу поживного середовища. При такій моделі співкультивування полімеризований матриксний гель виконує роль проникного бар'єру між двома типами клітин.

Для оцінки впливу *B. animalis* на клітини РМЗ у сфероїдах, які були сформовані протягом 5 діб, була використана конфокальна мікроскопія з подальшою цифровою обробкою зображень та макросами для аналізу зміни розміру сфероїдів.

Використання 3D-культури сфероїдів клітин РМЗ для аналізу дії живих біфідобактерій на їх ріст показало, що найбільш значимий результат був наявний на 24 години співкультивування при співвідношенні еукаріотичних/бактеріальних клітин 1/1000. Зокрема, для клітин лінії MCF-7 – затримка росту сфероїдів становила 9% у порівнянні з контролем ($p < 0,05$) (рис. 3.7).

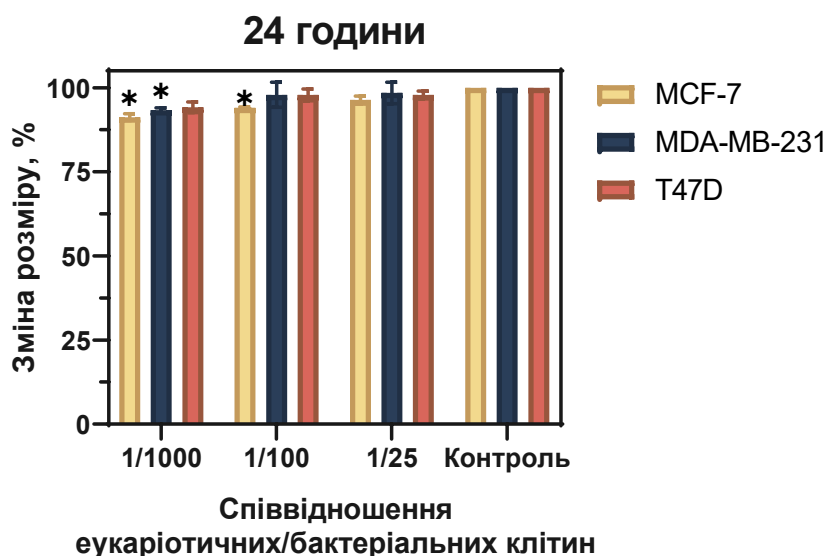


Рис. 3.7 Зміни розміру сфероїдів клітин РМЗ на 24 години експозиції з *B. animalis*. * $p < 0,05$ — статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами.

Для клітин лінії MDA-MB-231 пригнічення росту складало 7% ($p < 0,05$), тоді як для лінії T47D – 6% у порівнянні з контролем. При співвідношенні еукаріотичних/бактеріальних клітин 1/100 статистично значуще пригнічення росту культури – на 6 % - спостерігалось лише для клітин лінії MCF-7 (рис. 3.7).

Експозиція сфероїдів клітин PM3 з *B. animalis* протягом 48 годин призводила до статистично достовірного пригнічення їх росту лише при співвідношенні 1/1000 для клітин ліній MDA-MB-231 (на 4 %) та T47D (на 6 %) в порівнянні з контролем (рис. 3.8).

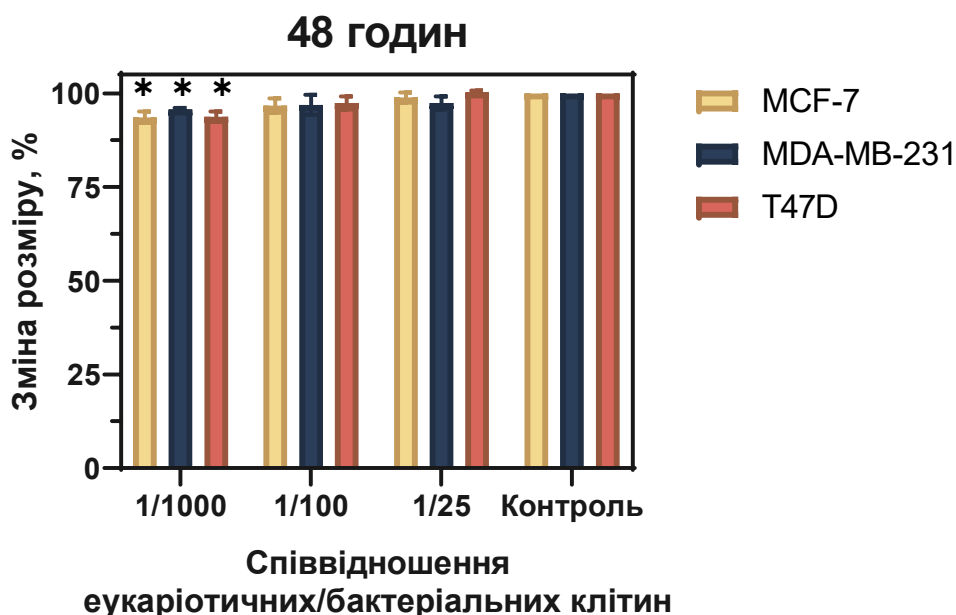


Рис. 3.8 Зміни розміру сфероїдів PM3 на 48 годину експозиції з *B. animalis*.

* $p < 0,05$ — статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами.

Через 72 і 96 годин інкубації 3D культури клітин PM3 з *B. animalis* спостерігали менший розмір сфероїдів лише в культурі клітин T47D при співвідношенні клітин 1/1000 - на 6 % через 72 години (рис. 3.9 А), та на 8 % через 96 годин (рис. 3.9 Б) інкубації з бактеріями.

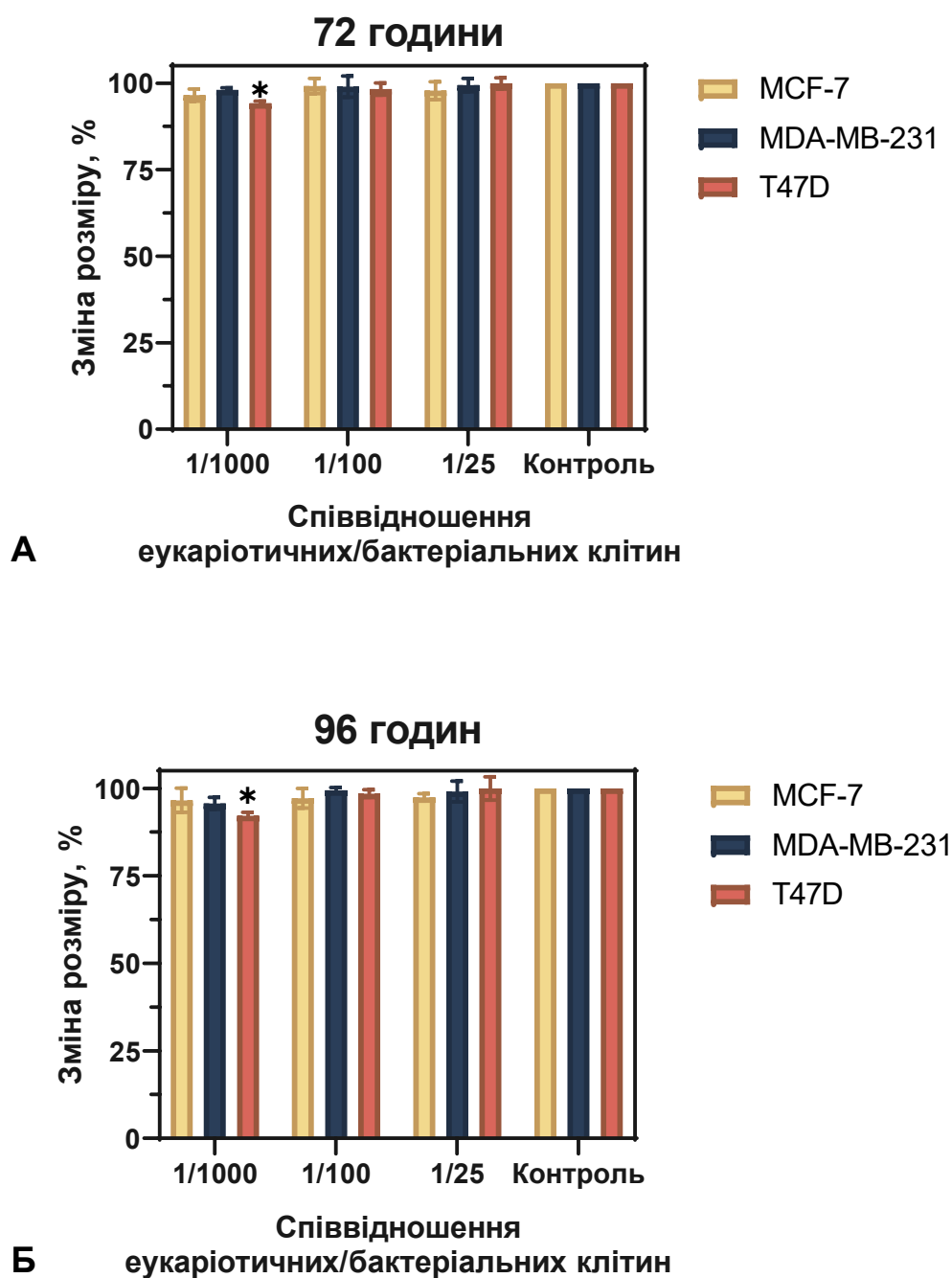


Рис. 3.9 Зміни розміру сфероїдів РМЗ через 72 години (а) та 96 годин (Б) експозиції з *B. animalis*. * $p < 0,05$ — статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами.

Відсутність значного впливу *B. animalis* на розмір сфероїдів РМЗ в цій системі, відогідно, обумовлена низькою проникністю бактеріальних секреторних метаболітів крізь матриксний гель. Отже, безконтактна модель співкультивування

3D-культур сфероїдів клітин РМЗ з *B. animalis* є цікавою, але малоперспективною для подальшого використання в наших дослідженнях.

Отримані результати свідчать, що найбільш виражений вплив *B. animalis* на життєздатність клітин РМЗ в системі *in vitro* спричиняють за умов безпосереднього контакту злоякісно трансформованих клітин з живими біфідобактеріями.

3.3. Кінетика росту *B. animalis* за умов їх співкультивування з клітинами РМЗ людини різних молекулярних підтипів

Порівняльний аналіз кінетики росту *B. animalis* за умови їх сумісного культивування з різними лініями клітин РМЗ, показав, що при співвідношенні клітини РМЗ/біфідобактерії 1/400 та 1/100 спостерігається тенденція до збільшення приросту біомаси мікроорганізмів в порівнянні з культивуванням біфідобактерій у середовищі без пухлинних клітин (рис. 3.10).

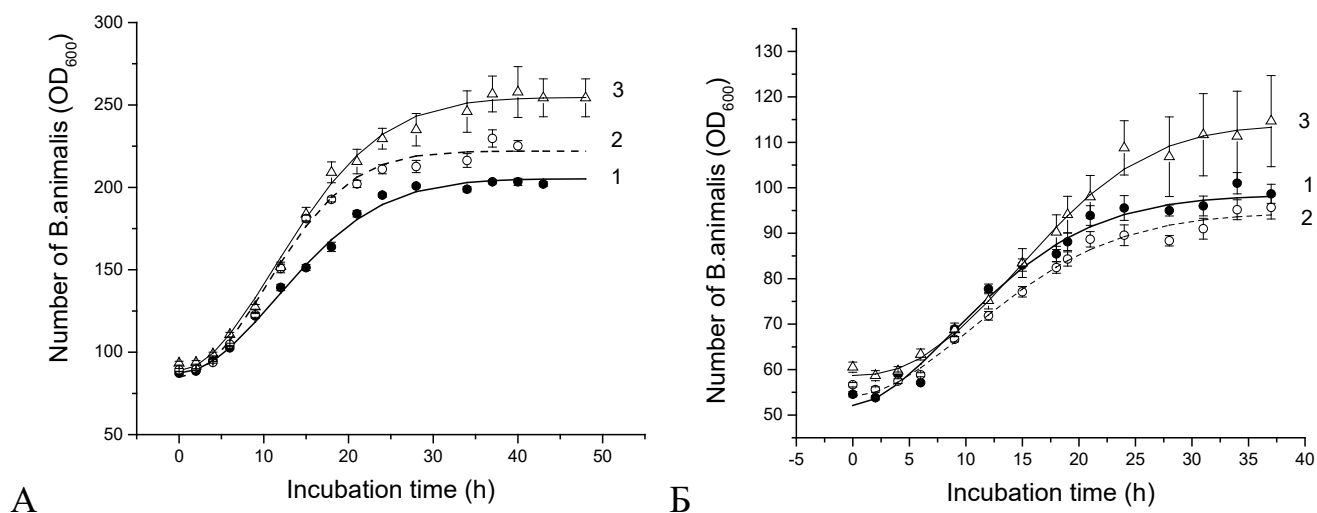


Рис. 3.10 Кінетика росту *B. animalis* за умов їх співкультивування з клітинами РМЗ людини при вихідному співвідношенні РМЗ/*B. animalis* 1/400 (А) та 1/100 (Б). Кінетика росту *B. animalis* окремо (1), в присутності MCF-7/T47D (2) або MDA-MB-231 (3). Точки на графіках представляють експериментальні дані. Криві є найкращим наближенням математичної моделі Вейбула до експериментальних даних.

Такі зміни ростових характеристик даного штаму біфідобактерій були особливо виражені за умов експозиції бактеріальних клітин з клітинами ліній MDA-MB-231 і при початковому співвідношенні еукаріотичних/бактеріальних клітин 1/400 (рис. 3.10 А). Разом з тим, подібно до кривої росту бактерії без клітин РМЗ, логарифмічна фаза росту *B. animalis* тривала до 24 годин інкубації.

Для порівняльного аналізу і статистичної обробки результатів кінетики росту *B. animalis* в присутності або за умови відсутності клітин РМЗ було застосовано математичну модель Вейбулла. Узагальнені результати відповідного аналізу наведено в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Параметри математичної моделі кінетики росту *B. animalis* за умов співкультивування з клітинами РМЗ при співвідношенні еукаріотичних/бактеріальних клітин 1/400

Параметри моделі	<i>B. animalis</i>	<i>B. animalis</i> + MDA-MB-231	<i>B. animalis</i> + MCF-7	<i>B. animalis</i> + T47D
A (OD ₆₀₀)	205.2 ± 1.9	254.6 ± 2.5*	222.0 ± 2.9* [#]	219.7 ± 1.6* [#]
B (OD ₆₀₀)	87.4 ± 3.5	88.8 ± 4.5	84.9 ± 4.9	88.5 ± 3.0
d	1.93 ± 0.2	1.9 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.3 ± 0.2
k (h ⁻¹)	0.06±0.002	0.06±0.002	0.07±0.003*	0.075±0.002*

A (OD₆₀₀) – оптична щільність відображає кількість клітин *B. animalis* у стаціонарній фазі росту; B (OD₆₀₀) – оптична щільність відображає кількість клітин *B. animalis* в 0 годин; * p < 0,05 порівняно з підрахунками лише *B. animalis*; # - p < 0,05 порівняно з кількістю клітин *B. animalis* + MDA-MB-231.

Встановлено, що параметр А зростав при співкультивуванні бактерій з пухлинними клітинами у співвідношенні РМЗ/*B. animalis* 1/400, що переважно зумовлювалось прискоренням поділу *B. animalis* у фазі експоненціального росту. У результаті впливу *B. animalis* на клітини РМЗ при співвідношенні 1/100 було виявлено статистично значущі відмінності у чисельності клітин *B. animalis* у

стаціонарній фазі росту при їх співкультивуванні з клітинами лінії MDA-MB-231 (рис. 3.10 Б).

Після експозиції клітин РМЗ з *B. animalis* у співвідношенні 1/100 спостерігали статистично значущі відмінності ростових характеристик біфідобактерій при їх співкультивуванні з клітинами MDA-MB-231 або T47D (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Параметри математичної моделі кінетики росту *B. animalis* за умов співкультивування з клітинами РМЗ при співвідношенні еукаріотичних/бактеріальних клітин 1/100

Параметри моделі	<i>B. animalis</i>	<i>B. animalis</i> + MDA-MB-231	<i>B. animalis</i> + MCF-7	<i>B. animalis</i> + T47D
A (OD ₆₀₀)	98.4 ± 2.1	113.8 ± 1.6*	94.5 ± 1.5 [#]	108.1 ± 2.4*
B (OD ₆₀₀)	52.1 ± 3.2	58.7 ± 1.4*	54.1 ± 1.8	55.7 ± 2.5
d	1.72 ± 0.35	2.3 ± 0.2	1.8 ± 0.3	1.8 ± 0.3
k (h ⁻¹)	0.069 ± 0.005	0.053 ± 0.002*	0.062 ± 0.003	0.059 ± 0.004

A (OD₆₀₀) – оптична щільність відображає кількість клітин *B. animalis* у стаціонарній фазі росту; B (OD₆₀₀) – оптична щільність відображає кількість клітин *B. animalis* в 0 годин; * p < 0,05 порівняно з підрахунками лише *B. animalis*; # - p < 0,05 порівняно з кількістю клітин *B. animalis* + MDA-MB-231.

Збільшення параметра A зумовлене великою кількістю бактеріальних клітин у початковий момент часу, а не різницею в швидкості поділу в експоненціальній фазі росту, як це було у випадку співвідношення еукаріотичних/бактеріальних клітин 1/400.

Для визначення можливих змін співвідношення РМЗ/*B. animalis* після 48 годин співкультивування в експерименті оцінили кількість і життєздатність біфідобактерій за допомогою спектрофотометричного аналізу при OD600 та методу серійних розведень у біфідосередовищі. Перераховані показники співвідношення двох типів клітин вказані в табл. 3.3.

Таблиця 3.3

Зміни співвідношення клітин РМЗ/*B. animalis* через 48 годин інкубації

Клітини РМЗ	Співвідношення еукаріотичних/бактеріальних клітин	
	0 годин	48 годин
T47D	1/400	1/735
	1/100	1/200
	1/40	1/6
MCF-7	1/400	1/935
	1/100	1/136
	1/40	1/3
MDA-MB-231	1/400	1/200
	1/100	1/70
	1/40	1/2

Відмінності у темпах росту та щільності популяцій еукаріотичних клітин і *B. animalis* зумовили помітні відхилення у співвідношенні РМЗ/*B. animalis* відносно початкових параметрів. Цей показник має істотне значення, оскільки його коливання можуть бути пов'язані з біологічними ефектами, виявленими в межах даного дослідження.

Зміни рівня рН середовища DMEM в умовах співкультивування *B. animalis* з клітинами РМЗ людини аналізували протягом 72 годин (рис. 3.11).

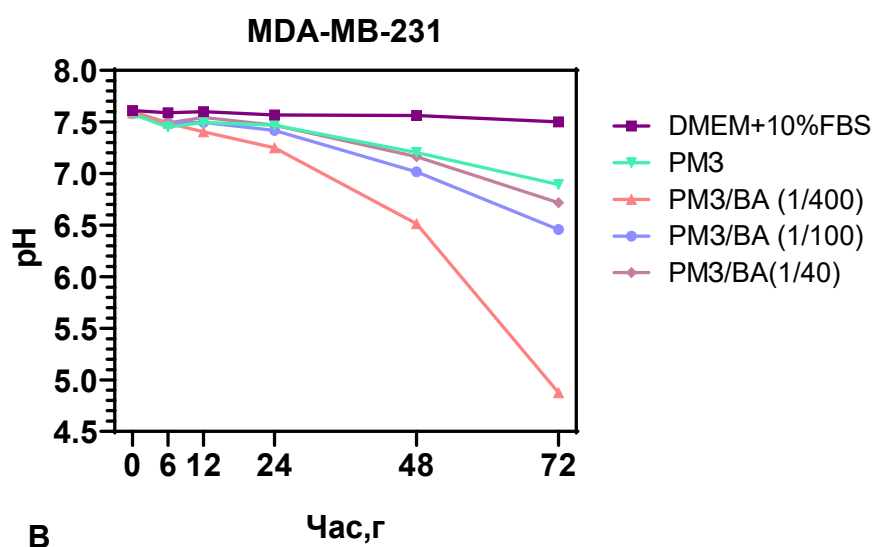
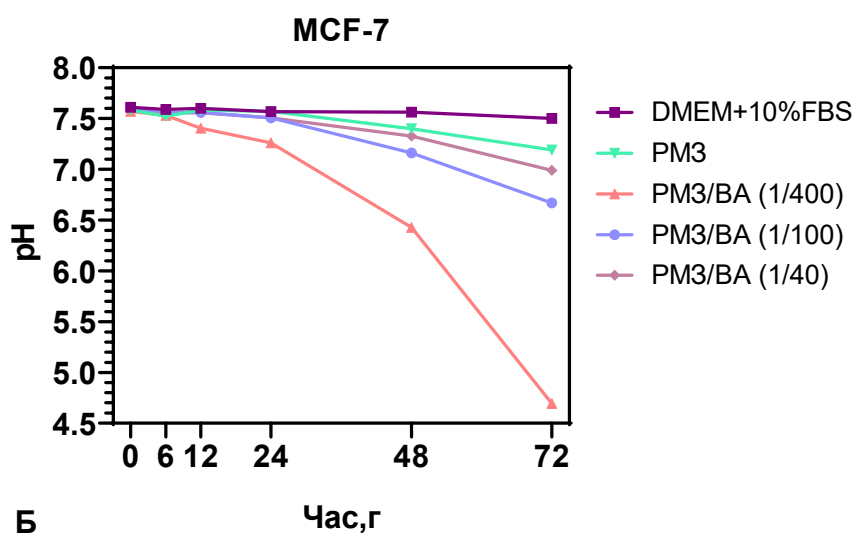
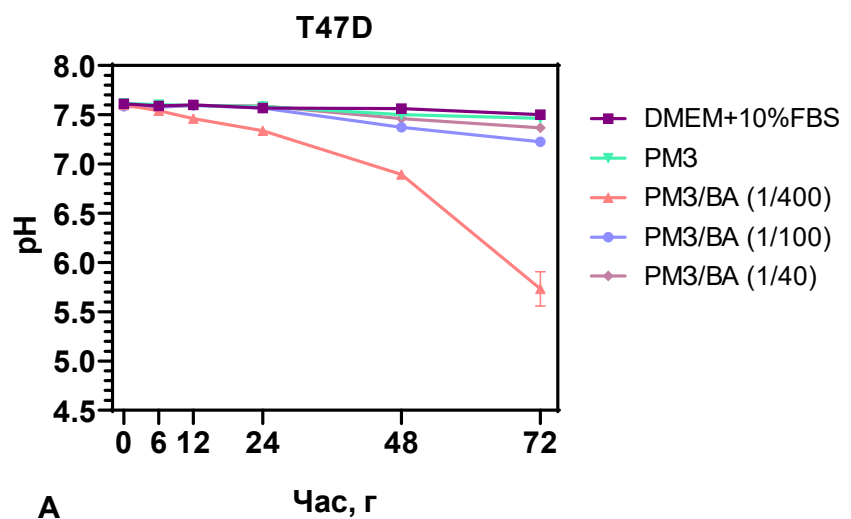


Рис. 3.11 Зміни рН середовища DMEM за умов експозиції *B. animalis* (BA) з клітинами PM3 людини ліній T47D (А), MCF-7 (Б) або MDA-MB-231 (В).

Уже через 12 годин інкубації було зафіксовано статистично достовірне зниження рН ($p < 0,05$) у зразках, де клітини MCF-7 та MDA-MB-231 культивували з біфідобактеріями у співвідношенні PM3/*B. animalis* 1/400, у порівнянні з контролем середовища DMEM без додавання бактерій (рис.3.11 Б та рис.3.11 В). Саме в цих варіантах співкультивування через 48 та 72 години інкубації спостерігалось зниження рН на 15% та 35%, відповідно, відносно початкового значення рН для середовища DMEM. При цьому, після 24 годин співкультивування клітин PM3 з *B. animalis*, показник рН достовірно зменшувався до 7,2–7,3 ($p < 0,05$), після 48 годин — до 6,4–6,8, а на 72-й годині — до 4,5–5,7.

Аналіз життєздатності клітин PM3 після їх співкультивування з живими клітинами *B. animalis* продемонстрував, що статистично достовірне зниження кількості живих клітин усіх досліджуваних ліній спостерігалось лише після 48 годин інкубації. При цьому ефект був виявлений за початкового співвідношення еукаріотичних та бактеріальних клітин 1/400 та 1/100, тоді як за менш інтенсивного бактеріального навантаження, достовірних змін у життєздатності клітин не зафіксовано (рис. 3.12).

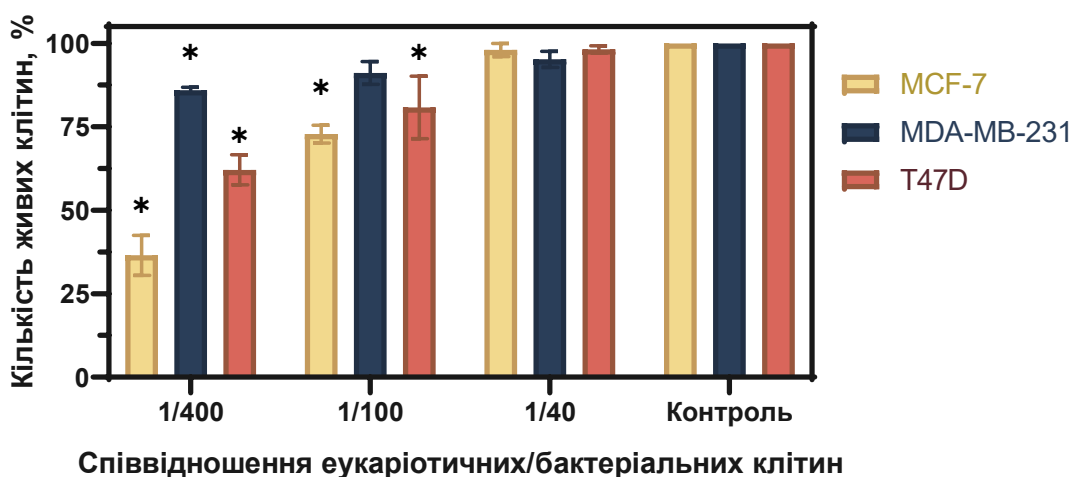


Рис. 3.12 Життєздатність клітин PM3 після експозиції *B. animalis* протягом 48 год.

* $p < 0,05$ порівняно з інтактними клітинами.

Найбільш виражені зміни кількості життєздатних пухлинних клітин за умов їх експозиції з *B. animalis* спостерігали для клітини РМЗ люмінального підтипу лінії MCF-7 та T47D. Зокрема, для клітин MCF-7 реєстрували зниження кількості життєздатних клітин на рівні від 25% до 65% у порівнянні з відповідним контролем клітин. Для клітин лінії T47D цей показник коливався у межах 20–35% відносно інтактних клітин. Отже, клітини люмінального підтипу виявилися більш чутливими до антипроліферативного впливу біфідобактерій ніж клітини РМЗ базального підтипу. Через 72 години інкубації клітин РМЗ з біфідобактеріями при вихідному співвідношенні 1/400 спостерігали загибель 95% всіх клітин РМЗ. Отримані результати вказують на те, що інтенсивність пригнічення життєздатності клітин РМЗ залежала як від співвідношення кількості еукаріотичних/бактеріальних клітин, так і від біологічних особливостей досліджених клітинних ліній.

За результатами проведених експериментів були визначені ключові параметри експериментальної моделі співкультивування *B. animalis* і клітин РМЗ *in vitro*, контроль яких забезпечує інформативність та відтворюваність цієї системи: пряма взаємодія еукаріотичних і бактеріальних клітин при рекомендованому вихідному співвідношенні клітин 1/100-1/400; тривалість співкультивування клітин 48 годин в умовах стандартних для культур еукаріотичних клітин; контроль кінетики росту клітин обох типів; визначення концентрації глюкози і лактату в поживному середовищі.

Результати, описані в розділі 3, опубліковані в [125,126].

РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ *B. ANIMALIS* НА ПРОЦЕСИ ГЛІКОЛІЗУ В КЛІТИНАХ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ РІЗНИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ ПІДТИПІВ

Рак молочної залози є найпоширенішою формою злоякісних новоутворень серед жінок у світі та характеризується високими показниками смертності, незважаючи на вдосконалення методів терапії [1–3]. Однією з ключових особливостей пухлинних клітин є їх здатність до метаболічного репрограмування — адаптивної перебудови процесів енергетичного обміну у відповідь на зміни умов середовища, що сприяє їх проліферації та виживанню [4,5,96]. Важливим проявом такої перебудови є зміна шляхів метаболізму глюкози в пухлинних клітинах. Злоякісно трансформовані клітини демонструють переважну залежність від гліколізу для задоволення своїх енергетичних та біосинтетичних потреб, навіть в умовах наявності кисню, що відомо як ефект Варбурга [127–129]. Під час гліколізу посилене поглинання глюкози забезпечується активністю транспортерів GLUT, у результаті чого пухлинні клітини виробляють метаболіти, зокрема лактат, що модулюють різні сигнальні та метаболічні шляхи [6].

Метаболізм злоякісно трансформованих клітин регулюється клітинними, позаклітинними і розчинними компонентами пухлинного мікрооточення [4]. Сьогодні новим компонентом пухлинного мікрооточення визнано мікробіом, який має надзвичайно тісний та складний взаємозв'язок з пухлиною [5]. Одними із основних представників мікробіоти молочної залози є анаеробні молочно-кислі бактерії, зокрема представники роду *Bifidobacterium*. Сьогодні доведено, що біфідобактерії можуть інгібувати проліферацію злоякісно трансформованих клітин шляхом активації прокаспаз і посилення регуляції проапоптичних білків Вах [7,8]. Також, на прикладі *B. animalis subsp. lactis* доведена їх протизапальна активність [9,130]. Однак, деякі опубліковані дані свідчать про можливу роль молочнокислих бактерій у підвищенні біодоступності лактату, що потенційно може сприяти прогресуванню пухлин та знижувати ефективність хіміотерапії [10,11,131].

Оскільки накопичення лактату асоціюється зі стимуляцією проліферації, індукцією епітеліально-мезенхімального переходу та метастазуванням [86]

пухлинних клітин, дослідження впливу біфідобактерій на метаболізм глюкози клітинами РМЗ набуває особливої актуальності. Таким чином, метою цього розділу є аналіз параметрів гліколізу в клітинах РМЗ після їх співкультивування з *B. animalis*, зокрема швидкість споживання глюкози (ШСГ) та продукції лактату (ШПЛ), внутрішньоклітинна активність ферментів гліколізу (лактатдегідрогенази – ЛДГ) та пентозофосфатного шляху (глюкозо-6-фосфат дегідрогенази – Г6ФД), а також зміни експресії білків асоційованих з регуляцією процесів гліколізу (STAT6, GLUT1 і рецептори інсуліну).

4.1. Зміни швидкості поглинання глюкози та продукції лактату клітинами РМЗ різних молекулярних підтипів після їх співкультивування з *B. animalis*

Злоякісно трансформовані клітини, зокрема молочної залози, характеризуються високою потребою у споживанні і метаболізмі глюкози, зумовленою їх посиленою потребою в АТФ. Змінений метаболізм пухлинних клітин гарантує безперервне виробництво енергії та метаболітів, забезпечуючи швидку проліферацію та виживаність клітин ^[132]. Тому, при дослідженні метаболічної пластичності клітин РМЗ за умови їх співкультивування *B. animalis* важливо було враховувати вплив біфідобактерій на життєздатність злоякісно трансформованих клітин. В тесті з трипановим синім визначали життєздатність клітин РМЗ після співкультивування з *B. animalis*, отримані результати представлені на рис. 4.1.

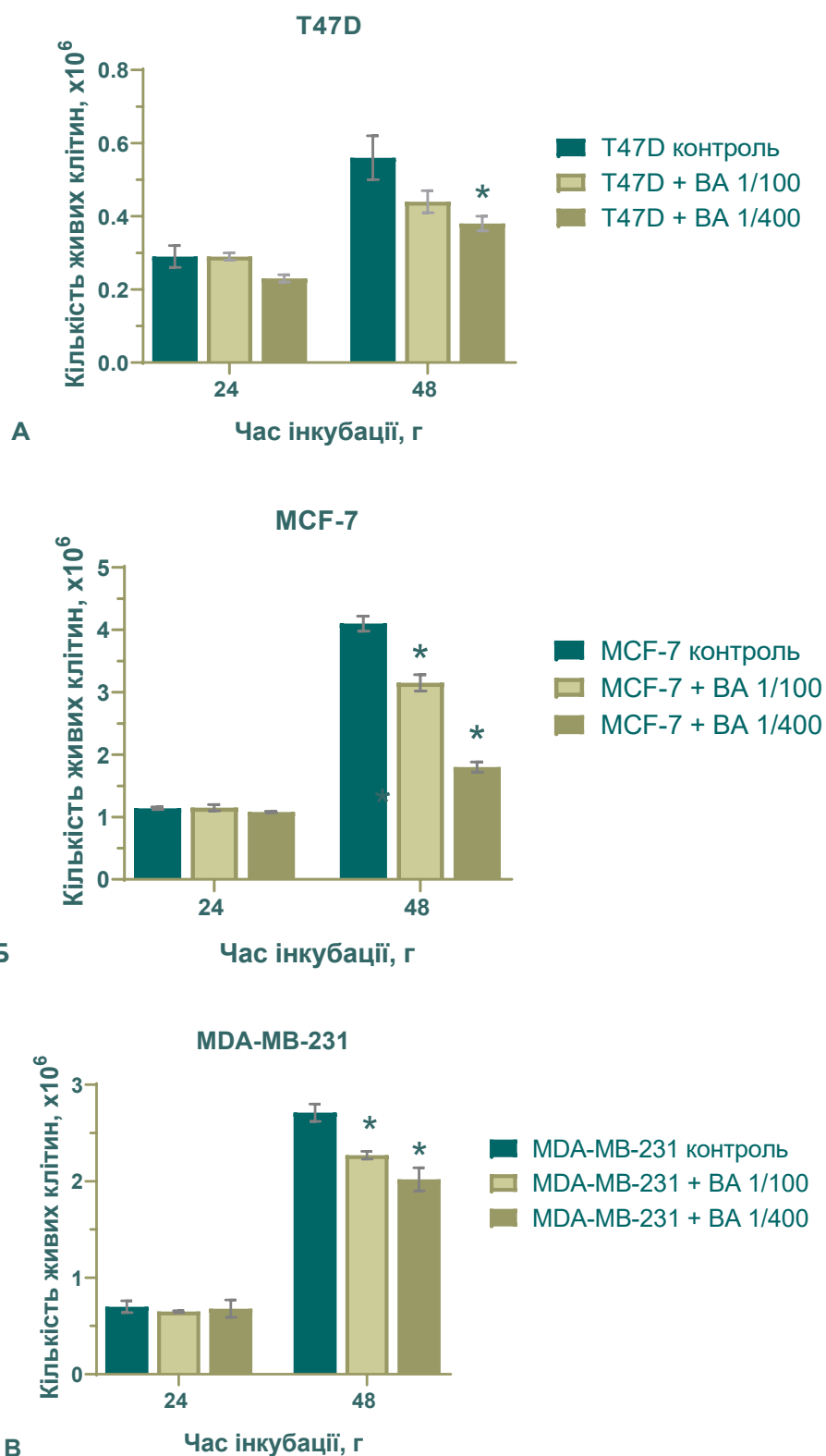


Рис. 4.1 Кількість живих клітин РМЗ людини ліній Т47D (А), МCF-7 (Б) та MDA-MB-231 (В) після співкультивування з *B. animalis*. Тест на виживаність з трипановим синім. * $p < 0,05$ — статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами

Після 24 годин сумісної інкубації із біфідобактеріями у більшості експериментальних груп не виявлено статистично значимих змін у виживаності еукаріотичних клітин порівняно з контролем. Водночас через 48 годин співкультивування було зафіксовано статистично достовірне зниження кількості життєздатних клітин РМЗ в усіх трьох досліджуваних лініях в порівнянні з контролем. Зокрема, кількість живих клітин Т47D зменшилася на 33%, MCF-7 — на 23–56%, а MDA-MB-231 — на 16–25% у порівнянні з інтактними клітинами.

Оцінюючи вплив *B. animalis* на метаболічний фенотип клітин РМЗ, аналізували деякі параметри метаболізму глюкози цими клітинами. Важливими показниками, які охарактеризовують метаболічний фенотип пухлинних клітин, є швидкість споживання глюкози (ШСГ) та продукції лактату (ШПЛ), які були визначені на цьому етапі дослідження.

Порівняльний аналіз вихідного рівня досліджених показників в клітинах трьох ліній РМЗ різних молекулярних підтипів свідчить, що клітини базального підтипу MDA-MB-231 надають перевагу гліколітичному шляху метаболізму глюкози, про що свідчать найвищі ШСГ і ШПЛ (рис. 4.2).

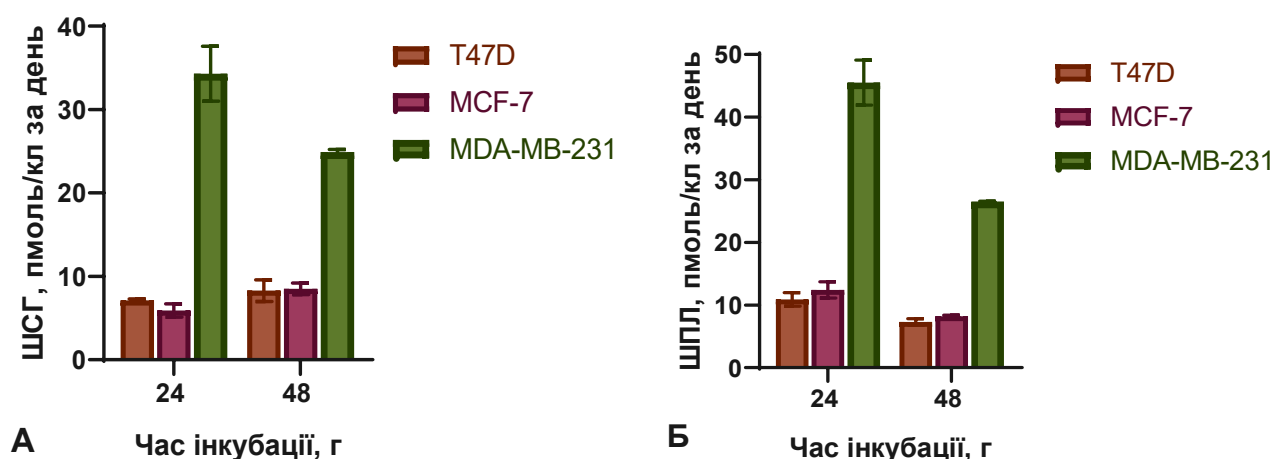


Рис. 4.2 Швидкість споживання глюкози (А) і продукції лактату (Б) клітинами РМЗ різних молекулярних підтипів.

Співкультивування клітин РМЗ з живими *B. animalis* призводило до виражених змін у ШСГ в усіх досліджуваних клітинних лініях (рис. 4.3).

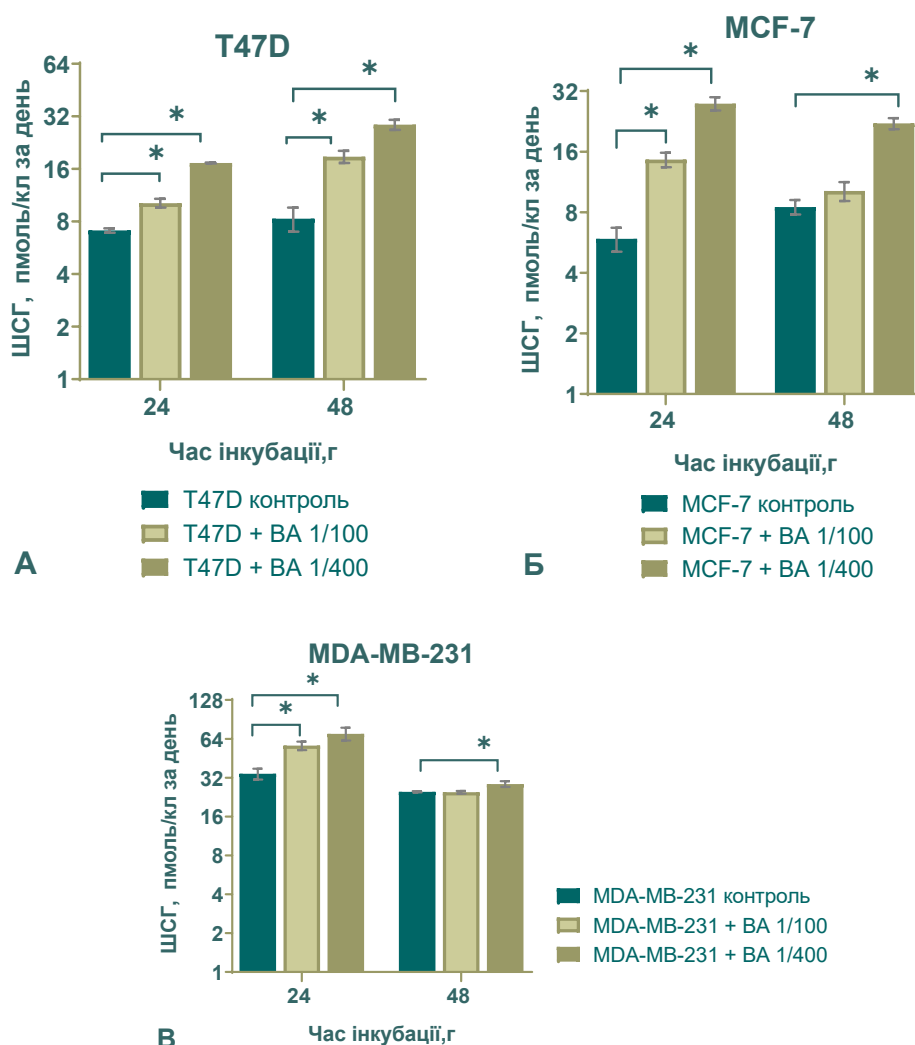


Рис. 4.3 Швидкість споживання глюкози клітинами РМЗ ліній Т47D (А), МCF-7 (Б) або МDA-MB-231 (С) за умов співкультивування з *B. animalis*. * $p < 0,05$ — статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами.

Так, в клітинах Т47D спостерігали статистично достовірне підвищення ШСГ у 1,4–3,1 рази у порівнянні з контролем. Подібна тенденція встановлена і для клітин лінії МCF-7, де ШСГ збільшувався у 1,6–4,7 разів. У клітинах МDA-MB-231 зміни були менш вираженими, проте також статистично значущими: ШПГ зростала у 1,2–2 рази відносно відповідного контролю.

В клітинах РМЗ люмінального підтипу після співкультивування з *B. animalis* виявили статистично достовірне зростання швидкості продукції лактату (ШПЛ) (рис. 4.4).

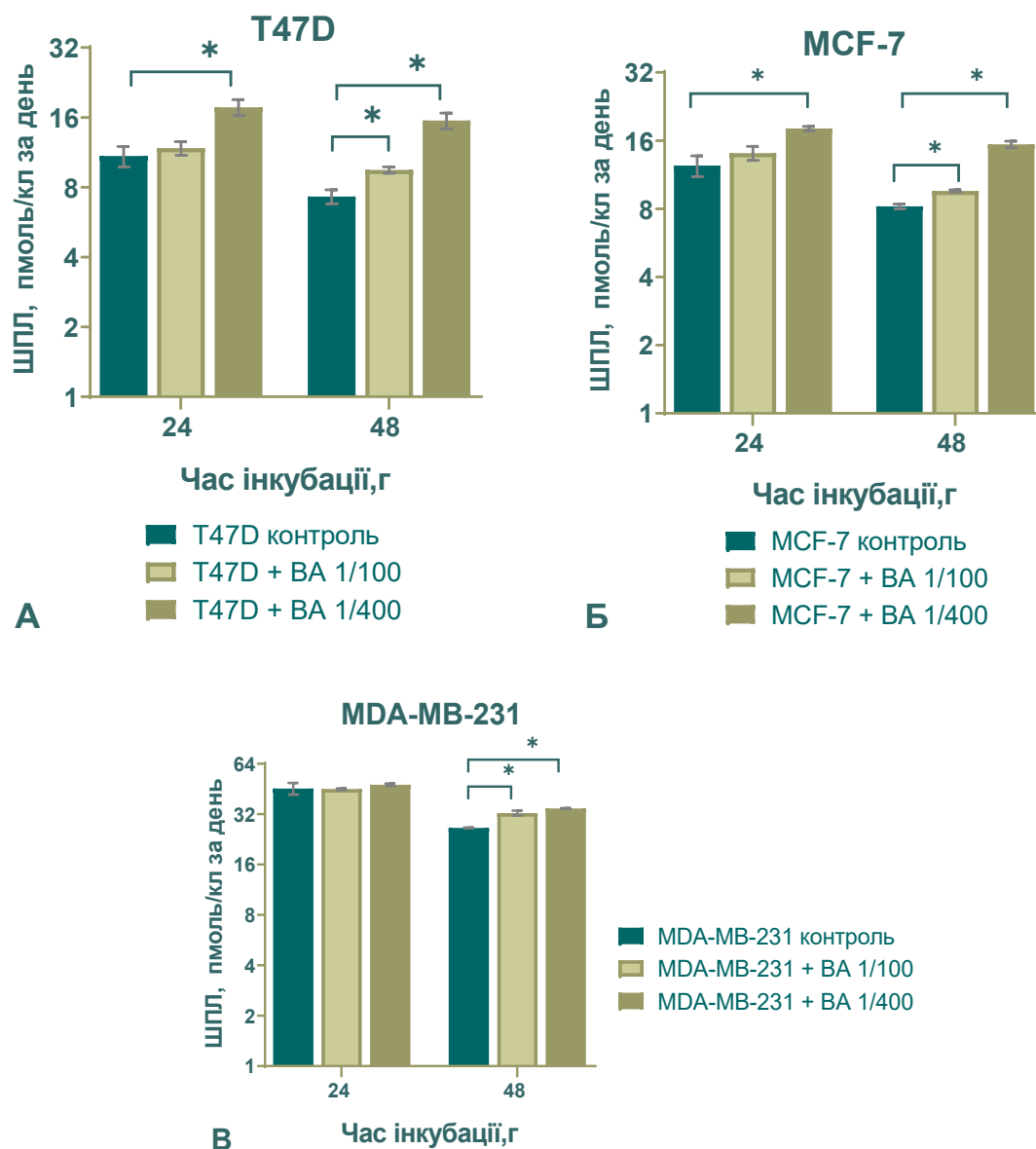


Рис. 4.4 Швидкість продукції лактату клітинами РМЗ ліній Т47D (А), MCF-7 (Б) або MDA-MB-231 (С) за умов співкультивування з *B. animalis*. * $p < 0,05$ — статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами.

Зокрема, у клітинах Т47D фіксували підвищення ШПЛ на 30–95%, а в клітинах MCF-7 — на 14–115% через 24 та 48 годин після початку експозиції,

порівняно з відповідними контрольними клітинами (рис. 4.4). Підвищення продукції лактату в обох лініях свідчить про активацію гліколітичних процесів метаболізму глюкози у відповідь на взаємодію з біфідобактеріями.

В клітинах базального підтипу лінії MDA-MB-231 після співкультивування з *B. animalis* також спостерігали приріст ШПЛ у межах 20–34% відносно контролю (рис. 4.4). Проте інтенсивність змін цього показника в клітинах MDA-MB-231 була менш вираженою, порівняно з клітинами люмінального підтипу, що вказує на існування певних відмінностей у метаболічній відповіді клітин РМЗ на дію біфідобактерій в залежності від характеристик їх вихідного метаболічного профілю. Адже, саме інтактні клітини MDA-MB-231 віддають перевагу гліколітичному шляху метаболізму глюкози. Отримані результати свідчать про те, що *B. animalis* здатні стимулювати посилення гліколізу в клітинах РМЗ, причому найбільш виражений ефект спостерігається в клітинах люмінального підтипу.

При співкультивуванні клітин РМЗ з *B. animalis* представлені результати щодо ШСГ і ШПЛ (рис.4.3 та рис. 4.4) відображають загальну метаболічну активність як еукаріотичних, так і бактеріальних клітин, оскільки ці параметри визначали в культуральному кондиційованому середовищі. Проте аналіз метаболічних характеристик *B. animalis*, представлений на рис. 4.5, показав, що хоча бактерії також споживають глюкозу і продукують лактат, показники ШСГ і ШПЛ значно нижчі порівняно з відповідними показниками еукаріотичних злоякісно трансформованих клітин.

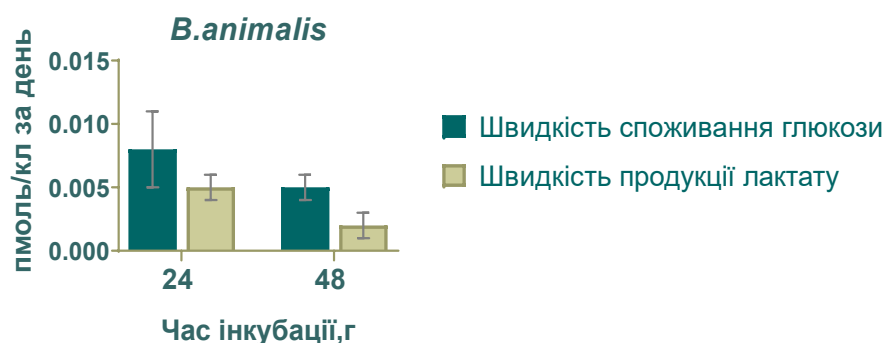


Рис. 4.5 Швидкість споживання глюкози та продукції лактату бактеріальними клітинами *B. animalis*.

Варто зазначити, що в умовах співкультивування кількість бактеріальних клітин перевищує кількість клітин РМЗ. Водночас результати розрахунків споживання глюкози клітинами РМЗ і *B. animalis* при співкультивуванні та окремо свідчать, що навіть при максимальному співвідношенні (1/400) бактерії поглинають не більше 13% від загального обсягу спожитої глюкози в групах де клітини РМЗ інкубували з *B. animalis* (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Кількість спожитої глюкози клітинами РМЗ і *B. animalis* за умови їх культивування окремо і разом протягом 24-48 годин спостереження

Клітини	Кількість спожитої глюкози через 24 години інкубації, мкг	Кількість спожитої глюкози через 48 годин інкубації, мкг
T47D контроль	5,0 ± 0,8	22,5 ± 1,4
T47D + <i>B. animalis</i> 1/100	6,6 ± 0,8	30,5 ± 2,4
T47D + <i>B. animalis</i> 1/400	10,9 ± 1,5	36,5 ± 1,5
MCF-7 контроль	3,3 ± 0,3	29,6 ± 3,3
MCF-7 + <i>B. animalis</i> 1/100	9,4 ± 1,1	37,7 ± 4,5
MCF-7 + <i>B. animalis</i> 1/400	16,9 ± 2,5	52,5 ± 3,7
MDA-MB-231 контроль	13,7 ± 1,0	62,5 ± 5,6
MDA-MB-231+ <i>B. animalis</i> 1/100	18,8 ± 2,1	63,1 ± 8,2
MDA-MB-231+ <i>B. animalis</i> 1/400	22,4 ± 3,1	75,7 ± 4,8
<i>B. animalis</i> 1/100	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,2
<i>B. animalis</i> 1/400	1,4 ± 0,1	4,8 ± 0,6

4.2. Аналіз впливу *B. animalis* на експресію рецептора інсуліну в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів

Одним із важливих регуляторних білків, експресія та функціональна активність якого можуть зазнавати змін під впливом біфідобактерій, є рецептор інсуліну (PI) [133]. Цей рецептор є трансмембранним білком, який здійснює передачу сигналів, що регулюють як метаболічні процеси, так і мітогенні шляхи в клітинах. Підвищена експресія PI є характерною рисою для клітин РМЗ, що пов'язано з підсиленням їх проліферативної активності та змінами обміну речовин [134].

У межах проведеного експерименту методом проточної цитометрії було здійснено аналіз зв'язування FITC-міченого інсуліну з інсуліновим рецептором на поверхні клітин РМЗ після їх співкультивування з *B. animalis* (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

Зміни експресії рецептора інсуліну в клітинах РМЗ людини різних молекулярних підтипів після їх експозиції з *B. animalis*

Клітинна лінія РМЗ	Кількість PI ⁺ клітин, % (M±SD)		Рівень експресії PI, у.о. (M±SD)	
	Контроль клітин	+ <i>B. animalis</i> 1/400	Контроль клітин	+ <i>B. animalis</i> 1/400
T47D	38,1±1,1	28,0±1,6*	21667,0±1878,1	14285,0±648,3*
MCF-7	65,4±2,3	81,8±1,1*	8528,2±270,7	10524,8±180,0*
MDA-MB-231	54,0±2,9	48,0±2,2	5998,8±343,7	7052,2±51,4*

*p < 0,05 статистично достовірно різниця порівняно з інтактними клітинами

В клітинах T47D після експозиції з біфідобактеріями виявлено статистично достовірне зниження рівня експресії PI на 30% порівняно з контролем. Натомість у клітинах MCF-7 та MDA-MB-231 після співкультивування з *B. animalis* спостерігали підвищення на 24,3% та 17,6% експресії інсулінового рецептора відповідно.

4.3. Зміни експресії GLUT1 та STAT6 в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів після співкультивування з *B. animalis*

Аналіз сигнальних шляхів основних способів метаболізму глюкози злякiсно трансформованими клітинами свiдчить про важливу роль транспортера глюкози GLUT1 в цих процесах, зокрема гліколітичного шляху споживання глюкози [73,135]. Сьогодні показано, що тканини РМЗ людини характеризуються підвищеним рівнем експресії GLUT1, який є найважливішим транспортером глюкози в клітинах РМЗ, і володіють високою селективністю до цього моносахариду [136–138].

Зміни експресії GLUT1 в експерименті представлені в таблиці 4.3.

Таблиця 4.3

Експресія транспортера глюкози GLUT1 в клітинах РМЗ людини різних молекулярних підтипів після співкультивування з *B. animalis*

Клітини	GLUT1 експресія, бали (M±SD)
T47D контроль	135,0±15,0
T47D + <i>B. animalis</i> 1/100	175,0±10,0*
T47D + <i>B. animalis</i> 1/400	215,0±12,0*
MCF-7 контроль	100,0±5,0
MCF-7 + <i>B. animalis</i> 1/100	140,0±7,0*
MCF-7 + <i>B. animalis</i> 1/400	180,0±10,0*
MDA-MB-231 контроль	260,0±10,0
MDA-MB-231 + <i>B. animalis</i> 1/100	250,0±15,0
MDA-MB-231 + <i>B. animalis</i> 1/400	275,0±15,0

* $p < 0,05$ статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами

Співкультивування клітин T47D або MCF-7 з *B. animalis* призводило до статистично достовірного підвищення експресії GLUT1 в досліджених клітинах на

29,6-59,3% і 40,0-80,0%, відповідно, в порівнянні з контролем клітин (табл. 4.3). Важливо відмітити, що збільшення дослідженого показника в цих клітинах відбувалось за рахунок збільшення відсоткового вмісту клітин з високим рівнем експресії транспортера глюкози в популяції (рис. 4.6).

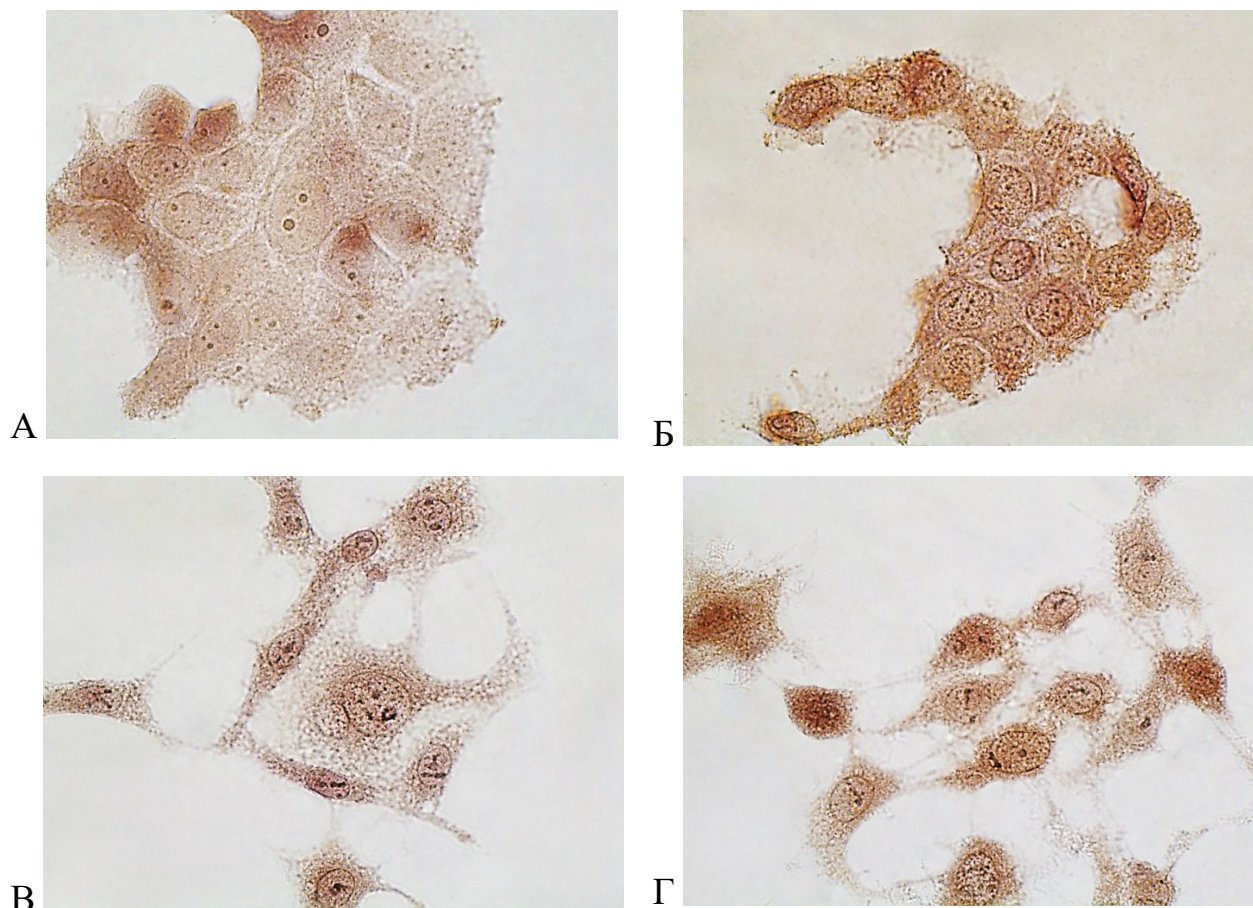


Рис. 4.6 Зміни експресії GLUT1 в клітинах РМЗ людини люмінального підтипу після співкультивування з *B. animalis*. (А) – Т47D контроль, (Б) – Т47D + *B. animalis* 1/400, (В) – МСF-7 контроль, (Г) – МСF-7 + *B. animalis* 1/400. Збільшення x1000.

В клітинах MDA-MB-231, які характеризуються високим вихідним рівнем експресії GLUT1, змін експресії дослідженого маркера наслідок експозиції клітин РМЗ з біфідобактеріями не спостерігали (табл. 4.3).

Комплексні та багатофакторні зміни метаболічного фенотипу клітин РМЗ після обробки *B. animalis*, що супроводжуються зниженням їх проліферативної

активності, очевидно, регулюються складною мережею сигнальних шляхів, у яких важливу роль відіграють транскрипційні фактори.

STAT6 являє собою транскрипційний фактор, який активується шляхом фосфорилювання під дією JAK-кіназ, після чого димеризується та транспортується до ядра, де бере участь у регуляції транскрипції специфічних генів. В межах цього сигнального каскаду STAT6 здійснює контроль над кількома критичними процесами, включно із забезпеченням клітинного виживання, індукцією апоптозу, регуляцією проліферації, а також модифікацією метаболічної активності клітин [139,140].

Для ідентифікації можливих регуляторних білків і оцінки їхнього внеску в реалізацію виявлених ефектів було проведено дослідження експресії STAT6 у клітинах PM3 після експозиції з біфідобактеріями (табл. 4.4).

Таблиця 4.4

Експресія фактору транскрипції STAT6 в клітинах PM3 людини різних молекулярних підтипів після співкультивування з *B. animalis*

Клітини	STAT6 експресія, бали (M±SD)
T47D контроль	150,0±15,0
T47D + <i>B. animalis</i> 1/100	190,0±10,0*
T47D + <i>B. animalis</i> 1/400	260, ± 10,0*
MCF-7 контроль	120,0 ± 10,0
MCF-7 + <i>B. animalis</i> 1/100	185,0 ± 7,0*
MCF-7 + <i>B. animalis</i> 1/400	200,0 ± 10,0*
MDA-MB-231 контроль	85,0 ± 5,0
MDA-MB-231 + <i>B. animalis</i> 1/100	100,0 ± 10,0
MDA-MB-231 + <i>B. animalis</i> 1/400	155,0 ± 10,0*

* $p < 0,05$ статистично достовірна різниця порівняно з необробленими клітинами

Аналіз експресії STAT6 показав, що співкультивування клітин PM3 трьох досліджуваних ліній із *B. animalis* призводило до статистично достовірного

підвищення рівня експресії цього транскрипційного фактора у дозозалежний спосіб (рис. 4.7). В клітинах T47D експресія STAT6 зростала на 26,7–73,3%, тоді як у клітинах MCF-7 — на 54,2–66,7% порівняно з контрольними клітинами.

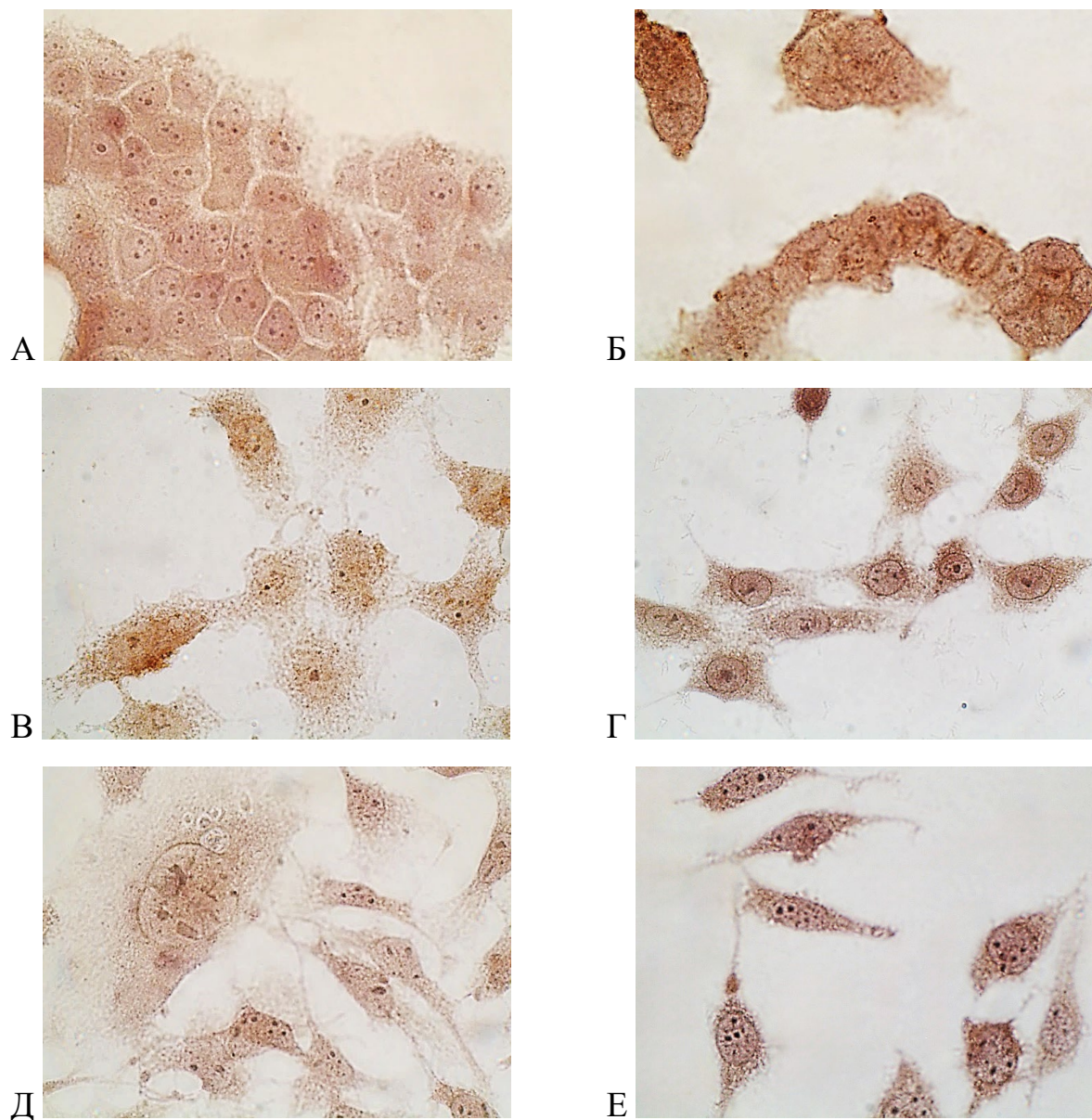


Рис. 4.7 Експресія STAT6 в клітинах PM3 різних молекулярних підтипів після співкультивування з *B. animalis*. (А) – T47D контроль, (Б) – T47D + *B. animalis* 1/400, (В) – MCF-7 контроль, (Г) – MCF-7 + *B. animalis* 1/400, (Д) – MDA-MB-231 контроль, (Е) – MDA-MB-231 + *B. animalis* 1/400. Збільшення x1000.

В клітинах базального підтипу PM3 лінії MDA-MB-231 статистично достовірне збільшення експресії STAT6 (на 82,4% відносно контролю) було

зафіксоване лише за умов їх співкультивування з *B. animalis* у співвідношенні 1/400.

4.4. Вплив *B. animalis* на активність ферментів лактатдегідрогенази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів

Для розуміння механізмів змін процесів метаболізму глюкози в клітинах РМЗ після співкультивування з *B. animalis* було проаналізовано внутрішньоклітинну активність ЛДГ — одного з ключових ферментів гліколітичного шляху метаболізму глюкози. Оцінювали активність ферменту через 24 і 48 годин спільної інкубації клітин РМЗ із пробіотичними бактеріями.

Результати показали, що через 24 години співкультивування активність ЛДГ в клітинах люмінального підтипу лінії T47D зросла на 111,5–160,0% (рис. 4.8 А), тоді як в клітинах MCF-7 показник підвищився на 12,2–15,7% порівняно з контролем (рис. 4.8 Б). Через 48 годин інкубації з *B. animalis* відзначали подальше зростання активності ЛДГ: зокрема, у клітинах T47D на 26,2–66,3%, а у клітинах MCF-7 — на 18,7–59,5% в порівнянні з відповідними показниками контрольних інтактних клітин.

Щодо клітин базального підтипу – MDA-MB-231, підвищення активності ЛДГ було зафіксоване лише через 48 годин їх співкультивування з *B. animalis*. В цьому випадку активність ферменту збільшувалася на 18,2–40,9% відносно інтактних клітин ($p < 0,05$) (рис. 4.8 В).

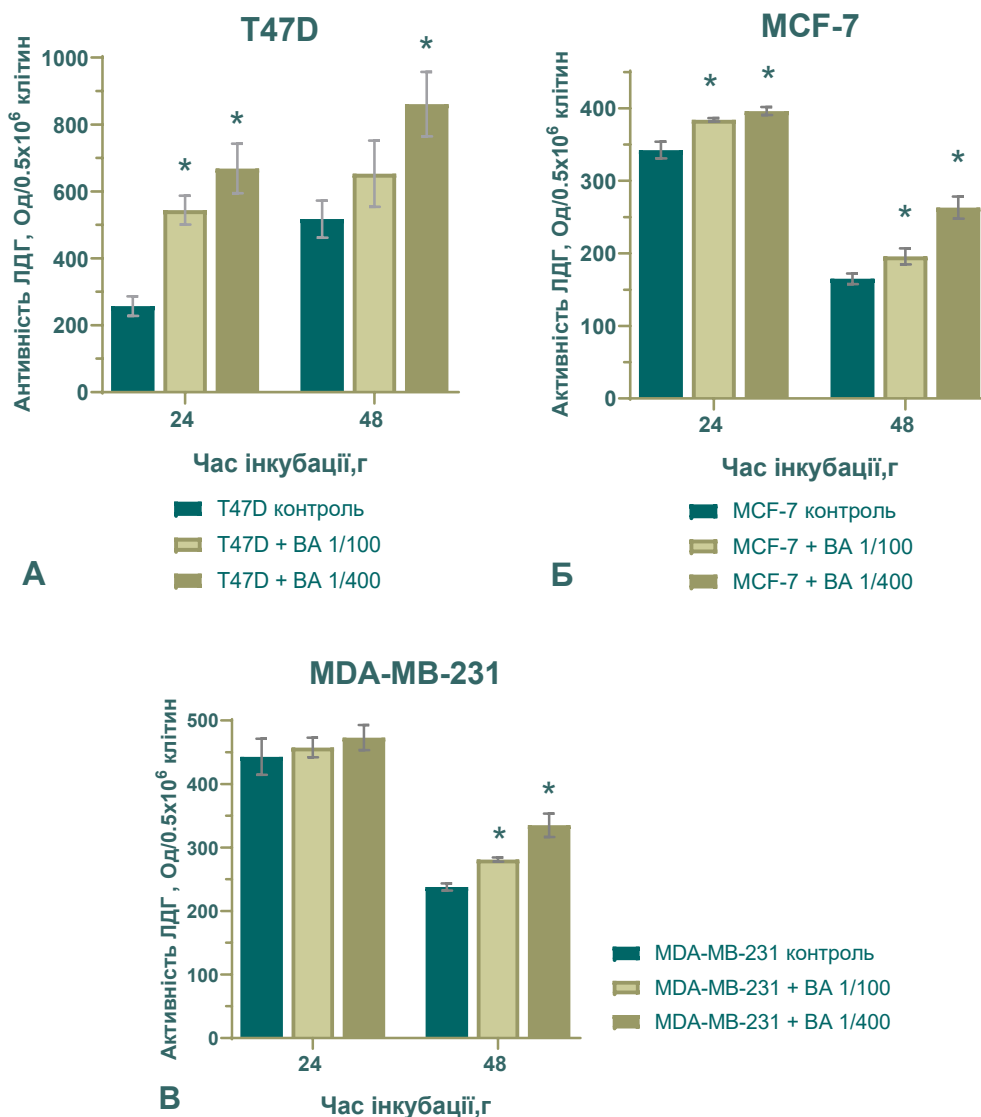


Рис. 4.8 Активність ЛДГ в клітинах РМЗ ліній Т47D (А), МCF-7 (Б) або МDA-MB-231 (В) після співкультивування з *B. animalis*. * $p < 0,05$ — статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами.

Кінетика змін активності Г6ФД в клітинах РМЗ за умови їх співкультивування з *B. animalis* протягом 24 – 48 годин мала різноспрямований характер і відрізнялась одна від одної у всіх досліджених клітинних лініях. Так, в клітинах Т47D через 24 години їх експозиції з біфідобактеріями спостерігали статистично значуще підвищення активності ферменту на 155,4-277,6% порівнянні з контролем клітин. Однак, через 48 годин співкультивування цих клітин відмічали значне зниження внутрішньоклітинної активності Г6ФД – на 70,0-83,5% відносно інтактних клітин (рис. 4.9 А).

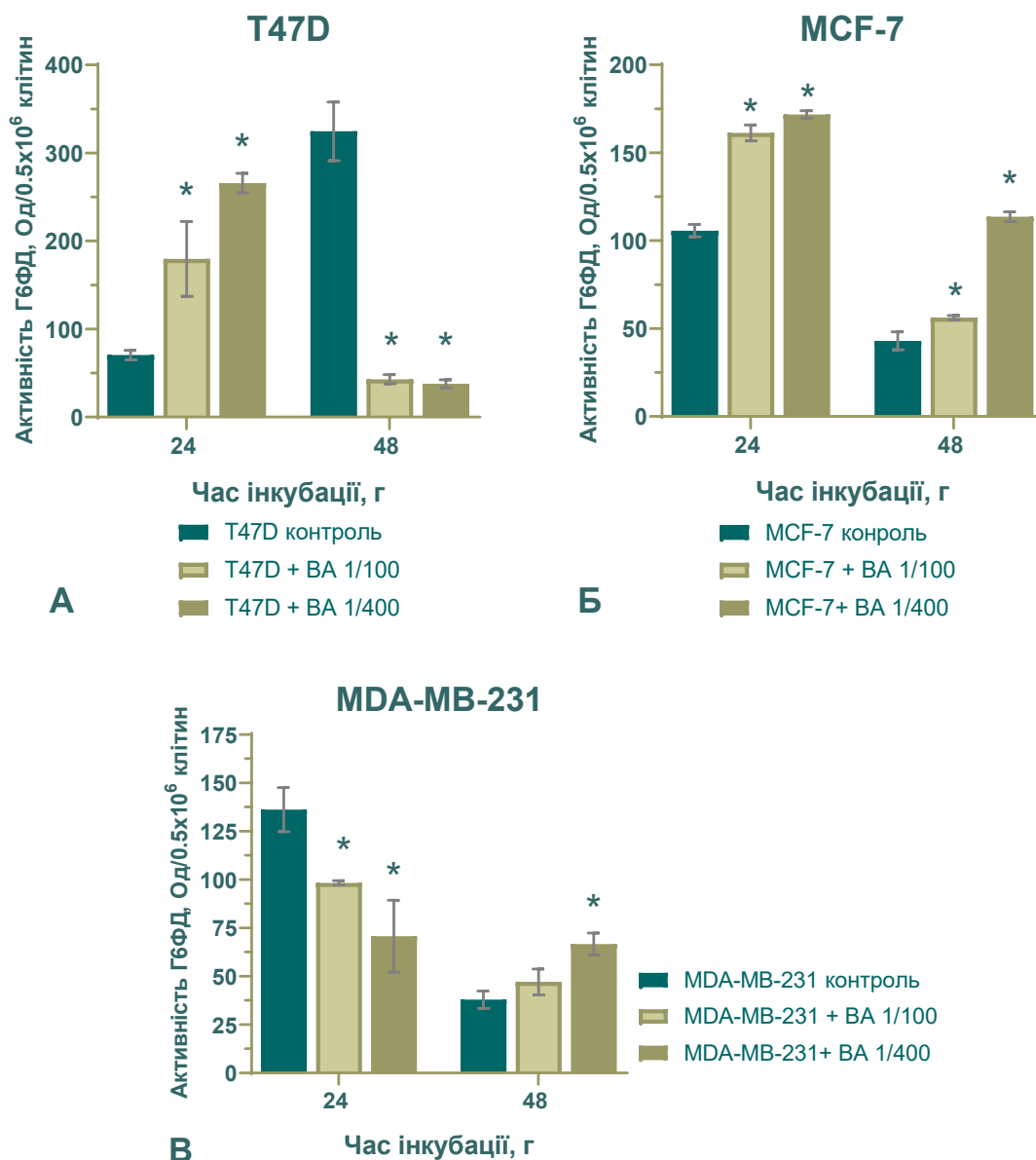


Рис. 4.9 Активність Г6ФД в клітинах РМЗ ліній Т47D (А), МСF-7 (Б) або МDА-МВ-231 (В) після співкультивування з *B. animalis*. * $p < 0,05$ — статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами.

В клітинах МСF-7 після їх експозиції з *B. animalis* фіксували односпрямований характер змін активності ферменту ($p < 0,05$) протягом всього експерименту – спостерігали підвищення показника на 52,6-62,5% (24 години) і 30,7-164,2% (48 годин) в порівнянні з контролем (рис. 4.9 Б). Таким чином, в клітинах МСF-7 спостерігали стійке підвищення активності Г6ФД незалежно від тривалості впливу біфідобактерій.

Щодо клітин базального підтипу лінії MDA-MB-231, результати виявили іншу динаміку змін активності Г6ФД внаслідок співкультивування клітин з *B. animalis*: через 24 години інкубації фіксували зниження активності Г6ФД на 27,8–48,0% порівняно з контролем, тоді як через 48 годин експозиції спостерігали протилежний ефект — активність ферменту зростала на 24,3–75,7% в порівнянні з контрольними клітинами (рис. 4.9 В). Зміни в активності Г6ФД у цій лінії клітин також були статистично достовірними ($p < 0,05$).

4.5 Оцінка впливу індуктора або інгібітора гліколізу на метаболізм глюкози клітинами РМЗ різних молекулярних підтипів після співкультивування з *B. animalis*

З метою підтвердження попередніх висновків щодо напрямку змін метаболічної активності клітин РМЗ після їх співкультивування з *B. animalis* було досліджено вплив інгібітора гліколізу 2-дезоксиглюкози (2-DG) та індуктора гліколізу в клітинах РМЗ метформіну на деякі ланки метаболізму глюкози і життєздатність пухлинних клітин *in vitro*.

Для того щоб оцінити, порівняти та відділити ефекти *B. animalis* від впливу модифікаторів енергетичного метаболізму, клітини РМЗ співкультивували з біфідобактеріями протягом 72 годин, далі бактеріальні клітини видаляли і до клітин додавали 2-DG або метформін. З метою визначення та підтвердження змін метаболічного профілю клітин РМЗ різних молекулярних підтипів внаслідок впливу *B. animalis*, через 72 години інкубації клітин аналізували життєздатність і деякі показники гліколізу в досліджених клітинах.

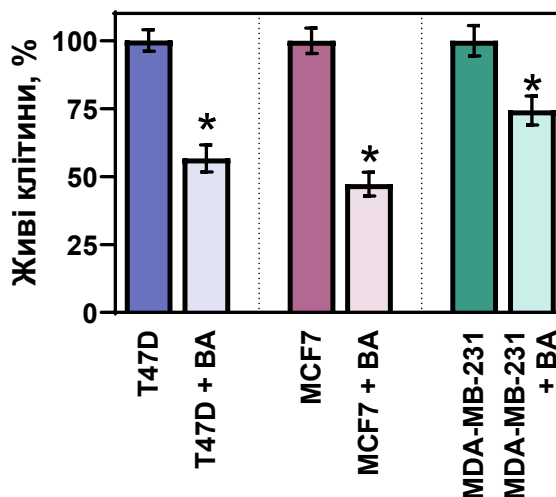


Рис. 4.10 Життєздатність клітин РМЗ людини різних молекулярних підтипів після співкультивування з *B. animalis* протягом 72 годин. Життєздатність клітин визначали в тесті з трипановим синім. +ВА – клітини РМЗ інкубували з *B. animalis* у співвідношенні еукаріотичні/бактеріальні клітини 1/400. * $p < 0,05$ статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами.

Аналіз виживаності клітин РМЗ в тесті з трипановим синім виявив, що за таких умов співкультивування *B. animalis* спричиняє статистично достовірне зменшення кількості живих клітин лінії Т47D на 43%, MCF-7 на 52% і MDA-MB-231 на 26%, в порівнянні з інтактними клітинами цих ліній (рис. 4.10). Отримані результати свідчать, що і за таких умов співкультивування зберігається визначена раніше тенденція – *B. animalis* пригнічують проліферацію клітин РМЗ всіх ліній. При цьому найбільш чутливими до впливу біфідобактерій є клітини люмінального підтипу, особливо лінії MCF-7.

Також, в клітинах РМЗ вивчали комплекс метаболічних показників, асоційованих з гліколізом. Зокрема, ШСГ, ШПЛ, активність ЛДГ і Г6ФД. У клітинах люмінального підтипу ліній MCF-7 та Т47D після їх співкультивування з *B. animalis* ШСГ статистично значуще збільшувалась у 2 – 2,2 рази, відповідно, в порівнянні з інтактними клітинами. В клітинах базального підтипу лінії MDA-MB-231 також спостерігалось статистично достовірне зростання цього показника в 1,8 разів у порівнянні із контролем клітин (рис. 4.11 А).

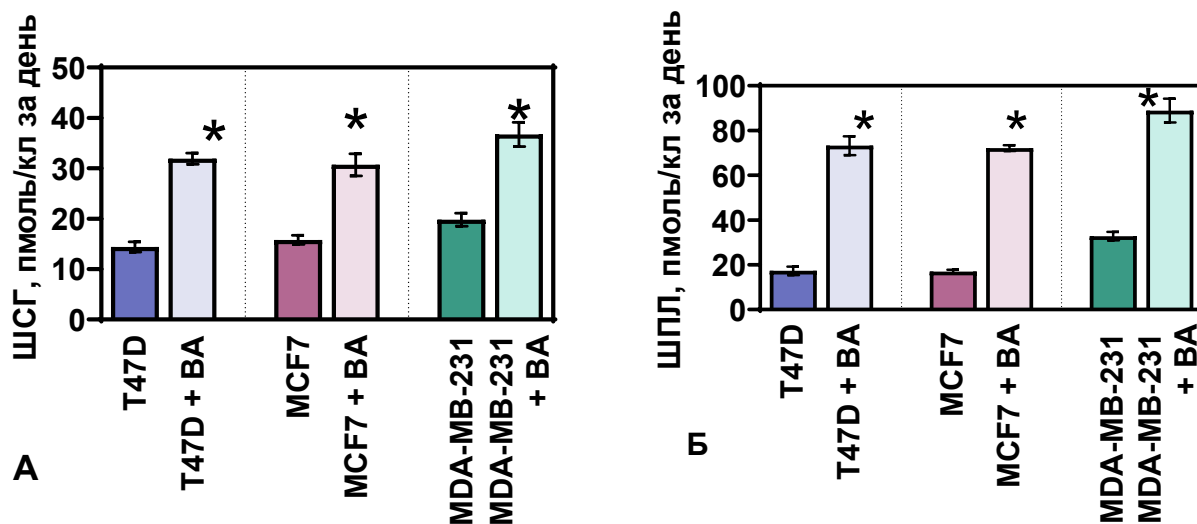


Рис. 4.11 Швидкість споживання глюкози (А) та продукції лактату (Б) клітинами РМЗ людини різних молекулярних підтипів після співкультивування із *B. animalis* протягом 72 годин. +BA – клітини РМЗ інкубували з *B. animalis* у співвідношенні еукаріотичні/бактеріальні клітини 1/400. * $p < 0,05$ статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами.

В клітинах лінії T47D під впливом *B. animalis* ШПЛ статистично достовірно зростає у 4,3 рази в порівнянні із контролем клітин (рис. 4.11 Б). В клітинах лінії MCF-7, які культивували в присутності біфідобактерій, ШПЛ статистично достовірно зростає у 4,2 рази відносно інтактних клітин цієї лінії (рис. 4.11 Б). Експозиція клітин MDA-MB-231 з *B. animalis* протягом 72 годин призвела до підвищення ШПЛ пухлинними клітинами в 2,7 разів у порівнянні з контрольними клітинами (рис. 4.11 Б).

Результати проведених досліджень виявили, що співкультивування клітин лінії T47D з *B. animalis* протягом 72 годин супроводжувалось статистично достовірним збільшенням активності ЛДГ в клітинах на 88,7% відносно інтактного контролю. В клітинах MCF-7 оброблених біфідобактеріями спостерігали статистично значуще підвищення активності ЛДГ на 32% в порівнянні з контрольними клітинами. В клітинах лінії MDA-MB-231 після їх експозиції з *B. animalis* досліджуваний показник суттєво не змінювався (рис. 4.12).

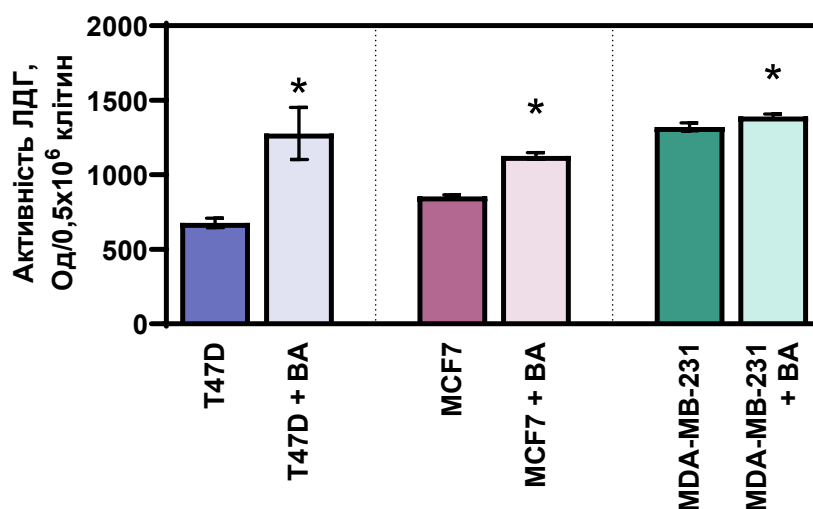


Рис. 4.12 Зміна активності лактатдегідрогенази в клітинах РМЗ людини різних молекулярних підтипів після співкультивування з *B. animalis* протягом 72 годин. +ВА – клітини РМЗ інкубували з *B. animalis* у співвідношенні еукаріотичні/бактеріальні клітини 1/400. * $p < 0,05$ статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами.

У клітинах ліній MCF-7 та MDA-MB-231 після їх експозиції з *B. animalis* спостерігалось статистично достовірне зниження активності Г6ФД у порівнянні з відповідними інтактними клітинами. Зокрема, в клітинах лінії MCF-7 активність Г6ФД зменшилась у 2 рази, тоді як в клітинах MDA-MB-231 – в 7,5 разів. У клітинах лінії T47D оброблених біфідобактеріями відмічали збільшення активності Г6ФД в 1,7 рази відносно контролю клітин (рис. 4.13).

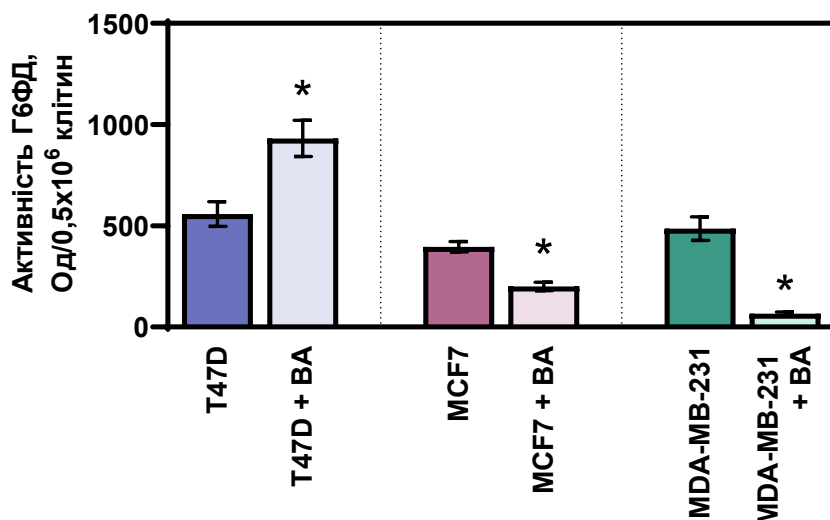


Рис. 4.13 Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в клітинах РМЗ людини різних молекулярних підтипів після співкультивування із *B. animalis* протягом 72 годин. +ВА – клітини РМЗ інкубували з *B. animalis* у співвідношенні еукаріотичні/бактеріальні клітини 1/400. * $p < 0,05$ статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами.

Отримані результати підтверджують, що оброблені *B. animalis* клітини РМЗ, які будуть використані в подальшому для дослідження ефектів модифікаторів гліколізу, характеризуються зсувом метаболічного профілю в бік посилення гліколізу. При цьому найбільш суттєвих змін зазнає метаболічний фенотип клітин РМЗ люмінального підтипу, вірогідно тому, що вихідні клітини MDA-MB-231 вже віддають перевагу гліколітичному шляху метаболізму глюкози [97]. У цьому контексті важливо оцінити, як взаємодія між *B. animalis* і клітинами РМЗ може впливати на ефективність інгібіторів гліколізу, наприклад 2-DG. В експерименті оцінювали вплив 2-DG на життєздатність, дихальну і метаболічну активність вихідних і оброблених *B. animalis* клітин РМЗ.

Інгібітор гліколізу 2-дезоксиглюкоза (2-DG) – структурний аналог глюкози, що після фосфорилування до 2-дезоксиглюкози-6-фосфату, блокує подальші етапи гліколітичного шляху метаболізму глюкози. Життєздатність клітин вимірювали в тесті з кристалічним фіолетовим і трипановим синім.

Результати отримані в тесті з кристалічним фіолетовим показали, що серед вихідних клітин найбільш чутливими до дії 2-DG є клітини базального підтипу лінії MDA-MB-231, що характеризуються найвищою швидкістю споживання глюкози, яку вони метаболізують переважно шляхом гліколізу. Було встановлено, що IC_{50} для 2-DG на T47D і MCF-7 становить $35,0 \pm 3,2$ ммоль і $5,0 \pm 0,4$ ммоль, відповідно. Для клітин MDA-MB-231 IC_{50} для 2-DG дорівнює $0,7 \pm 0,02$ ммоль (рис. 4.14).

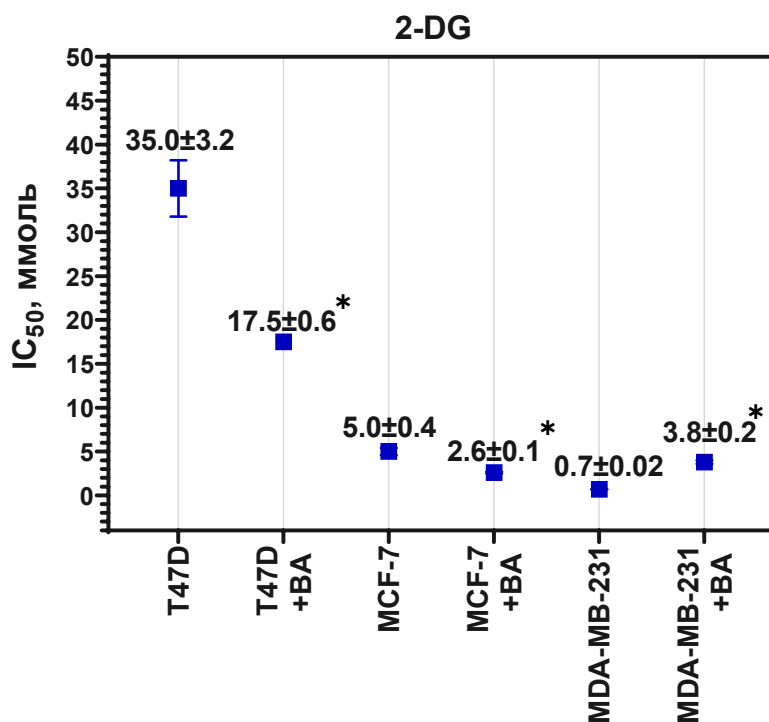


Рис. 4.14 Зміни чутливості клітин РМЗ різних молекулярних підтипів до 2-деоксиглюкози після співкультивування із *B. animalis*. IC_{50} – індекс цитотоксичності; * $p < 0,05$ статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами.

Співкультивування клітин РМЗ люмінального підтипу з *B. animalis* призводило до посилення цитотоксичної/цитостатичної дії 2-DG, про що свідчить зниження IC_{50} для клітин T47D і MCF-7 у 2 рази в порівнянні з вихідними клітинами. Разом з тим, в клітинах MDA-MB-231 оброблених *B. animalis* відмічали значне зниження чутливості до дії 2-DG – показник IC_{50} був більше відносно вихідних клітин у 5,5 разів (рис. 4.15).

В тесті з трипановим синім було підтверджено описані вище зміни чутливості клітин РМЗ різних молекулярних підтипів до цитотоксичного впливу 2-DG. Було показано, що в клітинах люмінального підтипу *B. animalis* потенціюють цитотоксичну дію 2-DG, а обрані концентрації 2-DG пригнічують життєздатність вихідних клітин ліній T47D і MCF-7 на 49 і 67%, відповідно, в порівнянні з контролем клітин (рис. 4.15 А-Б).

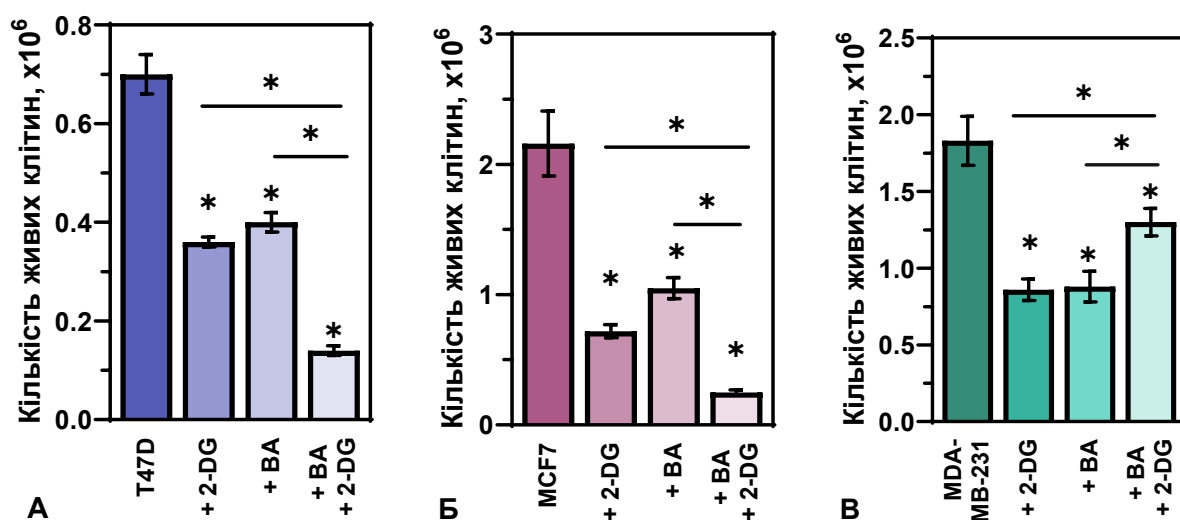


Рис. 4.15 Життєздатність інтактних і оброблених *B. animalis* клітин РМЗ ліній T47D (А), MCF7 (Б) та MDA-MB-231 (В) після їх експозиції з 2-DG. Кількість живих клітин визначали в тесті з трипановим синім. +2-DG – інтактні клітини оброблені 2-DG; +BA – клітини оброблені *B. animalis*; +2-DG +BA – клітини оброблені *B. animalis* і 2-DG. * – $p < 0,05$ статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами; * – $p < 0,05$ статистично достовірна різниця між експериментальними групами $p < 0,05$.

В клітинах оброблених *B. animalis* внаслідок впливу 2-DG кількість живих клітин РМЗ люмінального підтипу T47D і MCF-7 зменшилась на 80% і 88,4% в порівнянні з контролем клітин. В клітинах MDA-MB-231 оброблених *B. animalis* відмічали пригнічення цитотоксичної активності 2-DG (рис. 4.15 В).

Дихальну активність вихідних і оброблених *B. animalis* клітин РМЗ визначали в МТТ-тесті. Отримані результати свідчать, що в клітинах Т47D і MCF-7 оброблених *B. animalis* під дією 2-DG мітохондріальна дихальна активність посилюється в середньому на 10% в порівнянні з інтактними клітинами (табл.4.5).

Таблиця 4.5

Дихальна активність інтактних та оброблених *B. animalis* клітин РМЗ різних молекулярних підтипів після експозиції з 2-DG

Умови експерименту	Дихальна активність,% [#]
T47D (+40 ммоль 2-DG)	60,5±1,8
T47D (+40 ммоль 2-DG) + <i>B.animalis</i>	76,4±2,1
T47D (+20 ммоль 2-DG)	97,1±2,9
T47D (+20 ммоль 2-DG) + <i>B.animalis</i>	112,4±3,5
T47D (+5 ммоль 2-DG)	110,2±6,3
T47D (+5 ммоль 2-DG) + <i>B.animalis</i>	119,2±3,2
MCF-7 (+5 ммоль 2-DG)	58,0±1,9
MCF-7 (+5 ммоль 2-DG) + <i>B.animalis</i>	74,9 ± 1,5
MCF-7 (+2,5 ммоль 2-DG)	80,6±2,1
MCF-7 (+2,5 ммоль 2-DG) + <i>B.animalis</i>	95,3 ±2,6
MCF-7 (+1,0 ммоль 2-DG)	108,1 ± 2,2
MCF-7 (+1,0 ммоль 2-DG) + <i>B.animalis</i>	122,9 ±1,7
MDA-MB-231 (+5 ммоль 2-DG)	59,6 ± 1,4
MDA-MB-231 (+5 ммоль 2-DG) + <i>B.animalis</i>	68,3 ± 1,2
MDA-MB-231 (+2 ммоль 2-DG)	71,9 ±1,0
MDA-MB-231 (+2 ммоль 2-DG) + <i>B.animalis</i>	94,5 ± 2,1
MDA-MB-231 (+0,5 ммоль 2-DG)	113,3±3,6
MDA-MB-231 (+0,5 ммоль 2-DG) + <i>B.animalis</i>	124,3 ± 1,4

- дихальна активність відносно контролю клітин (100%) без 2-DG та *B. animalis*

Інгібуючі ефекти 2-DG в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів досліджували шляхом визначення ШСГ і ШПЛ у вихідних і оброблених *B. animalis* пухлинних клітинах (рис. 4.16).

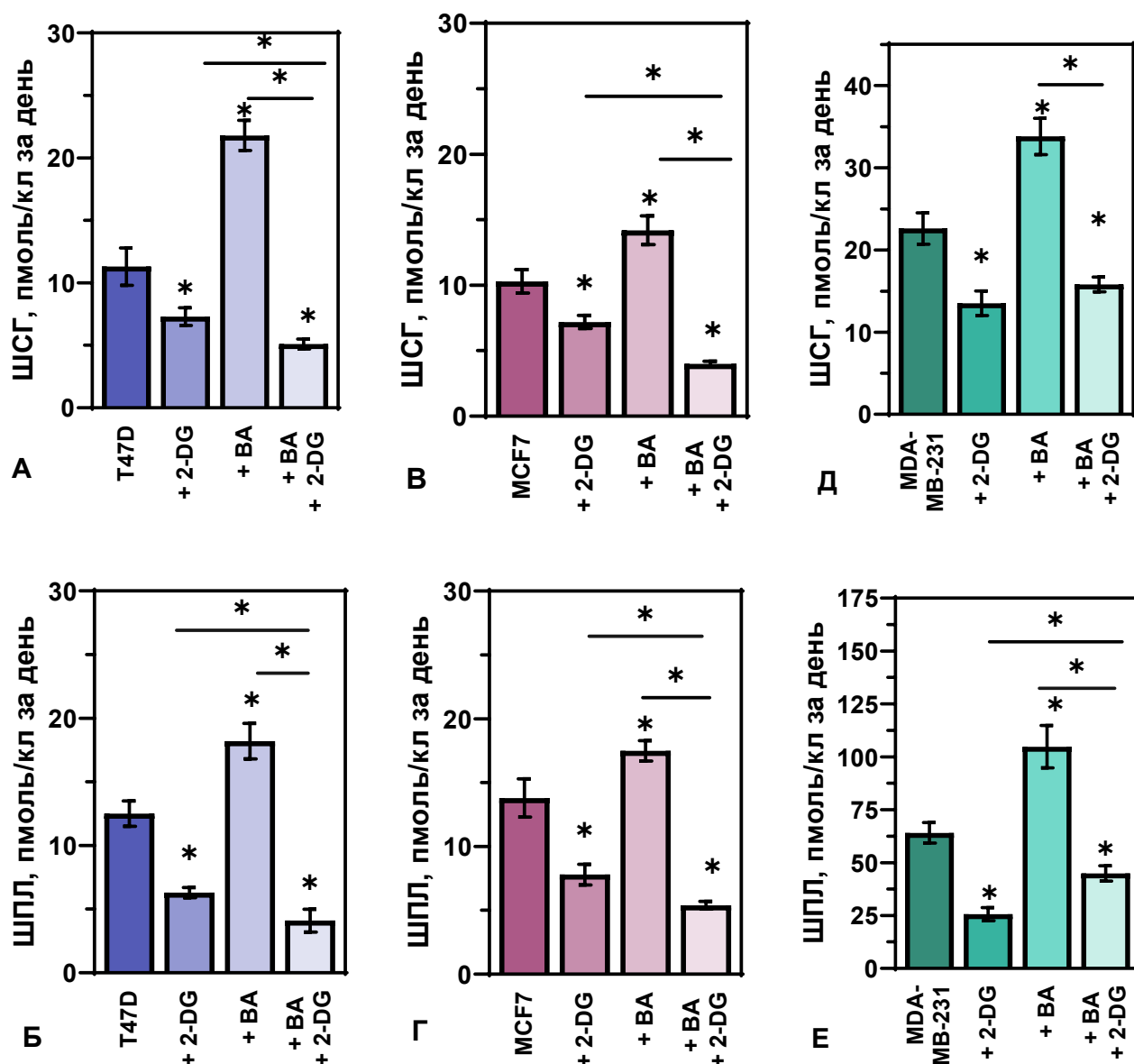


Рис. 4.16 Зміни метаболічного профілю інтактних і оброблених *B. animalis* клітин РМЗ після їх експозиції з метформіном: А, В, Д – швидкість споживання глюкози; Б, Г, Е – швидкість продукції лактату; +2-DG – інтактні клітини оброблені 2-DG; +BA – клітини оброблені *B. animalis*; +2-DG+BA – клітини оброблені *B. animalis* і 2-DG. * – $p < 0,05$ статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами; * – $p < 0,05$ статистично достовірна різниця між експериментальними групами $p < 0,05$.

В інтактних клітинах T47D 2-DG спричиняла зниження ШСГ на 35% (рис. 4.16 А), а ШПЛ на 49,6% відносно контрольних клітин (рис. 4.16 Б). В оброблених *B. animalis* клітинах лінії T47D показники ШСГ знижувались на 55%, а ШПЛ на 67%, в порівнянні з контролем клітин (рис. 4.16 А-Б).

Обробка вихідних клітин MCF-7 2-DG призводила до зниження ШСГ на 30% і ШПЛ на 43,5%, відносно контролю. В результаті впливу *B. animalis* на ці клітини спостерігали зниження ШСГ і ШПЛ на 61% відносно контролю клітин (рис. 4.16 В-Г).

Зниження чутливості клітин MDA-MB-231 до цитотоксичного впливу 2-DG після експозиції клітин з *B. animalis* корелює зі змінами їх метаболічної активності. Було показано, що обробка інтактних клітин лінії MDA-MB-231 2-DG призводить до пригнічення ШСГ на 40%, а ШПЛ на 60% відносно контролю клітин (рис. 4.16 Д-Е). Співкультивування MDA-MB-231 з *B. animalis* викликало зниження ШСГ і ШПЛ лише на 30% в порівнянні з контрольними клітинами (рис. 4.16 Д-Е).

Отримані результати свідчать про посилення антигліколітичної дії 2-DG в клітинах РМЗ люмінального підтипу на тлі бактеріального модуляторного ефекту. Попередня експозиція клітин РМЗ з *B. animalis* змінює чутливість клітин до цитотоксичних і метаболічних ефектів інгібітора гліколізу 2-DG залежно від вихідних біологічних характеристик клітинної лінії. В клітинах РМЗ люмінального підтипу після співкультивування з бактеріями виявлено посилення цитотоксичного ефекту 2-DG, що супроводжується метаболічними зсувами у вигляді зниження ШСГ, ШПЛ та посилення дихальної активності клітин.

На цьому етапі роботи також досліджували вплив метформіну на виживаність і деякі ланки гліколізу в клітинах РМЗ після їх співкультивування з *B. animalis*. Сьогодні метформін є одним із найбільш відомих і безпечних регуляторів метаболізму глюкози, який може діяти як терапевтичний засіб проти РМЗ змінюючи метаболізм злоякісних клітин [141].

Вплив метформіну на життєздатність вихідних і оброблених *B. animalis* клітин РМЗ різних молекулярних підтипів аналізували в тесті з кристалічним фіолетовим і трипановим синім. Було показано, що серед вихідних клітин найбільш

чутливими до дії метформіну були клітини ліній MCF-7 і MDA-MB-231, що характеризуються високою проліферативною активністю. Встановлено, що IC_{50} для метформіну на клітинах MCF-7 і MDA-MB-231 становить $8,9 \pm 1,0$ ммоль і $10,7 \pm 1,0$ ммоль, відповідно. Для T47D IC_{50} метформіну дорівнює $47,5 \pm 2,8$ ммоль (рис. 4.17).

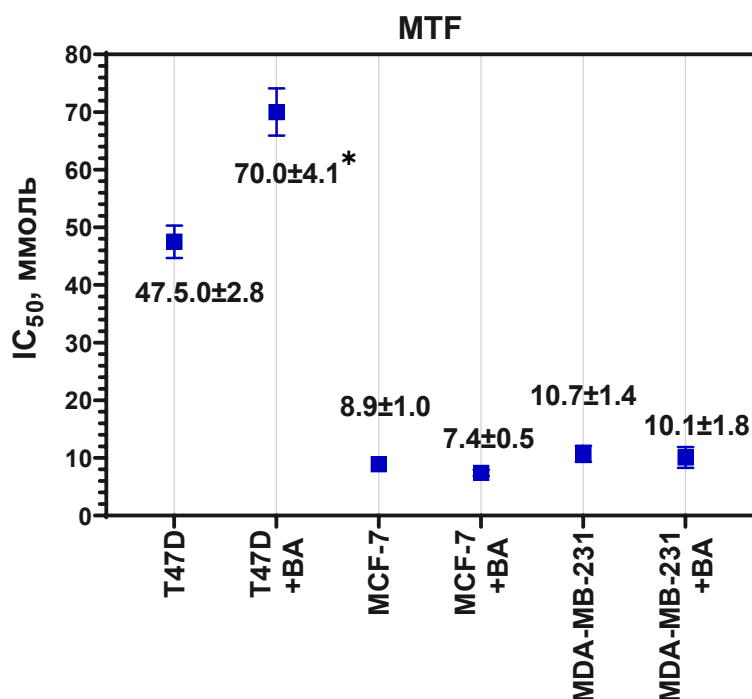


Рис. 4.17 Зміни чутливості клітин РМЗ різних молекулярних підтипів до метформіну після співкультивування із *B. animalis*. IC_{50} – індекс цитотоксичності; * $p < 0,05$ статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами.

Аналіз IC_{50} для метформіну на клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів оброблених *B. animalis* показав, що чутливість клітин T47D до антипроліферативного впливу метформіну знижується внаслідок їх співкультивування з *B. animalis* і IC_{50} становить $70,0 \pm 4,1$ ммоль (рис. 4.17). Експозиція клітин MCF-7 з *B. animalis* призводила до посилення антипроліферативної дії метформіну, про що свідчить зниження IC_{50} для клітин MCF-7 на 17% в порівнянні з вихідними клітинами (рис. 4.17). В клітинах MDA-MB-231 оброблених *B. animalis* різниці показника IC_{50} для метформіну в порівнянні з вихідними клітинами не спостерігали (рис. 4.17).

Подібний вплив метформіну на життєздатність клітин РМЗ виявляли також в тесті з трипановим синім. Результати аналізу життєздатності інтактних і оброблених *B. animalis* клітин РМЗ після їх експозиції з метформіном свідчать, що комплексна обробка клітин Т47D інгібує антипроліферативні ефекти *B. animalis* і метформіну, які проявляються у монорежимі (рис. 4.18 А).

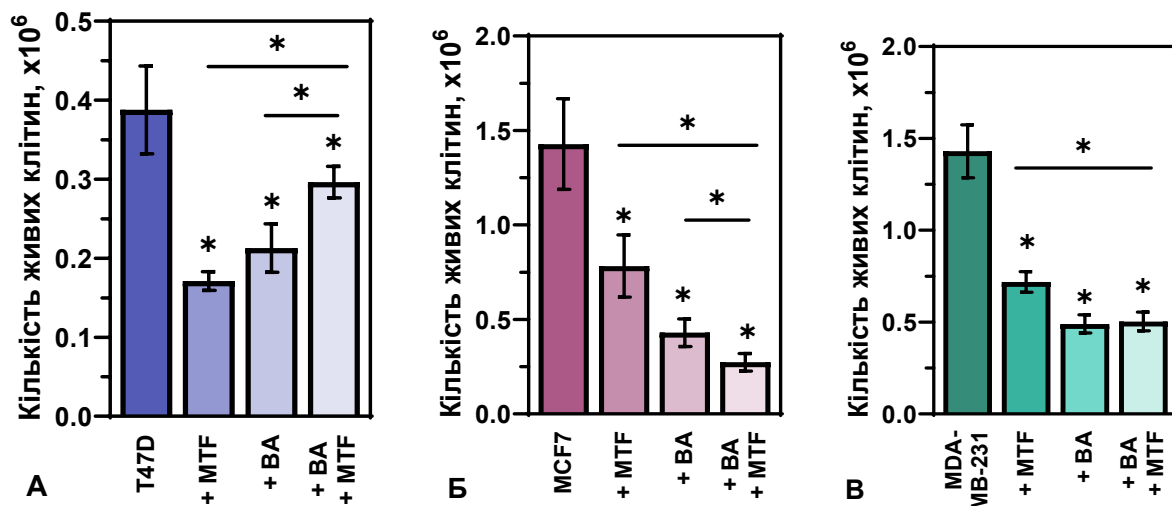


Рис. 4.18 Життєздатність інтактних і оброблених *B. animalis* клітин РМЗ ліній Т47D (А), МСF7 (Б) та МDА-МВ-231 (В) після їх експозиції з метформіном. Кількість живих клітин визначали в тесті з трипановим синім. +MTF – інтактні клітини оброблені метформіном; +BA – клітини оброблені *B. animalis*; +MTF+BA – клітини оброблені *B. animalis* і метформіном. * – $p < 0,05$ статистично достовірною різницею порівняно з інтактними клітинами; * – $p < 0,05$ статистично достовірною різницею між експериментальними групами $p < 0,05$.

В клітинах МDА-МВ-231 оброблених обома агентами не виявляли статистично достовірної різниці показника виживаності в порівнянні з клітинами, які культивували тільки з метформіном або *B. animalis* (рис. 4.18 В). Лише в клітинах МСF-7 оброблених *B. animalis* виявляли статистично значуще посилення антипроліферативної дії метформіну в порівнянні з клітинами, які інкубували з метформіном або *B. animalis* окремо (рис. 4.18 Б).

В клітинах T47D статистично достовірне збільшення ШСГ спостерігали у всіх експериментальних групах (рис. 4.19 А).

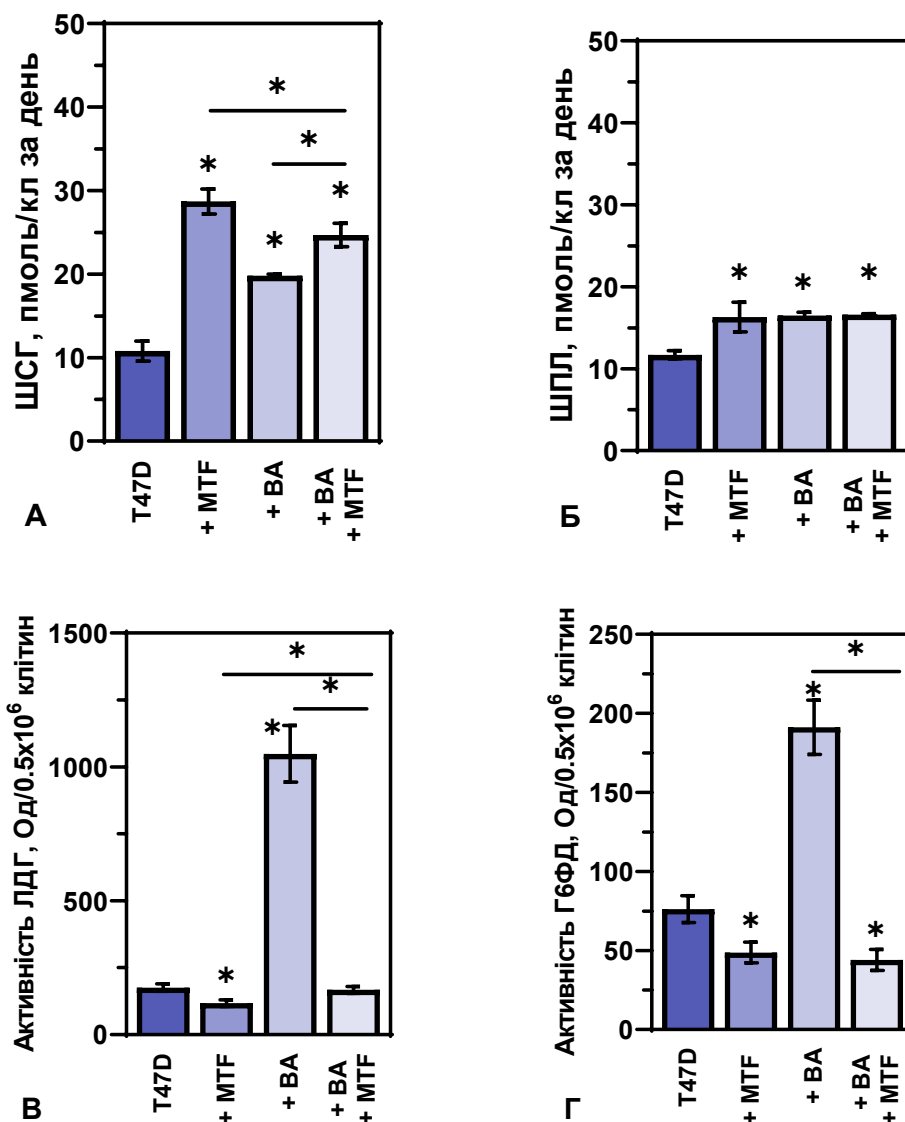


Рис. 4.19 Зміни метаболічного профілю інтактних і оброблених *B. animalis* клітин РМЗ лінії T47D після їх експозиції з метформіном: А – швидкість споживання глюкози; Б – швидкість продукції лактату; В – активність ЛДГ; Г – активність Г6ФД. +MTF – інтактні клітини оброблені метформіном; +BA – клітини оброблені *B. animalis*; +MTF+BA – клітини оброблені *B. animalis* і метформіном. * – $p < 0,05$ статистично достовірною різницею порівняно з інтактними клітинами; * – $p < 0,05$ статистично достовірною різницею між експериментальними групами $p < 0,05$.

В групі де клітини культивували лише в присутності метформіну ШСГ зростала у 2,7 рази, в групі клітин, які зазнавали впливу лише *B. animalis* цей показник зростав на в 1,8 разів в порівнянні з інтактними клітинами (рис. 4.20 А). В клітинах Т47D, які зазнали впливу обох агентів, ШСГ збільшувалась у 2,3 рази в порівнянні з контролем клітин (рис. 4.19 А).

ШПЛ також статистично достовірно зростала в усіх експериментальних групах. При цьому, зміни ШПЛ в цих клітинах були подібними і показник збільшився у 1,4-1,5 разів в порівнянні з контролем клітин (рис. 4.19 Б).

Разом з тим, в оброблених *B. animalis* клітинах Т47D виявляється значна різниця у активності ферментів. Було показано, статистично достовірне збільшення активності ЛДГ у 6 разів і Г6ФД у 2,5 разів в порівнянні з інтактними клітинами (рис. 4.19 В-Г). В клітинах Т47D, які культивували в присутності метформіну, як активність ЛДГ так і Г6ФД знижувалась у 1,5 і 1,6 разів, відповідно, в порівнянні з контролем клітин. Комплексна обробка клітин Т47D бактеріями і метформіном призводила до статистично значущого зниження активності Г6ФД в 1,7 разів і не впливала на активність ЛДГ (рис. 4.19 В-Г).

Отримані результати змін деяких показників гліколізу в інтактних і оброблених *B. animalis* клітинах MCF-7 після їх експозиції з метформіном, свідчать, що статистично достовірні зміни ШСГ і ШПЛ виявляли лише в тих клітинах, які обробляли метформіном. Було встановлено, що в інтактних клітинах MCF-7, які культивували в присутності метформіну ШСГ збільшується у 1,6 рази, а в оброблених *B. animalis* клітинах у 2,8 рази в порівнянні з інтактним контролем. Подібні зміни ШПЛ спостерігали в клітинах MCF-7. Обробка інтактних клітин метформіном призводила до збільшення ШПЛ у 2,3 рази, в клітинах, які зазнавали комплексного впливу обох агентів ШПЛ підвищилась у 2,5 рази відносно контролю клітин (рис. 4.20).

Статистично достовірне підвищення активності ЛДГ відмічали лише в тих клітинах, які культивували в присутності *B. animalis* і метформіну. Було встановлено збільшення активності ферменту в 1,6 рази відносно контролю клітин (рис. 4.20 В). В той же час, обробка бактеріями впливала на зміну активності Г6ФД

в клітинах лінії MCF-7. Адже лише в цих експериментальних групах, статистично значуще знижувалась активність цього ферменту – в 1,3 рази в оброблених *B. animalis* клітинах і в 1,4 рази після впливу обох агентів. (рис. 4.20 Г).

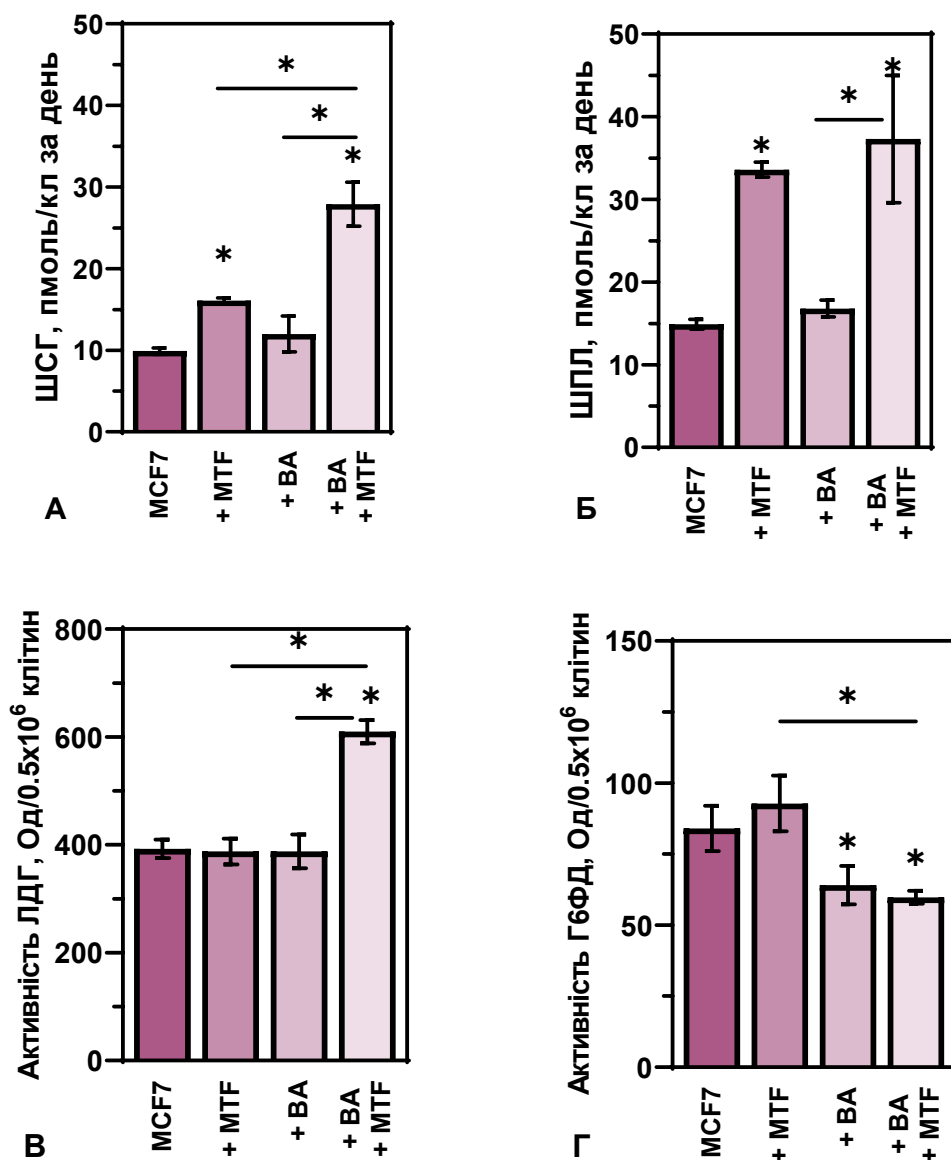


Рис. 4.20 Зміни метаболічного профілю інтактних і оброблених *B. animalis* клітин РМЗ лінії MCF-7 після їх експозиції з метформіном: А – швидкість споживання глюкози; Б – швидкість продукції лактату; В – активність ЛДГ; Г – активність Г6ФД. +MTF – інтактні клітини оброблені метформіном; +BA – клітини оброблені *B. animalis*; +MTF+BA – клітини оброблені *B. animalis* і метформіном. *

– $p < 0,05$ статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами; * – $p < 0,05$ статистично достовірна різниця між експериментальними групами $p < 0,05$.

Аналіз змін ШСГ клітинами MDA-MB-231 показав статистично достовірне збільшення цього показника у всіх експериментальних групах (рис. 4.21 А).

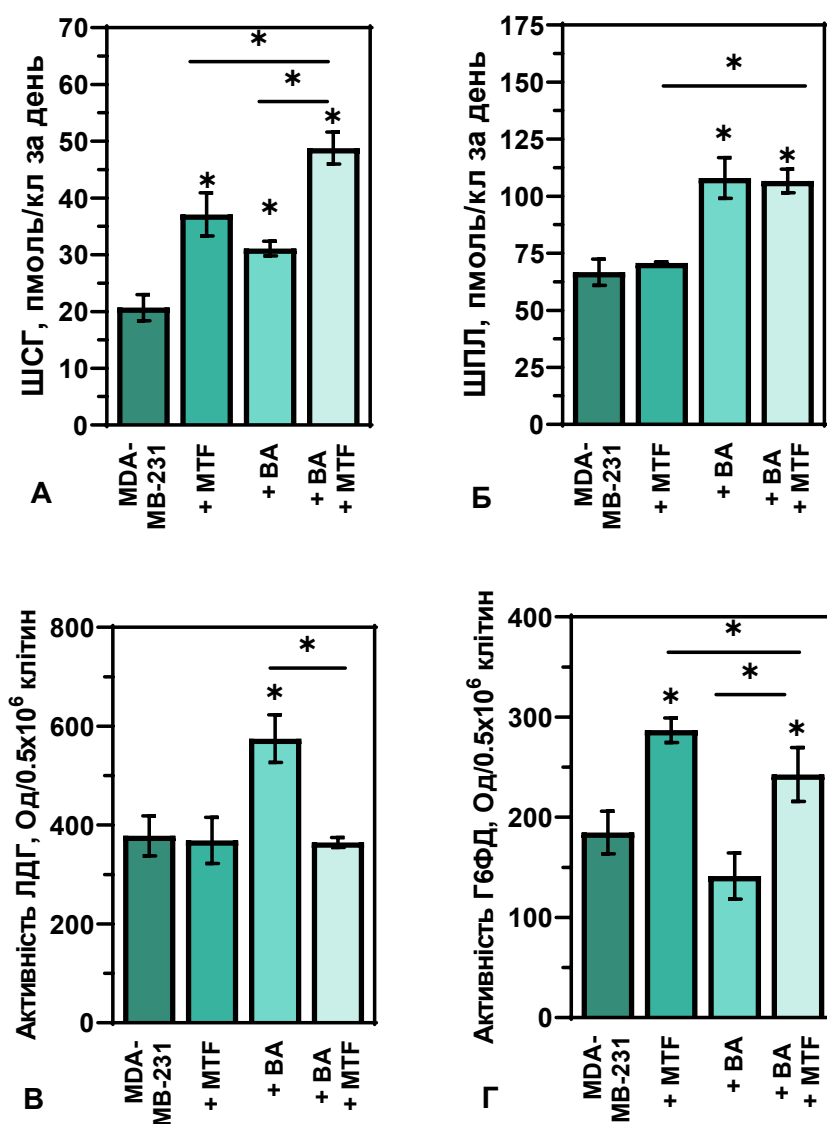


Рис. 4.21 Зміни метаболічного профілю інтактних і оброблених *B. animalis* клітин РМЗ лінії MDA-MB-231 після їх експозиції з метформіном: А – швидкість споживання глюкози; Б – швидкість продукції лактату; В – активність ЛДГ; Г – активність Г6ФД. +MTF – інтактні клітини оброблені метформіном; +BA – клітини оброблені *B. animalis*; +MTF+BA – клітини оброблені *B. animalis* і метформіном. *

– $p < 0,05$ статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами; * – $p < 0,05$ статистично достовірна різниця між експериментальними групами $p < 0,05$.

Зокрема, в клітинах MDA-MB-231 оброблених *B. animalis* спостерігали збільшення ШСГ в 1,5 рази, тоді як в клітинах, які зазнали впливу метформіну показник збільшився у 1,8 разів в порівнянні з інтактними клітинами. За умов комплексної обробки клітин MDA-MB-231 обома агентами виявляли збільшення ШСГ у 2,4 рази відносно контролю клітин.

Слід відмітити, що ШПЛ статистично значуще зростала в тих клітинах, які обробляли лише *B. animalis* або обома агентами (рис. 4.21 Б). В цих групах ШПЛ збільшувалась в 1,6 рази в порівнянні з контролем клітин. При цьому статистично достовірне збільшення активності ЛДГ відмічали лише в оброблених *B. animalis* клітинах MDA-MB-231 (рис. 4.21 В).

Статистично значущі зміни активності Г6ФД виявляли в інтактних або оброблених *B. animalis* клітинах, які культивували в присутності метформіну. В цих клітинах спостерігали збільшення активності ферменту у 1,5 і 1,3 рази в порівнянні з контрольними клітинами (рис. 4.21 Г).

Отримані результати свідчать, що метформін в клітинах РМЗ активує гліколіз, однак в клітинах базального підтипу MDA-MB-231 спрямовує метаболізм глюкози у бік посилення пентозофосфатного шляху. При комплексній дії біфідобактерій і метформіну відбувається репрограмування метаболічної активності пухлинних клітин залежно від їх молекулярного підтипу і вихідних характеристик метаболічного профілю. Було встановлено, що в клітинах MCF-7 спостерігається посилення гліколізу, причому це синергічний ефект двох досліджених агентів. В клітинах T47D та MDA-MB-231 наявне посилення гліколізу лише в напрямку пентозофосфатного шляху, і при цьому фіксується адитивний ефект дії двох агентів на метаболічні показники.

4.6. Модифікуючий вплив *B. animalis* на чутливість клітин РМЗ різних молекулярних підтипів до цитотоксичної дії паклітакселу

Метаболічний профіль пухлинних клітин є важливою складовою при розробці ефективної схеми терапії, оскільки злоякісно трансформовані клітини характеризуються значною метаболічною пластичністю, що дозволяє їм вдало уникати цитотоксичного/цитостатичного впливу протипухлинних препаратів [142]. Паклітаксел – протипухлинний препарат, який включено до терапевтичних схем РМЗ [143,144]. Вважається, що механізм, за допомогою якого Паклітаксел впливає на життєздатність злоякісних клітин реалізується шляхом гіперстабілізації мікротрубочок, що призводить до інгібування реструктуризації цитоскелета і накопичення хромосомної нестабільності [145]. Окрім того, Паклітаксел може збільшити виробництво гідропероксиду, викликаючи окислювальний стрес в злоякісних клітинах [146]. Паклітаксел також впливає на процеси енергетичного обміну в клітинах РМЗ, про що свідчить змінений спектр ключових метаболітів таких шляхів, як анаеробний гліколіз, глюконеогенез та гліцерол-фосфатний шунт [147].

Враховуючи здатність *B. animalis* модифікувати процеси метаболізму глюкози в клітинах РМЗ, особливо люмінального підтипу, вірогідність, що ці мікроорганізми можуть модифікувати чутливість пухлинних клітин до цитотоксичного впливу паклітакселу суттєво зростає. З огляду на різноспрямовані ефекти *B. animalis*, залежно від молекулярного підтипу і вихідного метаболічного фенотипу клітин, аналіз змін життєздатності та метаболічного профілю клітин РМЗ після дії *B. animalis* та паклітакселу є важливим кроком до розуміння модифікуючої ролі мікробіоти у формуванні терапевтичної чутливості пухлинних клітин.

Клітини РМЗ інкубували з *B. animalis* протягом 72 годин у стандартних умовах. Далі бактерії видаляли і вносили в культуру паклітаксел (РТХ). Було встановлено, що співкультивування клітин РМЗ люмінального підтипу ліній T47D та MCF-7 з *B. animalis* не підвищувало їх чутливість до цитотоксичної дії паклітакселу. Однак, статистично достовірна різниця кількості живих клітин у всіх

експериментальних групах в порівнянні з контролем клітин або між собою свідчить, що *B. animalis* суттєво впливають на біологію пухлинної клітини в цілому, змінюючи їх реакцію на цитотоксичний/цитостатичний вплив протипухлинного препарату (рис. 4.22), однак, механізми таких змін потребують подальшого дослідження.

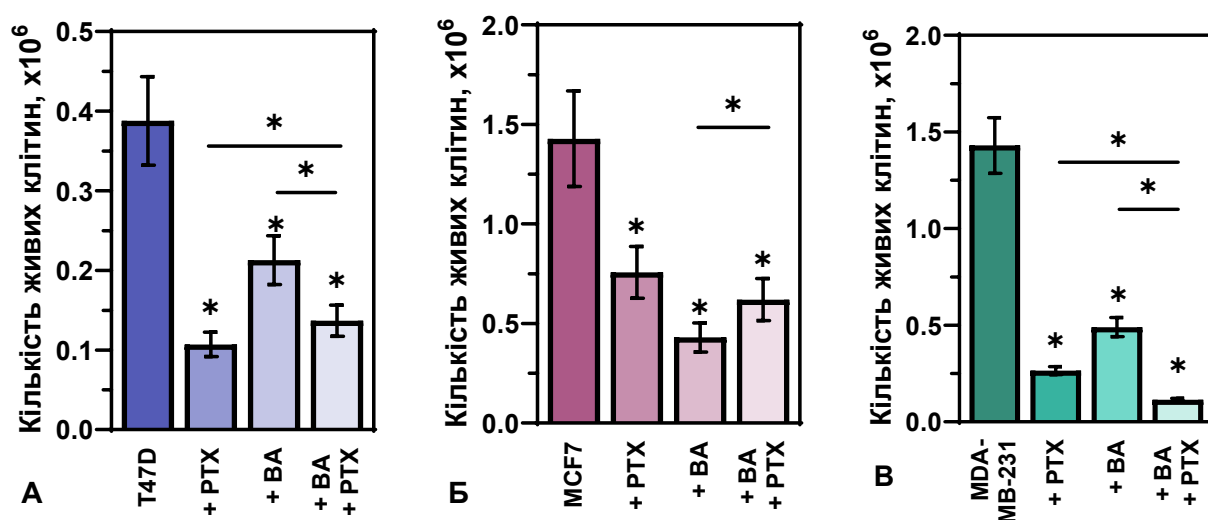


Рис. 4.22 Життєздатність вихідних і оброблених *B. animalis* клітин РМЗ ліній Т47D (А), МСF-7 (Б) та МDА-МВ-231 (В) після інкубації з паклітакселом протягом 48 годин. Кількість живих і клітин визначали в тесті з трипановим синім. +РТХ – інтактні клітини оброблені паклітакселом; +ВА – клітини оброблені *B. animalis* без паклітакселу; +РТХ+ВА – клітини оброблені *B. animalis* і паклітакселом. * – $p < 0,05$ статистично достовірна різниця порівняно з інтактним контролем клітин; * – $p < 0,05$ статистично достовірна різниця між зазначеними експериментальними групами $p < 0,05$.

Послідовна обробка клітин базального підтипу лінії МDА-МВ-231 (рис. 4.22 В) *B. animalis* і паклітакселом посилювала цитотоксичний/цитостатичний вплив цих агентів на клітини РМЗ в порівнянні з дією цитостатику або біфідобактерій окремо. Відмічали статистично значуще пригнічення життєздатності клітин МDА-МВ-231 на 82% після їх обробки паклітакселом і на 66% після їх співкультивування з *B. animalis*, в порівнянні з контрольними клітинами. Комплексна послідовна

обробка цих клітин пробіотиками, а потім паклітакселом супроводжувалась зниженням їх життєздатності на 92,3% відносно інтактних клітин.

З метою пошуку можливих метаболічних механізмів, які могли би пояснити описані вище результати ми дослідили деякі ланки метаболізму глюкози в клітинах РМЗ, які зазнали впливу обох агентів. Визначали ШСГ, ШПЛ, активність ЛДГ і Г6ФД в клітинах РМЗ всіх трьох ліній.

Було показано, що обробка клітин T47D *B. animalis* та паклітакселом окремо і в комплексі призводила до статистично достовірного зростання ШСГ цими клітинами (рис. 4.23 А).

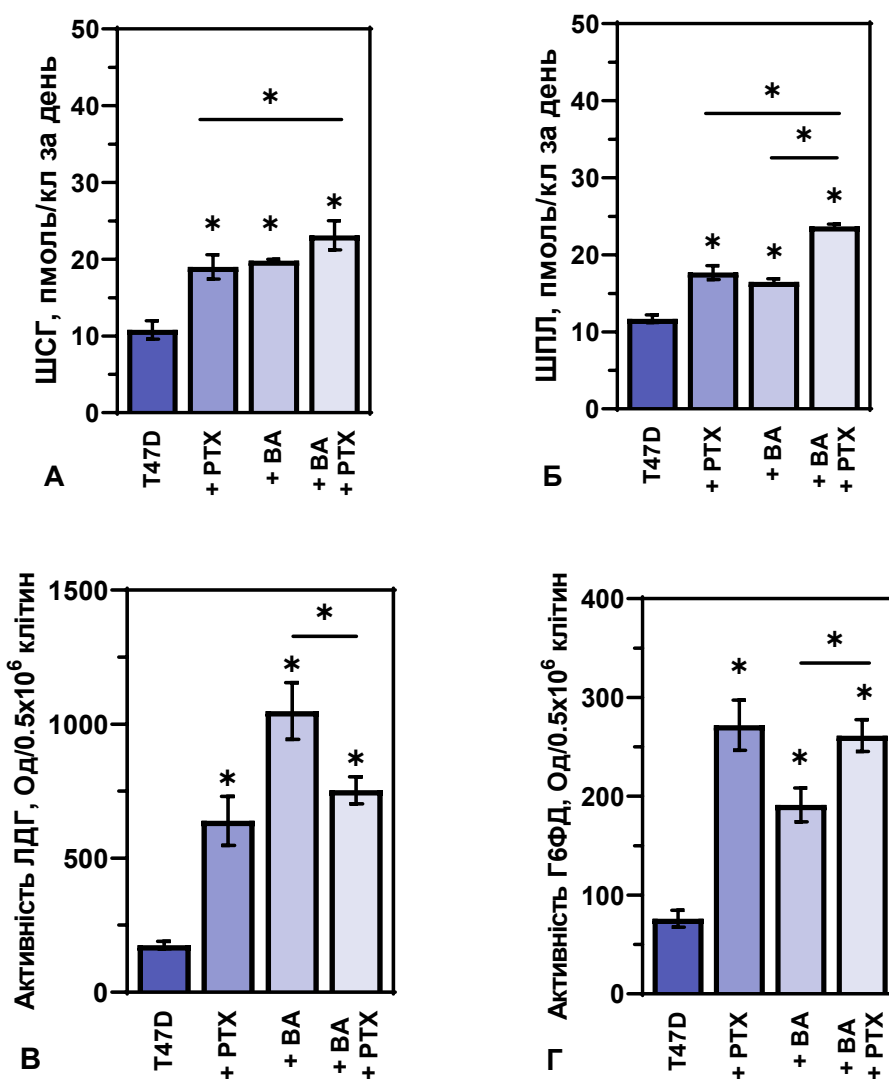


Рис. 4.23 Зміни метаболічного профілю вихідних і оброблених *B. animalis* клітин РМЗ лінії T47D через 48 годин їх культивування з паклітакселом: А –

швидкість споживання глюкози; Б – швидкість продукції лактату; В – активність ЛДГ; Г – активність Г6ФД. +РТХ – інтактні клітини оброблені паклітакселом; +ВА – клітини оброблені *B. animalis* без паклітакселу; +РТХ+ВА – клітини оброблені *B. animalis* та паклітакселом. * – $p < 0,05$ статистично достовірна різниця порівняно з інтактним контролем клітин; * – $p < 0,05$ статистично достовірна різниця між двома зазначеними експериментальними групами $p < 0,05$.

Так, в групі клітин T47D + *B. animalis* ШСГ збільшилась у 1,8 рази, в групі T47D + паклітаксел в 1,8 рази, тоді як в групі клітин, які зазнали комплексного впливу бактерій та хіміопрепарату – в 2,1 рази.

Крім того, на фоні зростання ШСГ в клітинах T47D спостерігали також збільшення ШПЛ (рис. 4.23 Б). В клітинах, які були оброблені лише бактеріями, цей показник зростав у 1,4 рази, тоді як в клітинах оброблених лише паклітакселом ШПЛ зростала в 1,5 рази відносно інтактного контролю клітин. Разом з тим, в клітинах які зазнали впливу як *B. animalis*, так і паклітакселу, ШПЛ статистично достовірно збільшилась в 2,03 рази в порівнянні з контролем.

Також, в клітинах T47D, оброблених досліджуваними агентами, відбулися значні і статистично значущі зміни активності ферментів, пов'язаних з метаболізмом глюкози. Зокрема, в групі T47D + *B. animalis* активність ЛДГ зростала найбільше (в 5,95 разів) (рис. 4.23 В). В клітинах, які були оброблені лише Паклітакселом, спостерігали підвищення активності ЛДГ у 3,6 рази, тоді як в клітинах, які зазнавали комплексного впливу активність ЛДГ підвищувалась у 4,3 рази в порівнянні з інтактним контролем.

Обробка клітин T47D досліджуваними агентами призводила також до статистично значущого збільшення активності Г6ФД (рис. 4.23 Г). Подібні зміни цього показника спостерігали в групах клітин, оброблених лише паклітакселом або комплексом агентів – активність Г6ФД збільшилась в 3,6 і 3,4 рази, відповідно, у порівнянні з інтактним контролем. В клітинах T47D оброблених лише *B. animalis* спостерігали посилення активності цього ферменту у 2,5 рази відносно контролю клітин.

Зміни метаболічного профілю клітин люмінального підтипу лінії MCF-7 після їх співкультивування з *B. animalis* і подальшої інкубації з паклітакселом дещо відрізняються від ефектів виявлених для клітин T47D (рис. 4.24).

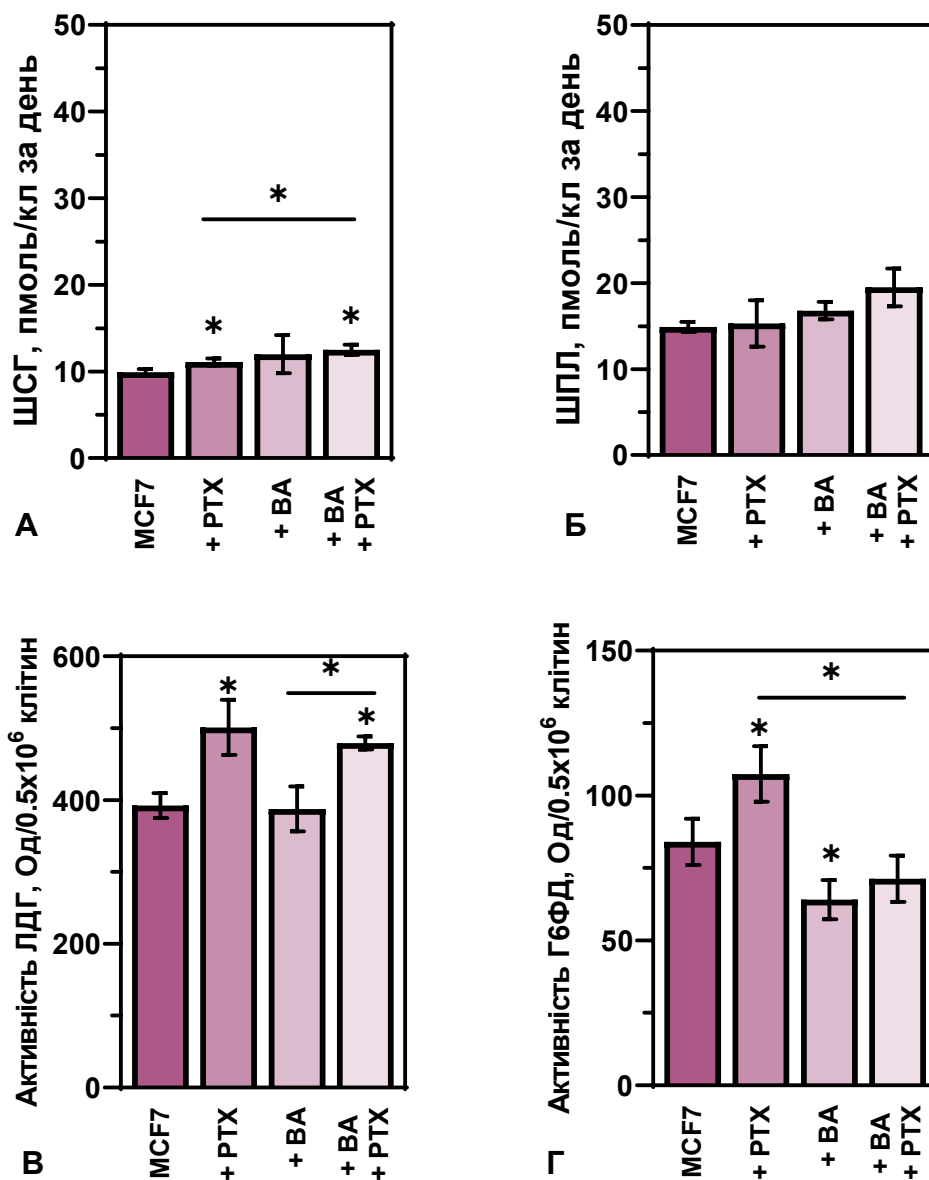


Рис. 4.24 Зміни метаболічного профілю вихідних і оброблених *B. animalis* клітин РМЗ лінії MCF-7 через 48 годин їх культивування з паклітакселом: А – швидкість споживання глюкози; Б – швидкість продукції лактату; В – активність ЛДГ; Г – активність Г6ФД. +PTX – інтактні клітини оброблені паклітакселом; +BA – клітини оброблені *B. animalis* без паклітакселу; +PTX+BA – клітини оброблені *B. animalis* та паклітакселом. * – $p < 0,05$ статистично достовірна різниця порівняно з

інтактним контролем клітин; * – $p < 0,05$ статистично достовірні різниця між двома зазначеними експериментальними групами $p < 0,05$.

Показано, що обробка клітин MCF-7 паклітакселом призводила до помірного, однак статистично значимого відносно контролю клітин, збільшення ШСГ в 1,1 рази. Після комплексної обробки клітин біфідобактеріями і хіміопрепаратом відмічали статистично достовірне зростання ШСГ в 1,26 рази в порівнянні з інтактними клітинами (рис. 4.24 А). Статистично достовірних змін ШСГ в клітинах, які зазнали впливу лише *B. animalis*, не виявляли. Окрім того, в клітинах MCF-7 за таких умов експерименту не спостерігали статистично значущих змін ШПЛ (рис. 4.24 Б).

Однак, обробка клітин MCF-7 *B. animalis* і паклітакселом призводила до статистично достовірних змін внутрішньоклітинної активності ЛДГ і Г6ФД. В клітинах, які культивували лише з цитостатиком або обробляли обома агентами активність ЛДГ зростала в 1,3 і 1,2 рази, відповідно, в порівнянні з контролем клітин. В групі MCF-7 + *B. animalis* статистично значущих змін активності ЛДГ не відмічали (рис. 4.24 В). Вимірювання активності Г6ФД в клітинах MCF-7 оброблених паклітакселом виявило статистично достовірне збільшення активності цього ферменту в 1,3 рази відносно контролю клітин. В клітинах MCF-7, які зазнали впливу лише *B. animalis* спостерігали статистично значуще зниження активності Г6ФД у 1,3 рази в порівнянні з інтактними клітинами. При цьому комплексна обробка клітин MCF-7 обома агентами на викликала статистично достовірних змін активності цього ферменту (рис. 4.24 Г).

В клітинах MDA-MB-231 спостерігали статистично достовірне зростання ШСГ у всіх експериментальних групах (рис. 4.25 А). Зокрема, експозиція клітин з біфідобактеріями викликала збільшення ШСГ в 1,5 рази, тоді як обробка клітин паклітакселом – в 2,8 рази в порівнянні з контролем клітин. Обробка клітин комплексом агентів спричиняла підвищення ШСГ в 4,3 рази відносно контролю клітин.

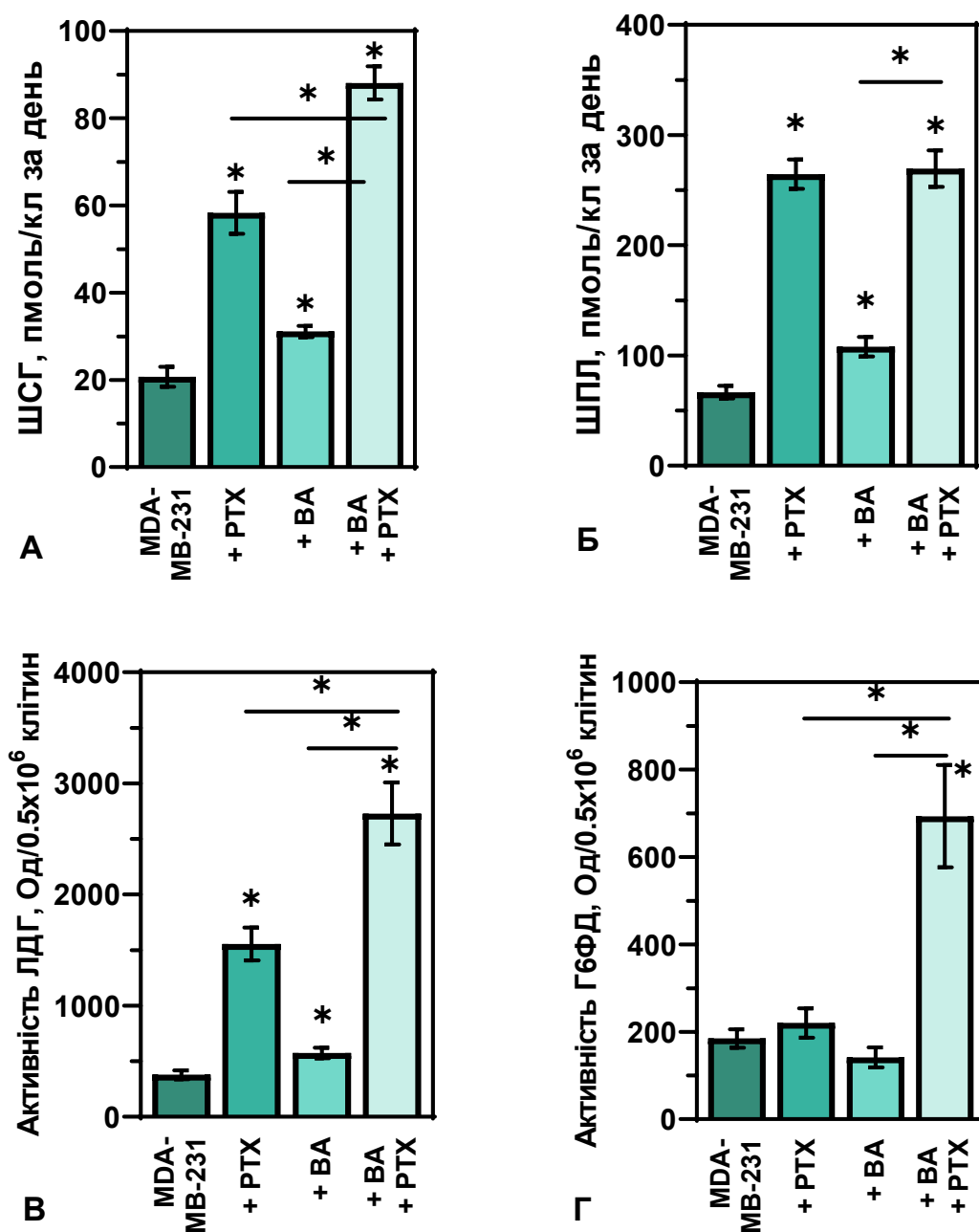


Рис. 4.25 Зміни метаболічного профілю вихідних і оброблених *B. animalis* клітин РМЗ лінії MDA-MB-231 через 48 годин їх культивування з паклітакселем: А – швидкість споживання глюкози; Б – швидкість продукції лактату; В – активність ЛДГ; Г – активність Г6ФД. +PTX – інтактні клітини оброблені паклітакселем; +BA – клітини оброблені *B. animalis* без паклітакселу; +PTX+BA – клітини оброблені *B. animalis* та паклітакселем. * – $p < 0,05$ статистично достовірна різниця порівняно з інтактним контролем клітин; —* — $p < 0,05$ статистично достовірна різниця між двома зазначеними експериментальними групами $p < 0,05$.

Статистично значуще підвищення ШПЛ також виявили в клітинах MDA-MB-231 після їх обробки *B. animalis* і паклітакселом (рис. 4.25 Б). Було показано, що в клітинах оброблених протипухлинним препаратом або обома агентами ШПЛ збільшувалась в 4 рази в порівнянні з контролем клітин. В клітинах MDA-MB-231 оброблених лише *B. animalis* виявляли збільшення ШПЛ у 1,6 рази відносно цього показника в інтактних клітинах.

Також, в клітинах MDA-MB-231 оброблених *B. animalis* і паклітакселом було встановлено статистично достовірне збільшення активності ЛДГ (рис. 4.25 В). Зокрема, попередня обробка клітин РМЗ бактеріями сприяє зростанню активності ЛДГ у 1,5 рази, тоді як інкубація інтактних клітин з цитостатиком призводила до підвищення цього показника у 4,1 рази відносно контролю. Комплексна послідовна обробка клітин MDA-MB-231 *B. animalis* і паклітакселом супроводжувалась збільшенням активності ЛДГ у 7,2 рази в порівнянні з інтактними клітинами.

Аналіз змін активності Г6ФД в клітинах MDA-MB-231, які зазнали впливу *B. animalis* і паклітакселу, показав, що лише комплексна обробка клітин РМЗ обома агентами призводить до статистично значущих змін активності цього фермента – збільшення у 3,8 рази в порівнянні з контрольними клітинами (рис. 4.25 Г). При цьому, в клітинах MDA-MB-231 інших експериментальних груп не було виявлено статистично значимих змін активності Г6ФД.

Отримані результати свідчать, що лише в клітинах РМЗ базального підтипу MDA-MB-231 після їх співкультивування з *B. animalis* спостерігали посилення цитотоксичної дії паклітакселу, що, вірогідно, було наслідком виникнення і потенціювання оксидативного стресу в цих клітинах через спільні сигнальні шляхи. При цьому клітини MDA-MB-231 збільшують ШСТГ, ШПЛ та активність ЛДГ і Г6ФД для подолання наслідків окисного стресу та забезпечення клітин проміжними продуктами гліколізу для анаболічних реакцій в клітинах з метою підтримки їх виживаності в надзвичайно несприятливих умовах.

Результати, описані в розділі 4, опубліковані в [148–152].

РОЗДІЛ 5. ОЦІНКА ВПЛИВУ *B. ANIMALIS* НА ПРОДУКЦІЮ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ ТА ЕКСПРЕСІЮ МАРКЕРА ПРОЛІФЕРАЦІЇ І БІЛКІВ-РЕГУЛЯТОРІВ АПОПТОЗУ В КЛІТИНАХ РМЗ РІЗНИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ ПІДТИПІВ *IN VITRO*

Сьогодні доведено, що зміни метаболічної активності злоякісних клітин безпосередньо впливають на їх біологічні властивості – проліферацію, життєздатність і стан окисно-відновної системи [5,71,74,153,154]. Результати, викладені у розділі 4, підтверджують здатність *B. animalis* до репрограмування метаболічного фенотипу клітин РМЗ у бік посилення гліколізу. Гліколіз, що функціонує незалежно від мітохондріального окисного фосфорилування (OXPHOS), дозволяє зменшити надмірне утворення активних форм кисню (АФК), підтримуючи редокс-баланс в клітинах. Разом з тим, відомо, що біфідобактерії та їх метаболіти можуть збільшувати швидке вироблення АФК в епітеліальних клітинах [7]. Підвищений вміст АФК в клітині призводить до невибіркового і незворотного окиснення молекул ДНК, ліпідів, білків, що може активувати програму апоптозу. Було встановлено, що термічно інактивовані біфідобактерії та їх секретовані метаболіти здатні пригнічувати проліферацію та індукувати апоптоз в клітинах злоякісних пухлин [155,156]. При цьому інтенсивність прояву і напрямок впливу біфідобактерій на стан окисно-відновної системи, проліферацію і виживаність злоякісно трансформованих клітин може суттєво відрізнятися в залежності від штаму пробіотиків і гістологічного походження пухлинних клітин.

Отже, метою цього етапу роботи було дослідження впливу живих *B. animalis* на продукцію АФК, проліферацію і експресію білків-регуляторів апоптозу в клітинах РМЗ. Особливу цінність можуть мати результати, щодо змін досліджених показників в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів у порівняльному аспекті. Оскільки вони можуть корелювати зі змінами метаболічної активності клітин РМЗ і пояснити відмінності ефектів *B. animalis* на біологічні властивості пухлинних клітин.

5.1. Рівень активних форм кисню в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів після їх співкультивування з *B. animalis*

З метою встановлення потенційних механізмів впливу *B. animalis* на метаболічну активність і життєздатність клітин РМЗ та пояснення відмінностей у чутливості різних клітинних ліній до дії мікроорганізму було проведено аналіз внутрішньоклітинної продукції АФК. Такий підхід обґрунтований сучасними уявленнями про те, що сигнальні шляхи, залежні від рівня АФК, беруть участь у регуляції основних клітинних процесів, зокрема проліферації, диференціації, білкового синтезу, енергетичного обміну та забезпечення виживання злоякісно трансформованих клітин [157].

Отримані результати свідчать, що експозиція клітин РМЗ з *B. animalis* супроводжувалась статистично достовірним підвищенням продукції АФК у порівнянні з інтактними клітинами у всіх трьох клітинних лініях (рис. 5.1).

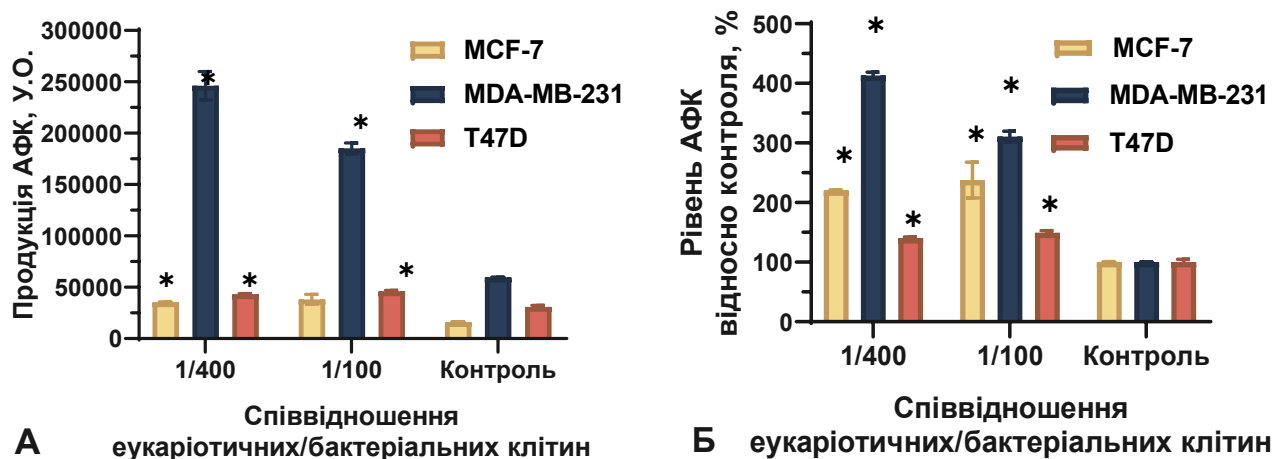


Рис. 5.1 Рівень АФК в клітинах РМЗ після їх співкультивування з *B. animalis*. А – абсолютні показники продукції АФК; Б – відносні показники продукції АФК. * $p < 0,05$ — статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами.

Аналіз змін рівня АФК в клітинах РМЗ люмінального підтипу ліній Т47D та MCF-7 після їх співкультивування з *B. animalis* при співвідношенні еукаріотичних/бактеріальних клітин 1/100 і 1/400 показав, що продукція АФК в

оброблених клітинах статистично достовірно зростає у 1,4-1,5 і 2,2-2,3 рази, відповідно, в порівнянні з контролем клітин. Важливо відмітити, що збільшення концентрації бактеріальних клітин в системі співкультивування не призводило до посилення продукції АФК як в клітинах T47D, так і MCF-7 (рис. 5.1).

Співкультивування клітин РМЗ базального підтипу лінії MDA-MB-231 з *B. animalis* у співвідношенні 1/100 супроводжувалось статистично значущим збільшенням продукції АФК у 3 рази, відносно контролю клітин. Збільшення співвідношення клітин РМЗ/*B. animalis* до 1/400 викликало посилення описаних вище змін рівня АФК в цих клітинах – внутрішньоклітинна концентрація АФК зростала у 4,1 рази в порівнянні з інтактними клітинами (рис. 5.1).

Порівняльний аналіз відносних показників концентрації АФК в досліджених клітинах, свідчить що інтенсивність продукції АФК та ступінь зміни цього показника після співкультивування з бактеріями відрізнялися між клітинними лініями, що може бути обумовлено різними окисно-відновними характеристиками та ефективністю функціонування антиоксидантних систем цих клітин. При цьому найбільше зростання рівня АФК спостерігали в клітинах ліній MDA-MB-231 та MCF-7, що співвідноситься з літературними даними про подібний рівень експресії ферментів системи подвійної оксидази (DUOX) у цих клітинних лініях [158].

5.2. Оцінка експресії маркера проліферації та білків-регуляторів апоптозу в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів після співкультивування з живими *B. animalis*

Отримані результати змін експресії маркера проліферації Ki-67 в клітинах РМЗ свідчать, що експозиція клітин РМЗ всіх трьох ліній з *B. animalis* при співвідношенні еукаріотичних/бактеріальних клітин 1/100 спричиняє статистично достовірне зниження ядерної експресії Ki-67 на 45–60% порівняно з контролем (рис. 5.1).

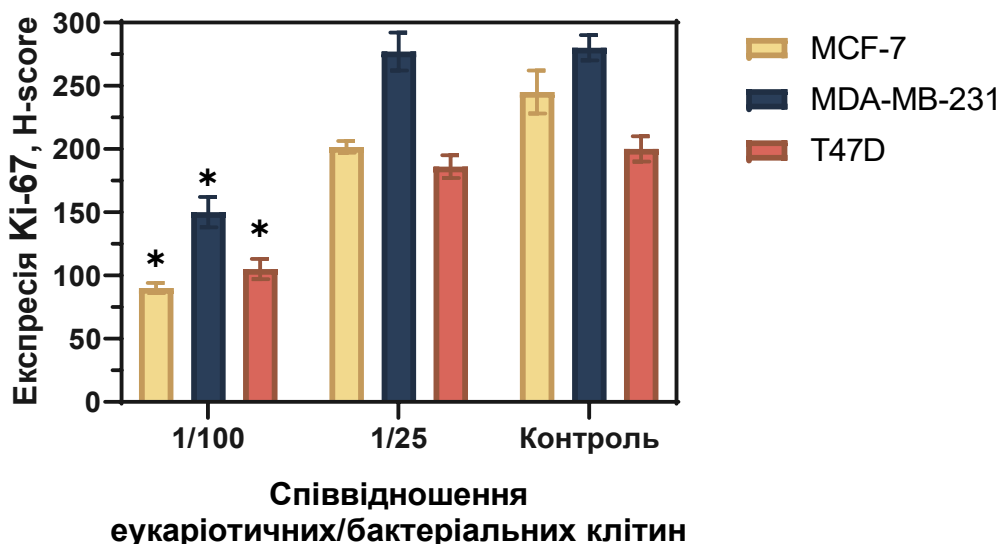


Рис. 5.2 Експресія Ki-67 в клітинах РМЗ після співкультивування з *B. animalis*. * $p < 0,05$ — статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами.

Такі зміни експресії цього білка вказують на пригнічення проліферативної активності злоякісних клітин.

Для оцінки впливу *B. animalis* на регуляцію програми апоптозу в клітинах РМЗ було обрано достатньо інформативний спектр маркерів: дослідили експресію проапоптичного білка Вах, антиапоптичного білка Bcl-2 і p21^{WAF1} — циклін-залежного інгібітора кіназ Cdk1 і Cdk2, функціональна активність якого залежить від сайту його локалізації.

Аналіз експресії білків-регуляторів апоптозу в клітинах Т47D виявив, що *B. animalis* спричиняє проапоптичний вплив на досліджувані клітини, про що свідчить статистично достовірне підвищення експресії проапоптичних білків Вах (рис. 5.3 А) і p21^{WAF1} (ядерна експресія) (рис. 5.3 Б), відносно контролю клітин.

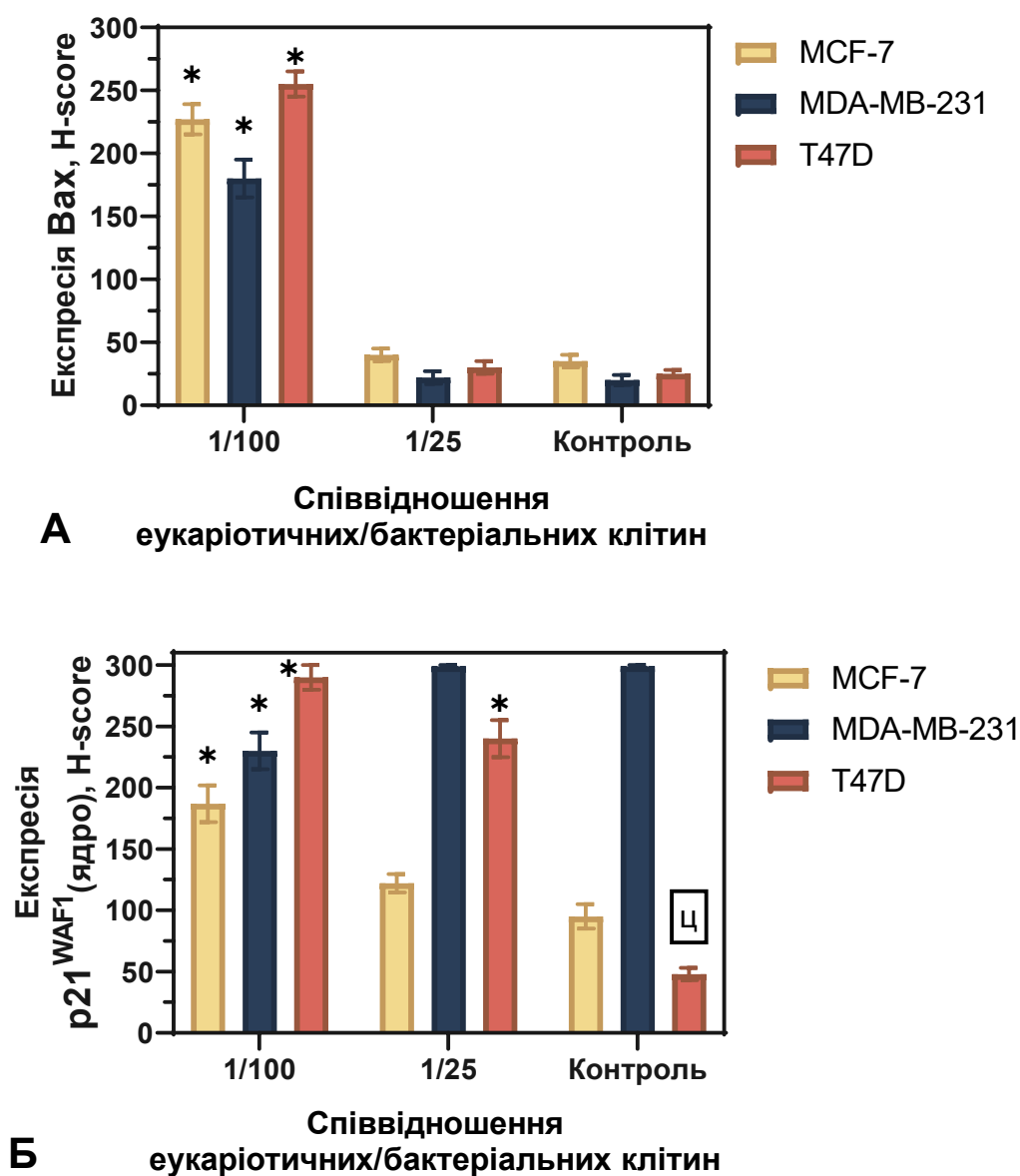


Рис. 5.3 Експресія Vax (А) та p21^{Waf1} (Б) в клітинах РМЗ після співкультивування з *B. animalis*. * $p < 0,05$ — статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами.

Слід зазначити, що саме в цих клітинах виявляли транслокалізацію експресії p21^{WAF1} — з цитоплазми (контроль) в ядро (після експозиції з *B. animalis*) (рисунок 5.7). За таких умов p21^{Waf1} буде діяти як білок-онкосупресор.

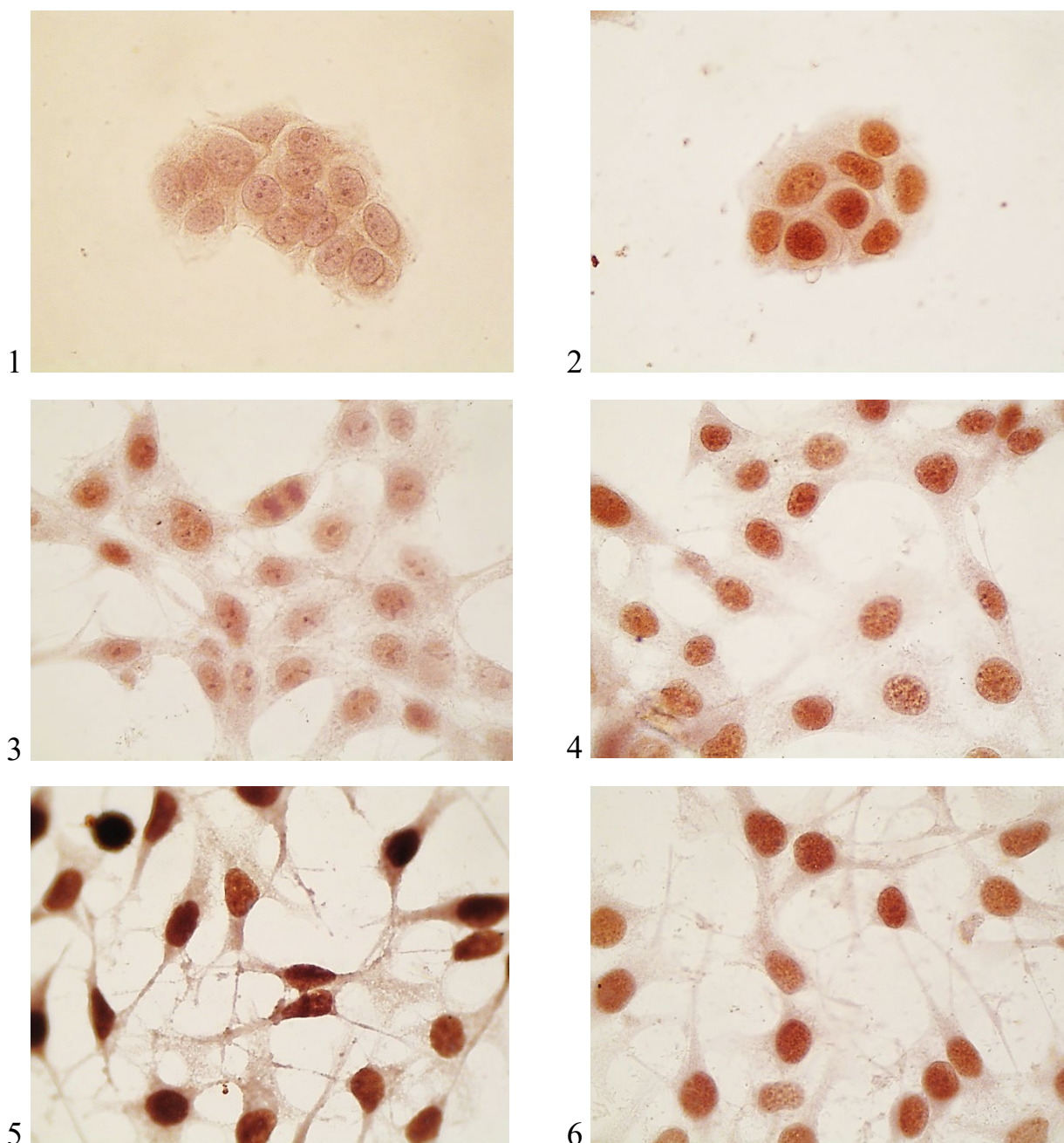


Рис. 5.4 Зміни експресії $p21^{WAF1}$ в клітинах РМЗ людини ліній Т47D (1 – контроль, 2 – з *B. animalis*), МСF-7 (3 – контроль, 4 – з *B. animalis*) та МDА-МВ-231 (5 – контроль, 6 – з *B. animalis*) після їх співкультивування з *B. animalis*.

Зміни експресії білків-регуляторів апоптозу в клітинах МСF-7 свідчать, що *B. animalis* індукує статистично значуще підвищення експресії проапоптичних білків Вах і $p21^{WAF1}$ (ядерна експресія) (рис.5.3, 5.4, 5.5).

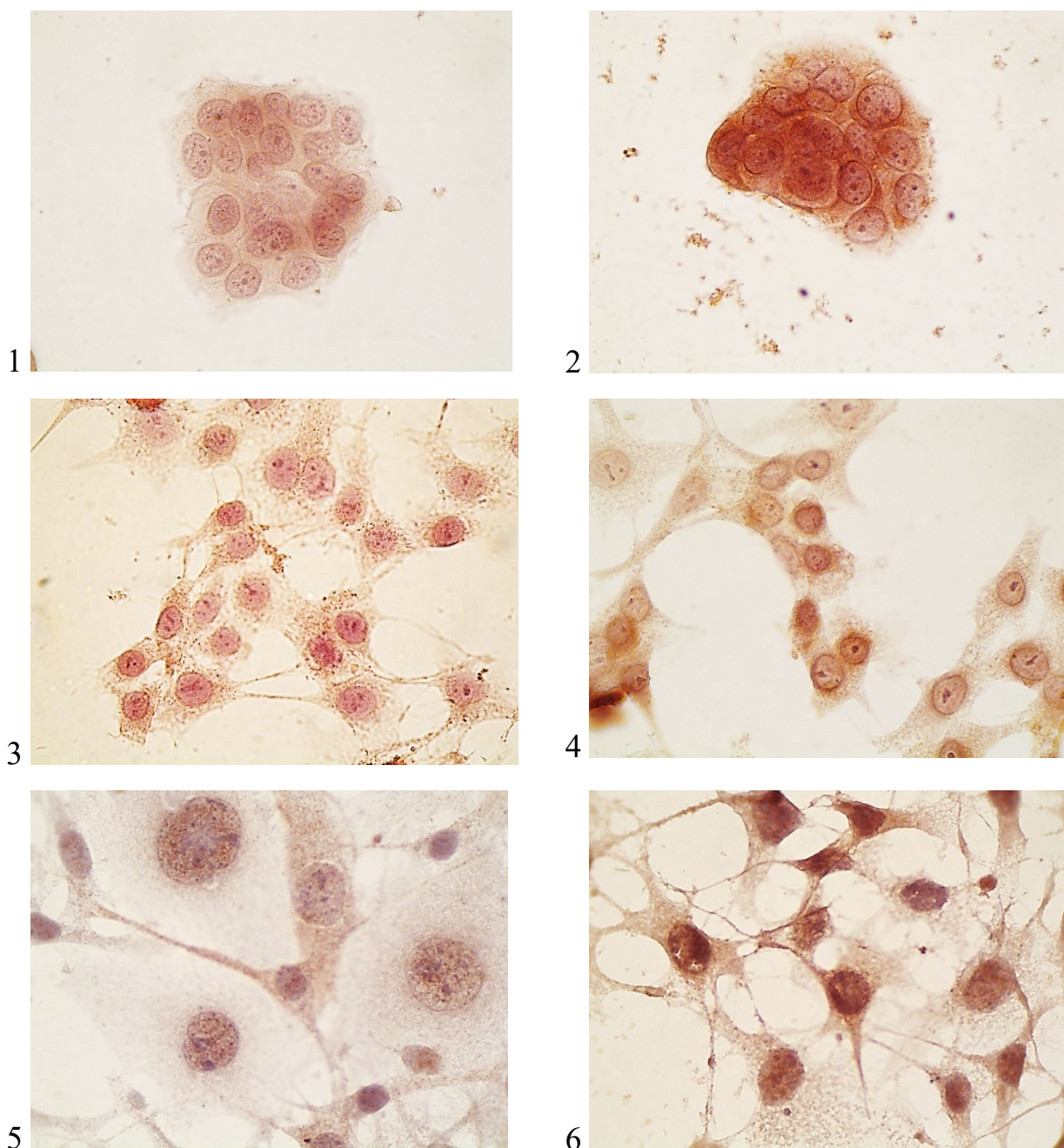


Рис. 5.5 Підвищення експресії Вах в клітинах РМЗ людини ліній Т47D (1 – контроль, 2 – з *B. animalis*), MCF-7 (3 – контроль, 4 – з *B. animalis*) та MDA-MB-231 (5 – контроль, 6 – з *B. animalis*) після їх співкультивування з *B. animalis*.

Ці зміни супроводжувалися збільшенням рівня експресії антиапоптичного білка Bcl-2, що, ймовірно, відображає спробу клітин активувати механізми виживання у відповідь на індукований проапоптичний сигнал (рис. 5.6). Отримані результати свідчать про активацію програми апоптозу в цих клітинах.

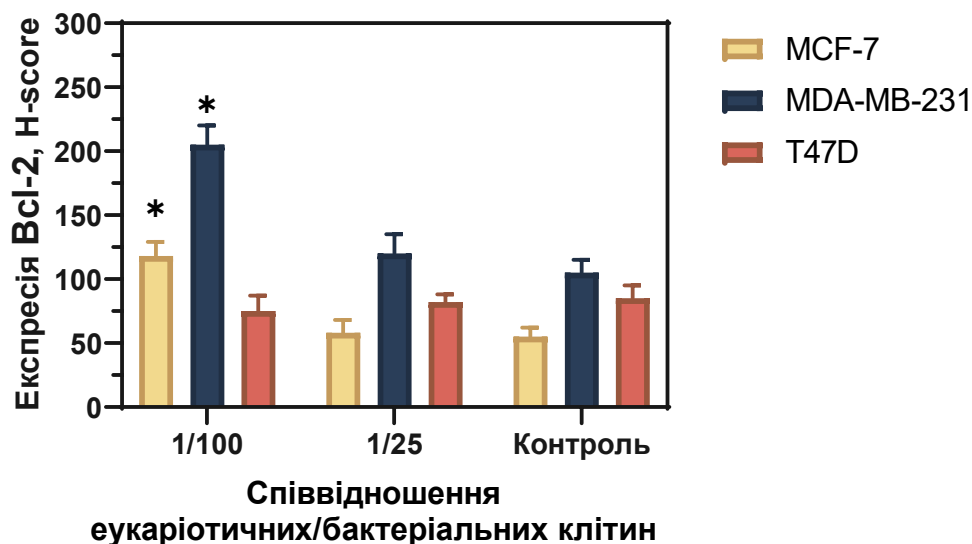


Рис. 5.6 Експресія Bcl-2 в клітинах РМЗ після співкультивування з *B. animalis*. * $p < 0,05$ — статистично достовірна різниця порівняно з інтактними клітинами.

Експозиція клітин MDA-MB-231 з *B. animalis* призводила до статистично достовірного підвищення експресії проапоптичного білка Вах і антиапоптичного білка Bcl-2 в порівнянні з контролем (рис. 5.3 А, рис. 5.6). Цікаво, що саме в цих клітинах відмічали зниження ядерної експресії p21^{WAF1} (рис. 5.3 Б, рис. 5.4). Отримані результати дозволяють припустити, що досліджувані біфідобактерії в клітинах MDA-MB-231 активують програму апоптозу, однак індукція антиапоптичних механізмів в цих клітинах не менш потужна, що забезпечує їх виживаність.

Отже, отримані нами результати свідчать, що співкультивування клітин РМЗ з *B. animalis* призводить до пригнічення проліферації злоякісно трансформованих клітин, підвищення в них продукції АФК, зміни балансу між проапоптичними і антиапоптичними білками та активації програми апоптозу через посилення експресії індуктора апоптозу Вах. Отримані дані також вказують на клітинно-специфічний характер відповіді пухлинних клітин на проапоптичний вплив біфідобактерій, що може бути пов'язано з відмінностями у молекулярних механізмах регуляції апоптозу у різних підтипах РМЗ.

Описані вище зміни продукції АФК і експресії білків асоційованих з проліферацією і регуляцією апоптозу в клітинах РМЗ після їх співкультивування з *B. animalis* повинні відображатися на основних біологічних властивостях пухлинних клітин, зокрема їх життєздатності в експерименті.

Вплив *B. animalis* на життєздатність клітин РМЗ аналізували методом проточної цитометрії (рис. 5.7).

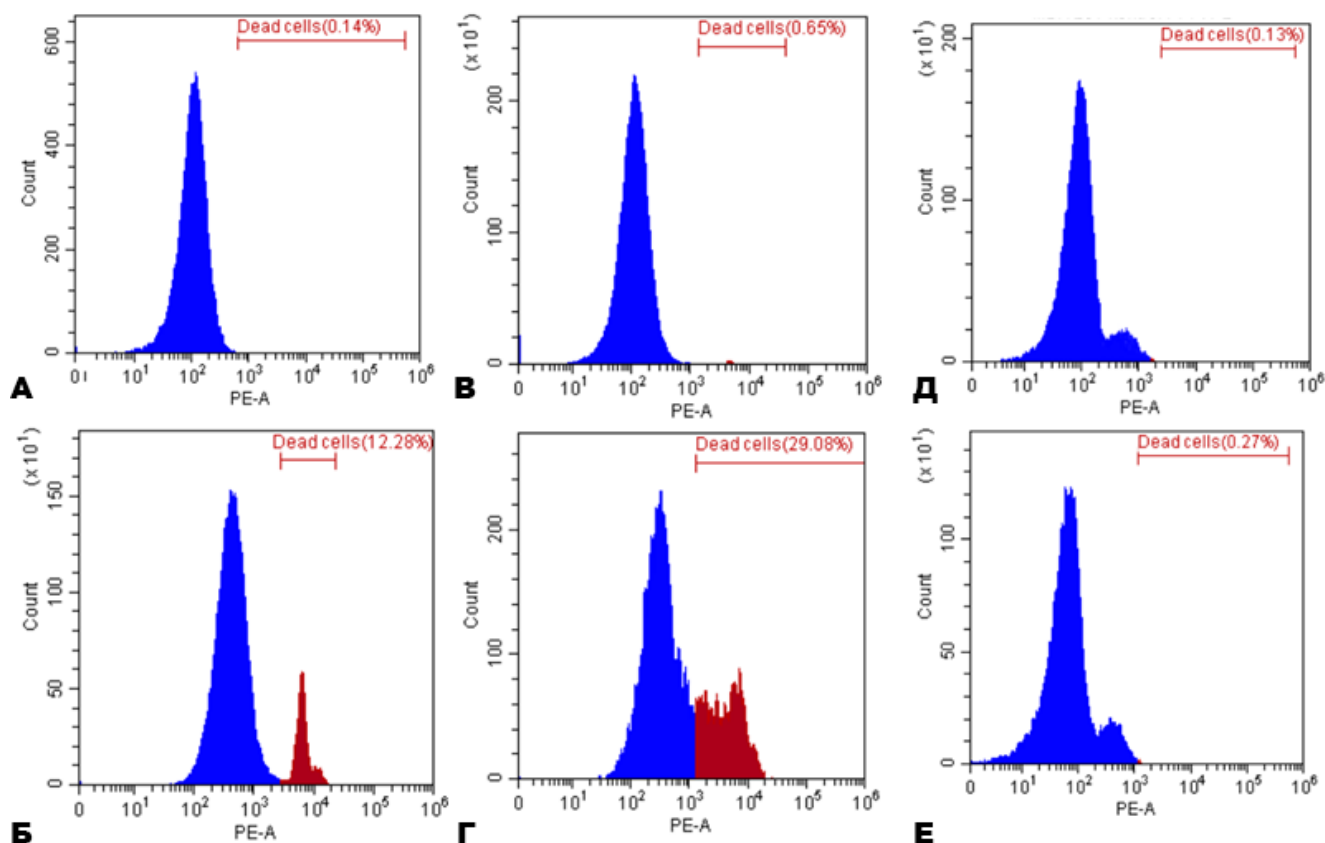


Рис. 5.7 Аналіз виживаності клітин РМЗ після співкультивування з *B. animalis* у співвідношенні 1/100. Клітини фарбували пропідій йодидом. Червоні піки – мертві клітини РМЗ. А – Т47D контроль, Б - Т47D + *B. animalis*, В - МСF-7 контроль, Г - МСF-7 + *B. animalis*, Д - МDА-МВ-231 контроль, Е - МDА-МВ-231 + *B. animalis*.

Було показано, що за умов прямої взаємодії біфідобактерії спричиняють і антипроліферативний і цитотоксичний вплив на клітини РМЗ люмінального підтипу ліній Т47D та МСF-7. Зменшення кількості живих клітин МDА-МВ-231

після їх експозиції з *B. animalis*, вірогідно, є результатом переважно антипроліферативного впливу мікроорганізмів.

Аналіз наукових джерел стосовно особливостей взаємодії злоякіснотрансформованих клітин різного походження та біфідобактерій, вказує на те, що отримані на цьому етапі результати узгоджуються з раніше опублікованими даними та доповнюють наявні відомості щодо здатності пробіотичних мікроорганізмів, зокрема *B. animalis*, реалізовувати *in vitro* антипроліферативний і проапоптичний ефекти на клітини РМЗ [159].

Результати, описані в розділі 5, опубліковані в [160].

РОЗДІЛ 6. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Рак молочної залози відноситься до найпоширеніших злоякісних новоутворень серед жінок у всьому світі та є причиною високого рівня смертності, незважаючи на постійне вдосконалення стратегій лікування [1–3]. Дослідження елементів мікрооточення злоякісних новоутворень молочної залози людини свідчать про важливу роль мікробіоти організму у формуванні унікального злоякісного фенотипу пухлин [161,162]. Одними із найбільш досліджених представників мікробіоти як кишечника, так і молочної залози людини, які відомі своєю протипухлинною, протизапальною та імуномодуючою активністю, є молочнокислі бактерії роду *Bifidobacteria* [163,164].

З метою вивчення особливостей і наслідків взаємовпливу представників мікробіоти, зокрема біфідобактерій, та злоякісних клітин сьогодні широко і успішно використовують різноманітні експериментальні *in vitro* моделі [165–167]. У подібних дослідженнях частіше використовують інактивовані форми бактеріальних клітин. Єдиною вагомою перевагою таких моделей є стала кількість бактерій протягом всього часу інкубації клітин. Однак, за таких умов експерименту неможливо вивчати вплив секретованих метаболітів представників мікробіоти на еукаріотичні клітини, що є надзвичайно важливим аспектом їх взаємодії *in vivo*. Адже доведено, що мікробіом людини знаходиться у тісній взаємодії з процесами обміну організму, а представники мікробіоти та їх метаболіти здійснюють на пухлину та організм в цілому безліч незалежних і різнопланових ефектів [168].

Біфідобактерії – анаеробні цукролітичні молочно-кислі бактерії вимогливі до фізико-хімічних умов навколишнього середовища і складу поживного середовища [124,169]. Тому, на першому етапі роботи було необхідно оцінити здатність *Bifidobacterium animalis* рости в культуральному поживному середовищі і умовах оптимальних для культур еукаріотичних клітин.

Аналіз кривих росту *B. animalis* у середовищі DMEM, отриманих шляхом спектрофотометричного вимірювання при довжині хвилі 600 нм (OD₆₀₀), показав, що швидкість переходу бактеріальної популяції із lag-фази до log-фази частково

залежить від початкової кількості посівного матеріалу: при вищих концентраціях інокуляту спостерігався більш ранній початок експоненційного росту. При цьому тривалість lag-фази становила від 2 до 6 годин. Тривалість логарифмічної фази, яка становила близько 24 годин, залишалась сталою незалежно від вихідного бактеріального навантаження. Однак, кількість бактеріальних клітин збільшувалась в 5-10 разів в залежності від вихідної концентрації бактерій в лунці планшету в порівнянні з 0 годиною спостереження. Отримані спектрофотометричні дані були підтверджені результатами бактеріологічного висіву з середовища DMEM на елективне поживне середовище для біфідобактерій.

Аналіз кінетики росту *B. animalis* дозволив визначити, що максимальна кількість життєздатних бактеріальних клітин досягається через 24 години інкубації, після чого, з 48 до 72-ї години, спостерігається поступове зниження життєздатності клітинної популяції. Подібна закономірність кінетики росту *B. animalis* у повному поживному середовищі DMEM може бути обумовлена наявністю у складі поживного середовища вільних амінокислот і вітамінів, які активно засвоюються біфідобактеріями упродовж перших 24 годин культивування [170]. На пізніших стадіях росту біфідобактерії можуть використовувати як джерело поживних речовин пептиди тільки в тому випадку якщо володіють певною протеолітичною активністю [171]. За даними літератури відомо, що деякі штами біфідобактерій, зокрема і *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* не володіють протеолітичною активністю [172–174], відповідно, не здатні самостійно метаболізувати пептиди, що може пояснити лише одну і короткотривалу log-фазу росту бактерій в зазначених умовах.

Ще одним важливим показником життєздатності *B. animalis*, який характеризує їх ростові характеристики є їх метаболічна активність, зокрема споживання глюкози і продукція лактату. Відомо, що в біфідобактеріях моносахариди метаболізуються так званим фруктозо-6-фосфатним або біфідним шунтом [175,176] одним із кінцевих продуктів якого є лактат [177]. При цьому *B. animalis* через 48-72 години інкубації у найвищому із досліджених нами співвідношень метаболізують лише 16-17% від вихідної кількості глюкози в

DMEM. Це доводить, що застосована в експерименті кількість бактерій не спричиняє виснаження культурального середовища за цим показником. Отримані результати також свідчать, що найінтенсивніше *B. animalis* споживали глюкозу протягом перших 24 годин культивування. При цьому накопичення лактату суттєво зросло у проміжку до 48 годин інкубації, що свідчить про активне функціонування метаболічних шляхів та підтримання фізіологічної активності *B. animalis* за експериментальних умов культивування.

Відсутність статистично значущих змін рівня рН у середовищі в процесі росту біфідобактерій, імовірно, пояснюється буферними властивостями системи $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$, яка підтримується за рахунок складу середовища DMEM та інкубації культур у атмосфері з 5% вмістом CO_2 . Крім того, на буферну здатність середовища може додатково впливати присутність білкових компонентів фетальної телячої сироватки, яка вводиться до складу повного поживного середовища у концентрації 10% від загального об'єму [178]. Для клітин РМЗ оптимум рН знаходиться в діапазоні 7,0 – 7,6 [179]. Таким чином, зміни життєздатності, які спостерігаються на клітинах РМЗ при співкультивуванні із бактеріями, спричинені саме комплексною взаємодією агентів, а не порушенням кислотності поживного середовища з боку бактерій.

Отже, за отриманими даними найбільш оптимальними умовами для оцінки впливу живих клітин *Bifidobacterium animalis* на клітини РМЗ людини *in vitro* є час інкубації 48 годин і співвідношення еукаріотичних/бактеріальних клітин в діапазоні від 1/40 до 1/400.

Порівняльний аналіз різних способів співкультивування клітин РМЗ і живих або інактивованих теплом *B. animalis* (пряма або безконтактна взаємодія) показав, що найбільш виражений вплив на життєздатність клітин РМЗ в системі *in vitro* біфідобактерії спричиняють за умов безпосереднього контакту злякано трансформованих клітин з живими мікроорганізмами. Оскільки за таких умов співкультивування на еукаріотичні клітини впливають як метаболіти *B. animalis*, так і безпосередній фізичний контакт із бактеріальними тілами. Отже, використання живих бактерій в експериментальній моделі співкультивування хоч і

є методично більш складним, однак дозволяє всебічно оцінити вплив бактерій на клітини РМЗ. Саме тому, подальші дослідження впливу *B. animalis* на пухлинні клітини РМЗ проводили із використанням живих бактерій та їх прямої взаємодії з пухлинними клітинами. Однак, за таких умов культивування постає питання валідації такої експериментальної моделі.

Аналіз кривої росту *B. animalis* (при OD600) в присутності клітин РМЗ різних молекулярних підтипів свідчить, що пухлинні клітини не впливають на тривалість фаз розвитку бактеріальної популяції, але сприяють збільшенню приросту біомаси *B. animalis*, що може бути пов'язане зі зміною рН і компонентного складу поживного середовища (внаслідок життєдіяльності клітин РМЗ) [180]. Відомо, що для більшості пробіотичних штамів біфідобактерій характерний зв'язок між швидкістю росту і метаболічною активністю та кислотоутворенням [181,182], при цьому біфідобактерії мають вузький оптимум рН (від 6,5 до 7) для росту [163]. Разом з тим, пухлинні клітини часто використовують гліколітичний шлях метаболізму глюкози і, як наслідок, активно продукують лактат [183]. Останній, у свою чергу, також впливає на рН середовища, створюючи більш сприятливі умови для росту біфідобактерій. Таке припущення підтверджують отримані в роботі результати. Було показано, що клітин MDA-MB-231 продукують найбільшу кількість лактату в поживне середовище, і саме в присутності цих клітин спостерігали найбільш суттєвий приріст біомаси *B. animalis*.

Статистично достовірне зменшення кількості живих клітин РМЗ всіх досліджених ліній, в порівнянні з контролем, спостерігали лише через 48 годин інкубації при початковому співвідношенні еукаріотичних/бактеріальних клітин 1/400 та 1/100. При цьому, найбільш чутливими до впливу біфідобактерій були клітини люмінального типу ліній MCF-7 і T47D.

Аналізуючи вплив *B. animalis* на кількість живих клітин РМЗ слід також враховувати можливі зміни співвідношення еукаріотичних/бактеріальних клітин через 48 годин експерименту. Отримані результати можуть пояснити вищу чутливість клітин MCF-7 і T47D до впливу *B. animalis*, оскільки саме для них виявляли зміну співвідношення у бік збільшення кількості бактеріальних клітин в

середньому в 2 рази на противагу до клітин MDA-MB-231, які характеризуються більшою щільністю росту.

Таким чином, на цьому етапі роботи було ідентифіковано найбільш оптимальні умови співкультивування, оцінки і аналізу результатів взаємодії клітин РМЗ різних молекулярних підтипів і живих *B. animalis* в експериментальній модельній системі *in vitro*. Розроблена інноваційна модель стала ефективною платформою для подальших досліджень впливу *B. animalis* на метаболічний профіль і основні біологічні властивості клітин РМЗ різних молекулярних підтипів, зокрема, проліферацію та виживаність.

Здатність до реорганізації метаболічних процесів є однією із ключових властивостей злоякісних клітин необхідною для забезпечення високих енергетичних потреб, виживаності, проліферації, метастазування і резистентності до дії протипухлинних препаратів [142]. Тому, зміни ключових біохімічних і сигнальних шляхів залучених у метаболізмі глюкози в клітинах РМЗ під впливом різних чинників є інформативним маркером їх метаболічного стану і, як наслідок, біологічних властивостей. Сьогодні відомо, що клітини РМЗ споживають велику кількість глюкози і метаболізують її шляхом гліколізу, кінцевим продуктом якого є лактат. Підвищене виробництво лактату часто спостерігається в пухлині, де він посилює гліколіз в злоякісних клітинах, сприяє ангіогенезу і прогресії захворювання [85,86]. Враховуючі таку пропухлинну активність лактату, необхідність вивчення впливу *B. animalis* на основні шляхи метаболізму глюкози в клітинах РМЗ набуває особливої актуальності. Оскільки відомо, що молочнокислі бактерії, зокрема біфідобактерії, які входять до складу мікробіоти кишечника і молочної залози людини [130], для метаболізму вуглеводів використовують техніку, відому як «біфідо-шунт». При цьому, внаслідок споживання глюкози мікроорганізмами, утворюються ацетат і лактат, які на думку деяких дослідників можуть посилювати в клітинах РМЗ ефект Варбурга, підвищуючи проліферацію та злоякісність цих клітин [184] і знижуючи ефективність хіміотерапії [67].

Однак, на сьогоднішній день існує багато доказів протипухлинної активності біфідобактерій *in vitro* та *in vivo* [185–188]. Тож, аналіз ефектів *B. animalis* на деякі

показники енергетичного метаболізму клітин РМЗ дозволить покращити розуміння механізмів впливу представників мікробіоти на біологічні властивості злоякісних клітин і пояснити антипроліферативну і проапоптичну дію біфідобактерій на ці клітини.

Збільшення ШСГ і ШПЛ за умови співкультивування клітин РМЗ з *B. animalis*, в порівнянні з інтактними клітинами, свідчить про посилення гліколітичного шляху метаболізму глюкози в цій експериментальній системі *in vitro*. Найбільш виражені зміни метаболічної активності в бік посилення гліколізу спостерігалися в клітинах РМЗ люмінального підтипу Т47D та MCF-7, вірогідно тому, що інтактні клітини базального підтипу MDA-MB-231 вже віддають перевагу цьому способу метаболізму глюкози [13]. Статистично значуще підвищення ШСГ і ШПЛ в клітинах MDA-MB-231 відмічалось лише через 48 годин експозиції цих клітин з пробіотиком. Вважається, що посилений метаболізм глюкози, особливо шляхом гліколізу, відбувається в пухлинних клітинах з високою проліферативною активністю [189–191]. Однак, співкультивування клітин РМЗ і *B. animalis* супроводжувалось статистично значущим зниженням кількості живих злоякісних клітин через 48 годин їх експозиції. Вірогідно, в даному випадку реалізується інша важлива функція гліколізу – забезпечення високих рівнів гліколітичних проміжних продуктів для підтримки анаболічних реакцій в клітинах РМЗ спрямованих на збереження їх життєздатності [192,193].

З метою пошуку можливих сигнальних механізмів, які забезпечують підвищення ШСГ в клітинах РМЗ внаслідок їх експозиції з *B. animalis*, вивчався вплив мікроорганізму на експресію РІ в клітинах РМЗ. Адже, через сигнальні шляхи, які активуються РІ, регулюється споживання та утилізація глюкози і експресія гліколітичних генів в клітинах [194]. Виявлені зміни експресії РІ дозволяють припустити, що в досліджених клітинах оброблених *B. animalis* посилення споживання глюкози регулюється через різні проксимальні фрагменти інсулінового сигнального шляху PI3K/Akt: в клітинах MCF-7 та MDA-MB-231 через РІ, а в клітинах Т47D через активацію сигнального білку Ras [194,195].

Саме через сигнальний шлях PI3K/Akt може здійснюватися регуляція експресії транспортера глюкози і важливого регулятора гліколізу GLUT1 [96,196]. Відомо, що фосфорильована форма Akt індукує експресію GLUT1 в клітинах PM3, що призводить до стимуляції транспорту глюкози та підвищення їх метаболічної активності [197,198]. Було показано, що співкультивування клітин PM3 ліній T47D та MCF-7 з *B. animalis* супроводжується статистично значущим підвищенням експресії GLUT1 на 30-80% відносно контролю. В клітинах MDA-MB-231 експозиція з *B. animalis* не спричиняла значних змін експресії білка-транспортера, тому що вихідний рівень експресії GLUT1 в цих клітинах був високим, вищим ніж в клітинах люмінального підтипу. Такі зміни експресії GLUT1 корелюють зі змінами ШСГ і ШПЛ в досліджених клітинах і підтверджують наші попередні висновки щодо посилення метаболізму глюкози шляхом гліколізу в клітинах PM3 після їх співкультивування з *B. animalis*. Підвищення експресії, транслокацію до плазматичної мембрани і активацію GLUT1 в клітинах PM3 внаслідок їх експозиції з *B. animalis* може індукувати лактат [135,199].

Регуляція гліколізу в пухлинних клітинах також відбувається шляхом зміни активності гліколітичних ферментів [200]. В роботі було досліджено вплив *B. animalis* на активність внутрішньоклітинної ЛДГ в клітинах PM3. Виявлено статистично значуще підвищення цього показника в клітинах PM3, що корелювало зі змінами ШПЛ, і є додатковим свідченням посилення гліколітичних процесів метаболізму глюкози в досліджених клітинах [201]. Найбільш виражені зміни активності ферменту спостерігалися в клітинах люмінального підтипу, а в клітинах MDA-MB-231 статистично достовірне збільшення активності ЛДГ, як і підвищення ШПЛ, відмічалось лише через 48 годин інкубації клітин з *B. animalis*.

Також, в експерименті аналізувалася активність Г6ФД в клітинах PM3 після їх експозиції з *B. animalis*. Г6ФД – це фермент окисної гілки пентозофосфатного шляху (PPP) продуктами якої є рибулозо-5-фосфат, CO₂ і NADPH. Саме NADPH використовують злякисно трансформовані клітини в якості потужного антиоксиданту, підтримуючи окислювально-відновний гомеостаз [202]. Здатність *B. animalis* впливати на активність Г6ФД в клітинах PM3 є важливим результатом,

оскільки він є першим і лімітуючим швидкість PPP ферментом, а його активність асоційована з інвазивною і метастатичною активністю [94] та резистентністю до хіміотерапії злоякісних клітин [94,203].

Обов'язковими учасниками сигнальних шляхів, які регулюють метаболічну пластичність клітин РМЗ, є фактори транскрипції. В даній роботі зосереджено увагу на регуляторній ролі транскрипційного фактору STAT6, зміни експресії якого впливають не лише на енергетичний метаболізм глюкози в клітинах РМЗ, але і відіграють вирішальну роль у контролі проліферації злоякісних клітин. В клітинах РМЗ всіх трьох ліній після співкультивуванні з *B. animalis* спостерігається збільшення ядерної та цитоплазматичної експресії STAT6. У такий спосіб STAT6 може регулювати енергетичний метаболізм глюкози в злоякісних клітинах шляхом контролю активності ферментів, які лімітують швидкість гліколізу [204], або експресії GLUT1 [205]. Разом з тим, відомо, що в клітинах РМЗ підвищення експресії STAT6 позитивно пов'язано з нижчою швидкістю їх проліферації або індукцією апоптозу. При цьому антипроліферативний і проапоптичний ефекти STAT6 опосередковується стимуляцією експресії інгібіторів циклінзалежної кінази G1 p21^{WAF1} [206]. Слід зазначити, що STAT6 активується в клітинах у відповідь на IL-4/IL-13 [207], а лактат або власне *B. animalis* можуть сприяти стимуляції продукції цих цитокінів [208].

Отже, співкультивування клітин РМЗ з *B. animalis* супроводжується змінами процесів метаболізму глюкози злоякісними клітинами, зокрема посиленням гліколізу. При цьому *B. animalis* впливає не лише на біохімічні ланки метаболізму глюкози але і сигнальні шляхи, модулюючи рівень експресії рецепторів інсуліну та підвищуючи експресію транспортера глюкози GLUT1 і транскрипційного фактору STAT6. При цьому антипроліферативні механізми дії *B. animalis* можуть транслюватися через сигнальні PI3K-опосередковані шляхи, а процеси гліколізу посилюються для підтримки анаболічних реакцій [193,209,210] в клітинах РМЗ або ядерного транспорту анти- і проапоптотичних факторів, що вимагає активного метаболізму і енергії АТФ [211].

Зрозуміло, що комплекс проведених досліджень дозволив з'ясувати лише фрагменти регуляторних сигнальних шляхів, які активуються в клітинах РМЗ за умови їх співкультивування з *B. animalis*, і пояснюють виявлені зміни шляхів метаболізму глюкози. Подальші дослідження цих механізмів необхідні, оскільки розуміння особливостей енергетичного метаболізму в клітинах РМЗ внаслідок впливу молочно-кислих бактерій може стати підґрунтям для розробки нових підходів до ефективного лікування цього небезпечного захворювання особливо в умовах розвитку метаболічного синдрому.

З метою підтвердження висновків щодо напрямку змін метаболічної активності клітин РМЗ за умов їх співкультивування з *B. animalis* модифіковані бактеріями клітини були оброблені сполуками, що здатні впливати на гліколітичний шлях метаболізму глюкози. Зокрема, інгібітором гліколізу – 2-дезоксиглюкозою [212] та активатором цього метаболічного шляху в клітинах РМЗ – метформіном [213].

2-дезоксиглюкоза (2-DG) – аналог глюкози, який транспортується в пухлинні клітини трансмембранними білками родини GLUT, зокрема GLUT1, і фосфорелюється ферментами гліколізу до 2-дезоксиглюкозо-6-фосфату. Така форма моносахариду далі не метаболізується, накопичується і спричиняє блокування гліколізу, а також енергетичне виснаження і загибель злоякісно трансформованих клітин [214]. Найбільш чутливими до цитотоксичної дії 2-DG є ті клітини, метаболізм яких орієнтований переважно на гліколіз [215]. Зміни життєздатності оброблених *B. animalis* клітин РМЗ під дією 2-DG підтверджують зроблені в роботі попередні висновки щодо посилення гліколізу в клітинах люмінального підтипу ліній T47D та MCF-7 внаслідок їх співкультивування з біфідобактеріями. Було показано, що показник IC_{50} для 2-DG на оброблених *B. animalis* клітинах T47D і MCF-7 у 2 рази нижчий ніж для інтактних клітин. Окрім того, в цих клітинах спостерігалось статистично достовірне підвищення дихальної активності на 10% відносно контролю. Аналіз ШСГ і ШПЛ свідчить про посилення ефектів інгібування гліколізу в клітинах РМЗ, які зазнали комплексного та послідовного впливу *B. animalis* і 2-DG разом, в порівнянні з дією 2-DG окремо.

У клітинах базального підтипу MDA-MB-231 після співкультивування з *B. animalis*, навпаки, відзначалося пригнічення цитотоксичного впливу 2-DG, що може бути наслідком адаптаційних змін у шляхах метаболізму глюкози або посилення метаболічної пластичності клітин РМЗ. Окрім того, за даними літератури 2-DG також може індукувати загибель пухлинних клітин шляхом активації апоптозу через підвищення експресії білка Вах [216]. Однак, висока експресія антиапоптичного білка Bcl-2, або пригнічення ядерної експресії p21^{Waf1} можуть бути причиною зниження цитотоксичної дії 2-DG [217].

Метформін в клітинах РМЗ активував гліколіз, однак в клітинах базального підтипу MDA-MB-231 спрямовував метаболізм глюкози в пентозофосфатний шлях. При комплексній дії біфідобактерій і метформіну відбувається репрограмування метаболічної активності пухлинних клітин залежно від їх молекулярного підтипу і вихідного метаболічного профілю. Наші дослідження показали, що в клітинах MCF-7 спостерігається посилення гліколізу, причому це синергічний ефект двох досліджених агентів. В клітинах T47D та MDA-MB-231 наявне посилення гліколізу лише в напрямку пентозофосфатного шляху, і при цьому фіксується адитивний ефект дії двох агентів на метаболічні показники.

Такий вплив метформіну на метаболічний профіль оброблених *B. animalis* клітин РМЗ реалізується, вірогідно, завдяки здатності цієї сполуки регулювати функціональну активність сигнального шляху PI3K/Akt/AMPK [218]. У відповідь на метаболічні зміни, які індукує метформін в клітинах РМЗ активується потужний регулятор метаболізму пухлинних клітин AMPK [219]. Цей фермент регулює шляхи метаболізму глюкози в клітині, активуючі гліколіз та/або пентозофосфатний шлях для відновлення енергетичного балансу та підтримки клітинних функцій.

Отримані результати дозволяють припустити, що в клітинах ліній T47D та MDA-MB-231 оброблених *B. animalis* під дією метформіну енергетичний метаболізм зміщується в бік пентозофосфатного шляху як адаптивна відповідь на оксидативний стрес. В клітинах MCF-7 оброблених *B. animalis* і метформіном посилення анаеробного гліколізу супроводжувалось посиленням антипроліферативної дії метформіну на ці клітин. Такий метаболічний зсув в

клітинах MCF-7 може бути наслідком суттєвих і динамічних змін експресії білків, асоційованих з регуляцією клітинного циклу і апоптозу [220], індукованих комплексним впливом *B. animalis* і метформіну.

Також відомо, що шлях PI3K/Akt/AMPK активується через рецептори інсуліну [221]. Тому, ще одним можливим механізмом модифікації ефектів метформіну біфідобактеріями в клітинах РМЗ може бути вплив *B. animalis* на експресію рецепторів інсуліну в цих клітинах. За результатами наших попередніх досліджень було показано, що співкультивування клітин РМЗ і *B. animalis* призводить до зниження кількості PI^+ клітин і рівня експресії рецептора на клітинах T47D, і навпаки збільшення як кількості PI^+ клітин так і рівня його експресії в клітинах MCF-7.

Отримані результати можуть стати підґрунтям для розробки комбінованих терапевтичних стратегій, що враховують вплив мікробіоти на метаболічні процеси в пухлинному середовищі.

Результати сучасних дослідження проблем хіміотерапії злоякісних новоутворень підкреслюють роль мікробіому в формуванні чутливості пухлинних клітин до протипухлинної терапії [222]. Доведено, що зміна метаболічної активності пухлинних клітин напряду впливає на їх чутливість до дії хіміопрепаратів [5]. В клітинах РМЗ після їх співкультивування з *B. animalis* посилення цитотоксичної дії паклітакселу спостерігали лише для клітин базального підтипу MDA-MB-231. Такі зміни чутливості клітин MDA-MB-231 до дії протипухлинного препарату можуть бути обумовлені порушенням стану їх окисно-відновної системи внаслідок дії паклітакселу [223] і значним навантаженням цієї системи через вплив *B. animalis*. На користь цього припущення свідчить значне підвищення активності Г6ФД лише в тих клітинах MDA-MB-231, які зазнавали комплексного впливу обох агентів. Отримані результати підкреслюють значущість мікробіомного середовища як фактора, здатного модулювати метаболізм пухлинних клітин і впливати на ефективність хіміотерапії.

Зміни метаболічної активності злоякісних клітин безпосередньо впливають на їх біологічні властивості – життєздатність, проліферацію і окисно-відновний

потенціал. Тому, на наступному етапі роботи було досліджено вплив *B. animalis* на проліферацію, продукцію АФК і експресію білків-регуляторів апоптозу в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів.

Аналіз змін рівня АФК в клітинах РМЗ після їх співкультивування з *B. animalis* виявив статистично достовірне підвищення цього показника у всіх досліджених клітинних лініях в 1,4-4,1 рази в порівнянні з інтактними клітинами. Однак, найбільше зростання АФК відзначено у клітинах ліній MDA-MB-231 та MCF-7, що співвідноситься з літературними даними про подібний рівень експресії ферментів системи подвійної оксидази (DUOX) у цих клітинних лініях [158]. Вірогідно, взаємодія клітин РМЗ із поверхневими структурами та секретованими метаболітами *B. animalis* може активувати ферментативну систему подвійної оксидази (DUOX), що супроводжується посиленням утворенням активних форм кисню у злоякісних клітинах [224,225]. Отримані результати дозволяють припустити, що біфідобактерії здатні опосередковано впливати на клітинні сигнальні шляхи через індукцію окисного стресу, що, у свою чергу, може пригнічувати проліферацію [226] та активувати механізми апоптозу [227]. Виявлені зміни активності Г6ФД в клітинах РМЗ після їх співкультивування з *B. animalis* ймовірно пов'язані, з підвищенням рівня АФК в цих клітинах.

Пригнічення експресії маркера проліферації Ki-67 в клітинах РМЗ внаслідок їх співкультивування з *B. animalis* свідчить про антипроліферативний ефект біфідобактерій. Аналіз експресії білків-регуляторів апоптозу виявив ознаки активації програми апоптозу в клітинах РМЗ у відповідь на взаємодію з біфідобактеріями. У всіх досліджуваних лініях було виявлено підвищення експресії проапоптичного білка Вах. В клітинах T47D та MCF-7 додатково встановлено зростання ядерної експресії білка p21^{Waf1}, що є свідченням активації онкосупресорних механізмів цього білка [228]. Саме підвищення експресії p21^{Waf1} на фоні збільшення співвідношення Вах/Bcl-2 спостерігалось в клітинах T47D та MCF-7 після їх співкультивування з *B. animalis*. Особливо важливим є встановлений факт транслокації білка p21^{Waf1} із цитоплазми до ядра в клітинах T47D після співкультивування з *B. animalis*, що є характерною ознакою переходу

функції цього білка до активації апоптозу та блокади клітинного циклу [228]. В клітинах MDA-MB-231 спостерігалось підвищення експресії як Вах, так і антиапоптичного білка Bcl-2 на фоні зниження ядерної експресії p21^{Waf1}, що свідчить про активацію одночасних, протилежно спрямованих процесів апоптозу та виживання [228,229].

Отримані в даній роботі результати свідчать, що співкультивування клітин РМЗ з *Bifidobacterium animalis* призводить до ремоделювання шляхів метаболізму глюкози злоякісно трансформованих клітин у бік посилення гліколізу і його ланки – пентозофосфатного шляху. При цьому *Bifidobacterium animalis* впливають не лише на біохімічні ланки метаболізму глюкози, але і сигнальні шляхи, модулюючи рівень експресії транспортера глюкози GLUT1, транскрипційного фактору STAT6 і рецепторів інсуліну. Такі зміни метаболічного профілю клітин РМЗ призводять до модифікації їх чутливості до модуляторів гліколізу і протипухлинних препаратів. Також, описані вище зміни супроводжуються пригніченням проліферативної активності, зміною балансу між про- і антиапоптичними білками, активацією апоптотичних сигнальних шляхів та підвищенням продукції АФК в клітинах РМЗ різних молекулярних підтипів.

Отримані результати вказують на здатність *B. animalis* виступати впливовим регулятором метаболізму глюкози в пухлинних клітинах, що робить їх важливим учасником злоякісного процесу. Надзвичайно важливим є те, що в залежності від молекулярного підтипу клітин РМЗ і вихідних характеристик їх метаболічного профілю модифікуючий вплив *B.animalis* на біологічні властивості і метаболічну активність злоякісно трансформованих клітин може бути різноспрямованим.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено вирішення важливого питання експериментальної онкології: 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.

1. Встановлено особливості ростових характеристик *B. animalis* в поживному середовищі, оптимальному для культивування культури клітин РМЗ: тривалість lag-фази становить 2-6 годин, log-фази – 24 години, при якій кількість життєздатних клітин біфідобактерій досягає максимальної концентрації, а через 72 години інкубації починає знижуватись.

2. Визначені параметри експериментальної моделі співкультивування *B. animalis* і клітин РМЗ *in vitro*: пряма взаємодія еукаріотичних і бактеріальних клітин при рекомендованому початковому співвідношенні клітин 1/100-1/400; тривалість інкубації клітин 48 годин в умовах стандартних для культур еукаріотичних клітин; контроль кінетики росту клітин обох типів; оцінка концентрації глюкози і лактату в поживному середовищі.

3. Показано, що за умов співкультивування клітин РМЗ з *B. animalis* тривалість окремих фаз розвитку бактеріальної популяції не змінюється, однак, зафіксовано підвищення загального приросту біомаси біфідобактерій у присутності клітин РМЗ на 20-30% в порівнянні з ростом *B. animalis* окремо. При цьому статистично значуще зменшення кількості живих клітин РМЗ ($p < 0,05$) спостерігали лише через 48 годин співкультивування.

4. Доведено, що співкультивування клітин РМЗ з *B. animalis* призводить до статистично достовірного ($p < 0,05$) підвищення швидкості споживання глюкози в 1,2 – 4,7 рази і продукції лактату на 15,0 – 115,0%, а також активності ЛДГ на 15,0 – 160,0% в клітинах РМЗ відносно інтактних клітин. Найбільш виражені зміни спостерігали в клітинах РМЗ люмінального підтипу.

5. Показано, що *B. animalis* впливає на метаболізм глюкози в клітинах ліній РМЗ різних молекулярних підтипів шляхом підвищення експресії транскрипційного фактора STAT6 на 27 – 82% ($p < 0,05$), транспортера глюкози GLUT1 на 30-80% ($p < 0,05$) лише в клітинах люмінального підтипу та різнонаправлено модулює експресію рецептора інсуліну в досліджених клітинних лініях.

6. Встановлено, що співкультивування клітин РМЗ всіх молекулярних підтипів з *B. animalis* призводить до статистично достовірного ($p < 0,05$) зниження експресії маркера проліферації Ki-67 на 45-60%, а в клітинах люмінального підтипу до підвищення експресії проапоптичних білків Bax (у 2-5 разів) і p21^{Waf1} (у 2 рази) в порівнянні з інтактними клітинами.

7. Виявлено посилення антигліколітичної дії 2-ДГ в клітинах люмінального підтипу T47D та MCF-7 внаслідок їх співкультивування з *B. animalis* про що свідчить статистично достовірне зниження швидкості споживання глюкози на 20-30% і продукції лактату на 17%, в порівнянні з дією 2-ДГ у монорежимі. Описаний ефект підтверджується підвищенням чутливості клітин оброблених *B. animalis* до цитотоксичної дії 2-ДГ у 2 рази в порівнянні з інтактними клітинами.

8. Доведено, що *B. animalis* впливають на метаболічні ефекти Метформіну в клітинах РМЗ. У клітинах T47D і MDA-MB-231 модифікованих *B. animalis* в присутності Метформіну виявлено зсув метаболічного профілю у бік посилення пентозофосфатного шляху, а в клітинах MCF-7 оброблених *B. animalis* - у бік посилення гліколізу.

9. Показано, що в клітинах РМЗ базального підтипу MDA-MB-231 після співкультивування з *B. animalis* відбувається посилення цитотоксичної дії паклітакселу у порівнянні з клітинами, які інкубували лише з паклітакселем або *B. animalis* на 10% та 26%, відповідно.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Arzanova, E., & Mayrovitz, H. N. (2022). The Epidemiology of Breast Cancer. In Department of Medical Education, Dr. Kiran C. Patel College of Allopathic Medicine, Nova Southeastern University, FL, USA & H. N. Mayrovitz (Eds.), *Breast Cancer* (pp. 1–20). Exon Publications. <https://doi.org/10.36255/exon-publications-breast-cancer-epidemiology>
2. Menon, G., Alkabban, F. M., & Ferguson, T. (2025). Breast Cancer. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482286/>
3. Siegel, R. L., Giaquinto, A. N., & Jemal, A. (2024). Cancer statistics, 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(1), 12–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21820>
4. Gandhi, N., & Das, G. (2019). Metabolic Reprogramming in Breast Cancer and Its Therapeutic Implications. *Cells*, 8(2), 89. <https://doi.org/10.3390/cells8020089>
5. Liu, S., Zhang, X., Wang, W., Li, X., Sun, X., Zhao, Y., Wang, Q., Li, Y., Hu, F., & Ren, H. (2024). Metabolic reprogramming and therapeutic resistance in primary and metastatic breast cancer. *Molecular Cancer*, 23(1), 261. <https://doi.org/10.1186/s12943-024-02165-x>
6. Lin, X., Xiao, Z., Chen, T., Liang, S. H., & Guo, H. (2020). Glucose Metabolism on Tumor Plasticity, Diagnosis, and Treatment. *Frontiers in Oncology*, 10, 317. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00317>
7. Faghfoori, Z., Faghfoori, M. H., Saber, A., Izadi, A., & Yari Khosroushahi, A. (2021). Anticancer effects of bifidobacteria on colon cancer cell lines. *Cancer Cell International*, 21(1), 258. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01971-3>
8. Kim, S., Lee, H. H., Choi, W., Kang, C.-H., Kim, G.-H., & Cho, H. (2022). Anti-Tumor Effect of Heat-Killed Bifidobacterium bifidum on Human Gastric Cancer through Akt-p53-Dependent Mitochondrial Apoptosis in Xenograft Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9788. <https://doi.org/10.3390/ijms23179788>
9. Meng, H., Ba, Z., Lee, Y., Peng, J., Lin, J., Fleming, J. A., Furumoto, E. J., Roberts, R. F., Kris-Etherton, P. M., & Rogers, C. J. (2017). Consumption of Bifidobacterium animalis subsp. Lactis BB-12 in yogurt reduced expression of TLR-2 on peripheral blood-

- derived monocytes and pro-inflammatory cytokine secretion in young adults. *European Journal of Nutrition*, 56(2), 649–661. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-1109-5>
10. Mizuta, M., Endo, I., Yamamoto, S., Inokawa, H., Kubo, M., Udaka, T., Sogabe, O., Maeda, H., Shirakawa, K., Okazaki, E., Odamaki, T., Abe, F., & Xiao, J. (2016). Perioperative supplementation with bifidobacteria improves postoperative nutritional recovery, inflammatory response, and fecal microbiota in patients undergoing colorectal surgery: A prospective, randomized clinical trial. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 35(2), 77–87. <https://doi.org/10.12938/bmfh.2015-017>
 11. Zaharuddin, L., Mokhtar, N. M., Muhammad Nawawi, K. N., & Raja Ali, R. A. (2019). A randomized double-blind placebo-controlled trial of probiotics in post-surgical colorectal cancer. *BMC Gastroenterology*, 19(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s12876-019-1047-4>
 12. Srivastava, A., & Vinod, P. K. (2025). A single-cell network approach to decode metabolic regulation in gynecologic and breast cancers. *Npj Systems Biology and Applications*, 11(1), 26. <https://doi.org/10.1038/s41540-025-00506-0>
 13. Wang, Z., Jiang, Q., & Dong, C. (2020). Metabolic reprogramming in triple-negative breast cancer. *Cancer Biology and Medicine*, 17(1), 44–59. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0210>
 14. Blanchet, F., Rault, L., Peton, V., Le Loir, Y., Blondeau, C., Lenoir, L., Dubourdeaux, M., & Even, S. (2021). Heat inactivation partially preserved barrier and immunomodulatory effects of *Lactobacillus gasseri* LA806 in an *in vitro* model of bovine mastitis. *Beneficial Microbes*, 12(1), 95–106. <https://doi.org/10.3920/BM2020.0146>
 15. Castro-Herrera, V. M., Rasmussen, C., Wellejus, A., Miles, E. A., & Calder, P. C. (2020). In Vitro Effects of Live and Heat-Inactivated *Bifidobacterium animalis* Subsp. Lactis, BB-12 and *Lactobacillus rhamnosus* GG on Caco-2 Cells. *Nutrients*, 12(6), 1719. <https://doi.org/10.3390/nu12061719>
 16. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
 17. Bose, S., Zhang, C., & Le, A. (2021). Glucose Metabolism in Cancer: The Warburg Effect and Beyond. In A. Le (Ed.), *The Heterogeneity of Cancer Metabolism* (Vol. 1311,

pp. 3–15). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65768-0_1

18. Chandel, N. S. (2021). Glycolysis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(5), a040535. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040535>

19. Bukkuri, A., Gatenby, R. A., & Brown, J. S. (2022). GLUT1 production in cancer cells: A tragedy of the commons. *Npj Systems Biology and Applications*, 8(1), 22. <https://doi.org/10.1038/s41540-022-00229-6>

20. Chen, J., Huang, Z., Chen, Y., Tian, H., Chai, P., Shen, Y., Yao, Y., Xu, S., Ge, S., & Jia, R. (2025). Lactate and lactylation in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 10(1), 38. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-02082-x>

21. Kim, E. Y., Abides, J., Keller, C. R., Martinez, S. R., & Li, W. (2025). Tumor Microenvironment Lactate: Is It a Cancer Progression Marker, Immunosuppressant, and Therapeutic Target? *Molecules*, 30(8), 1763. <https://doi.org/10.3390/molecules30081763>

22. Kim, D., Kesavan, R., Ryu, K., Dey, T., Marckx, A., Menezes, C., Praharaj, P. P., Morley, S., Ko, B., Soflaee, M. H., Tom, H. J., Brown, H., Vu, H. S., Tso, S.-C., Brautigam, C. A., Lemoff, A., Mettlen, M., Mishra, P., Cai, F., ... Hoxhaj, G. (2025). Mitochondrial NADPH fuels mitochondrial fatty acid synthesis and lipoylation to power oxidative metabolism. *Nature Cell Biology*, 27(5), 790–800. <https://doi.org/10.1038/s41556-025-01655-4>

23. Liu, C.-L., Hsu, Y.-C., Lee, J.-J., Chen, M.-J., Lin, C.-H., Huang, S.-Y., & Cheng, S.-P. (2020). Targeting the pentose phosphate pathway increases reactive oxygen species and induces apoptosis in thyroid cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 499, 110595. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110595>

24. Alfarouk, K. O., Ahmed, S. B. M., Elliott, R. L., Benoit, A., Alqahtani, S. S., Ibrahim, M. E., Bashir, A. H. H., Alhoufie, S. T. S., Elhassan, G. O., Wales, C. C., Schwartz, L. H., Ali, H. S., Ahmed, A., Forde, P. F., Devesa, J., Cardone, R. A., Fais, S., Harguindey, S., & Reshkin, S. J. (2020). The Pentose Phosphate Pathway Dynamics in Cancer and Its Dependency on Intracellular pH. *Metabolites*, 10(7), 285. <https://doi.org/10.3390/metabo10070285>

25. Giacomini, I., Ragazzi, E., Pasut, G., & Montopoli, M. (2020). The Pentose Phosphate Pathway and Its Involvement in Cisplatin Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 937. <https://doi.org/10.3390/ijms21030937>
26. Qiao, J., Yu, Z., Zhou, H., Wang, W., Wu, H., & Ye, J. (2025). The Pentose Phosphate Pathway: From Mechanisms to Implications for Gastrointestinal Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(2), 610. <https://doi.org/10.3390/ijms26020610>
27. Lyu, H., Bao, S., Cai, L., Wang, M., Liu, Y., Sun, Y., & Hu, X. (2025). The role and research progress of serine metabolism in tumor cells. *Frontiers in Oncology*, 15, 1509662. <https://doi.org/10.3389/fonc.2025.1509662>
28. Tufail, M., Jiang, C.-H., & Li, N. (2024). Altered metabolism in cancer: Insights into energy pathways and therapeutic targets. *Molecular Cancer*, 23(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s12943-024-02119-3>
29. Fontana, F., Giannitti, G., Marchesi, S., & Limonta, P. (2024). The PI3K/Akt Pathway and Glucose Metabolism: A Dangerous Liaison in Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 20(8), 3113–3125. <https://doi.org/10.7150/ijbs.89942>
30. Smiles, W. J., Ovens, A. J., Oakhill, J. S., & Kofler, B. (2024). The metabolic sensor AMPK: Twelve enzymes in one. *Molecular Metabolism*, 90, 102042. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2024.102042>
31. Kierans, S. J., Fagundes, R. R., Malkov, M. I., Sparkes, R., Dillon, E. T., Smolenski, A., Faber, K. N., & Taylor, C. T. (2023). Hypoxia induces a glycolytic complex in intestinal epithelial cells independent of HIF-1-driven glycolytic gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(35). <https://doi.org/10.1073/pnas.2208117120>
32. Szwed, A., Kim, E., & Jacinto, E. (2021). Regulation and metabolic functions of mTORC1 and mTORC2. *Physiological Reviews*, 101(3), 1371–1426. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2020>
33. Zhao, J., Jin, D., Huang, M., Ji, J., Xu, X., Wang, F., Zhou, L., Bao, B., Jiang, F., Xu, W., Lu, X., & Xiao, M. (2024). Glycolysis in the tumor microenvironment: A driver of cancer progression and a promising therapeutic target. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 12, 1416472. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1416472>

34. Zhi, S., Chen, C., Huang, H., Zhang, Z., Zeng, F., & Zhang, S. (2024). Hypoxia-inducible factor in breast cancer: Role and target for breast cancer treatment. *Frontiers in Immunology*, 15, 1370800. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1370800>
35. Koo, K. Y., Moon, K., Song, H. S., & Lee, M.-S. (2025). Metabolic regulation by p53: Implications for cancer therapy. *Molecules and Cells*, 48(4), 100198. <https://doi.org/10.1016/j.mocell.2025.100198>
36. Silva, A., Cerqueira, M. C., Rosa, B., Sobral, C., Pinto-Ribeiro, F., Costa, M. F., Baltazar, F., & Afonso, J. (2023). Prognostic Value of Monocarboxylate Transporter 1 Overexpression in Cancer: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5141. <https://doi.org/10.3390/ijms24065141>
37. Xie, Y., Xie, F., Zhou, X., Zhang, L., Yang, B., Huang, J., Wang, F., Yan, H., Zeng, L., Zhang, L., & Zhou, F. (2022). Microbiota in Tumors: From Understanding to Application. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 9(21), e2200470. <https://doi.org/10.1002/advs.202200470>
38. Yang, L., Li, A., Wang, Y., & Zhang, Y. (2023). Intratumoral microbiota: Roles in cancer initiation, development and therapeutic efficacy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 35. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01304-4>
39. Chekhun, V., Martynyuk, O., Lukianova, Ye., Mushii, O., Zadvornyi, T., & Lukianova, N. (2023). FEATURES OF BREAST CANCER IN PATIENTS OF YOUNG AGE: SEARCH FOR DIAGNOSIS OPTIMIZATION AND PERSONALIZED TREATMENT. *Experimental Oncology*, 45(2), 139–150. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2023.02.139>
40. Nejman, D., Livyatan, I., Fuks, G., Gavert, N., Zwang, Y., Geller, L. T., Rotter-Maskowitz, A., Weiser, R., Mallel, G., Gigi, E., Meltser, A., Douglas, G. M., Kamer, I., Gopalakrishnan, V., Dadosh, T., Levin-Zaidman, S., Avnet, S., Atlan, T., Cooper, Z. A., ... Straussman, R. (2020). The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. *Science*, 368(6494), 973–980. <https://doi.org/10.1126/science.aay9189>
41. Wang, H., Rong, X., Zhao, G., Zhou, Y., Xiao, Y., Ma, D., Jin, X., Wu, Y., Yan, Y., Yang, H., Zhou, Y., Qian, M., Niu, C., Hu, X., Li, D.-Q., Liu, Q., Wen, Y., Jiang, Y.-Z.,

- Zhao, C., & Shao, Z.-M. (2022). The microbial metabolite trimethylamine N-oxide promotes antitumor immunity in triple-negative breast cancer. *Cell Metabolism*, 34(4), 581-594.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.02.010>
42. Geller, L. T., Barzily-Rokni, M., Danino, T., Jonas, O. H., Shental, N., Nejman, D., Gavert, N., Zwang, Y., Cooper, Z. A., Shee, K., Thaiss, C. A., Reuben, A., Livny, J., Avraham, R., Frederick, D. T., Ligorio, M., Chatman, K., Johnston, S. E., Mosher, C. M., ... Straussman, R. (2017). Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science (New York, N.Y.)*, 357(6356), 1156–1160. <https://doi.org/10.1126/science.aah5043>
43. Liu, H., Du, J., Chao, S., Li, S., Cai, H., Zhang, H., Chen, G., Liu, P., & Bu, P. (2022). *Fusobacterium nucleatum* Promotes Colorectal Cancer Cell to Acquire Stem Cell-Like Features by Manipulating Lipid Droplet-Mediated Numb Degradation. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 9(12), e2105222. <https://doi.org/10.1002/advs.202105222>
44. Ma, W., Zhang, L., Chen, W., Chang, Z., Tu, J., Qin, Y., Yao, Y., Dong, M., Ding, J., Li, S., Li, F., Deng, Q., Yang, Y., Feng, T., Zhang, F., Shao, X., He, X., Zhang, L., Hu, G., ... Liu, S. (2024). Microbiota enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-secreted BFT-1 promotes breast cancer cell stemness and chemoresistance through its functional receptor NOD1. *Protein & Cell*, 15(6), 419–440. <https://doi.org/10.1093/procel/pwae005>
45. Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2019). Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in Nutrition*, 10, S49–S66. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>
46. Álvarez-Mercado, A. I., Del Valle Cano, A., Fernández, M. F., & Fontana, L. (2023). Gut Microbiota and Breast Cancer: The Dual Role of Microbes. *Cancers*, 15(2), 443. <https://doi.org/10.3390/cancers15020443>
47. Luo, R., Yao, Y., Chen, Z., & Sun, X. (2025). An examination of the LPS-TLR4 immune response through the analysis of molecular structures and protein–protein interactions. *Cell Communication and Signaling*, 23(1), 142. <https://doi.org/10.1186/s12964-025-02149-4>

48. Rahman, Md. M., Islam, Md. R., Shohag, S., Ahasan, Md. T., Sarkar, N., Khan, H., Hasan, A. M., Cavalu, S., & Rauf, A. (2022). Microbiome in cancer: Role in carcinogenesis and impact in therapeutic strategies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 149, 112898. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112898>
49. Lin, L., & Zhang, D. (2025). Unveiling the microbial influence: Bacteria's dual role in tumor metastasis. *Frontiers in Oncology*, 15, 1524887. <https://doi.org/10.3389/fonc.2025.1524887>
50. Terrisse, S., Derosa, L., Iebba, V., Ghiringhelli, F., Vaz-Luis, I., Kroemer, G., Fidelle, M., Christodoulidis, S., Segata, N., Thomas, A. M., Martin, A.-L., Sirven, A., Everhard, S., Aprahamian, F., Nirmalathasan, N., Aarnoutse, R., Smidt, M., Ziemons, J., Caldas, C., ... Zitvogel, L. (2021). Intestinal microbiota influences clinical outcome and side effects of early breast cancer treatment. *Cell Death & Differentiation*, 28(9), 2778–2796. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00784-1>
51. Chen, S., Xu, Y., Zhuo, W., & Zhang, L. (2024). The emerging role of lactate in tumor microenvironment and its clinical relevance. *Cancer Letters*, 590, 216837. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.216837>
52. Liu, H., Pan, M., Liu, M., Zeng, L., Li, Y., Huang, Z., Guo, C., & Wang, H. (2024). Lactate: A rising star in tumors and inflammation. *Frontiers in Immunology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1496390>
53. Tan, S., Zhou, F., & Wu, X. (2025). Lactate-Mediated Crosstalk Between Tumor Cells and Cancer-Associated Fibroblasts: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(12), 5583. <https://doi.org/10.3390/ijms26125583>
54. El-Sayed, A. S. A., Mohamed, N. Z., Yassin, M. A., Amer, M. M., El-Sharkawy, R., El-Sayed, N., & Ali, M. G. (2022). Microbial cytosine deaminase is a programmable anticancer prodrug mediating enzyme: Antibody, and gene directed enzyme prodrug therapy. *Heliyon*, 8(9), e10660. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10660>
55. Krishnamurthy, H. K., Pereira, M., Bosco, J., George, J., Jayaraman, V., Krishna, K., Wang, T., Bei, K., & Rajasekaran, J. J. (2023). Gut commensals and their metabolites in

- health and disease. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1244293. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1244293>
56. Shen, Y., Gao, Y., Yang, G., Zhao, Z., Zhao, Y., Gao, L., & Li, S. (2025). Anti-colorectal cancer effect of total minor ginsenosides produced by lactobacilli transformation of major ginsenosides by inducing apoptosis and regulating gut microbiota. *Frontiers in Pharmacology*, *15*, 1496346. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1496346>
57. Ahmad, M. F., Ahmad, F. A., Alsayegh, A. A., Zeyauallah, Md., Babalghith, A. O., Faidah, H., Ahmed, F., Khanam, A., Mozaffar, B., Kambal, N., & Bantun, F. (2025). Probiotics and Cancer: Mechanistic Insights and Organ-Specific Impact. *Biomolecules*, *15*(6), 879. <https://doi.org/10.3390/biom15060879>
58. Sharma, A., Sharma, G., & Im, S.-H. (2025). Gut microbiota in regulatory T cell generation and function: Mechanisms and health implications. *Gut Microbes*, *17*(1), 2516702. <https://doi.org/10.1080/19490976.2025.2516702>
59. Xue, X., Li, R., Chen, Z., Li, G., Liu, B., Guo, S., Yue, Q., Yang, S., Xie, L., Zhang, Y., Zhao, J., & Tan, R. (2023). The role of the symbiotic microecosystem in cancer: Gut microbiota, metabolome, and host immunome. *Frontiers in Immunology*, *14*, 1235827. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1235827>
60. Gazzaniga, F. S., & Kasper, D. L. (2025). The gut microbiome and cancer response to immune checkpoint inhibitors. *Journal of Clinical Investigation*, *135*(3), e184321. <https://doi.org/10.1172/JCI184321>
61. Fidelle, M., Rauber, C., Alves Costa Silva, C., Tian, A.-L., Lahmar, I., De La Varenne, A.-L. M., Zhao, L., Thelemaque, C., Lebhar, I., Messaoudene, M., Pizzato, E., Birebent, R., Mbogning Fonkou, M. D., Zoppi, S., Reni, A., Dalban, C., Leduc, M., Ferrere, G., Durand, S., ... Zitvogel, L. (2023). A microbiota-modulated checkpoint directs immunosuppressive intestinal T cells into cancers. *Science*, *380*(6649), eabo2296. <https://doi.org/10.1126/science.abo2296>
62. Colbert, L. E., El Alam, M. B., Wang, R., Karpinets, T., Lo, D., Lynn, E. J., Harris, T. A., Elnaggar, J. H., Yoshida-Court, K., Tomasic, K., Bronk, J. K., Sammour, J., Yanamandra, A. V., Olvera, A. V., Carlin, L. G., Sims, T., Delgado Medrano, A. Y.,

- Naprávník, T. C., O'Hara, M., ... Klopp, A. H. (2023). Tumor-resident *Lactobacillus* iners confer chemoradiation resistance through lactate-induced metabolic rewiring. *Cancer Cell*, 41(11), 1945-1962.e11. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.09.012>
63. Zmora, N., Zilberman-Schapira, G., Suez, J., Mor, U., Dori-Bachash, M., Bashiardes, S., Kotler, E., Zur, M., Regev-Lehavi, D., Brik, R. B.-Z., Federici, S., Cohen, Y., Linevsky, R., Rothschild, D., Moor, A. E., Ben-Moshe, S., Harmelin, A., Itzkovitz, S., Maharshak, N., ... Elinav, E. (2018). Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features. *Cell*, 174(6), 1388-1405.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.041>
64. He, R., Qi, P., Shu, L., Ding, Y., Zeng, P., Wen, G., Xiong, Y., & Deng, H. (2025). Dysbiosis and extraintestinal cancers. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 44(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s13046-025-03313-x>
65. Khorashadizadeh, S., Abbasifar, S., Yousefi, M., Fayedeh, F., & Moodi Ghalibaf, A. (2024). The Role of Microbiome and Probiotics in Chemo-Radiotherapy-Induced Diarrhea: A Narrative Review of the Current Evidence. *Cancer Reports*, 7(10), e70029. <https://doi.org/10.1002/cnr2.70029>
66. Lages, P. C., Generoso, S. V., & Correia, M. I. T. D. (2018). Postoperative symbiotic in patients with head and neck cancer: A double-blind randomised trial. *British Journal of Nutrition*, 119(2), 190–195. <https://doi.org/10.1017/S0007114517003403>
67. D'Amico, F., Perrone, A. M., Rampelli, S., Coluccelli, S., Barone, M., Ravegnini, G., Fabbrini, M., Brigidi, P., De Iaco, P., & Turrone, S. (2021). Gut Microbiota Dynamics during Chemotherapy in Epithelial Ovarian Cancer Patients Are Related to Therapeutic Outcome. *Cancers*, 13(16), 3999. <https://doi.org/10.3390/cancers13163999>
68. Li, Z., Wang, Q., Huang, X., Yang, M., Zhou, S., Li, Z., Fang, Z., Tang, Y., Chen, Q., Hou, H., Li, L., Fei, F., Wang, Q., Wu, Y., & Gong, A. (2023). Lactate in the tumor microenvironment: A rising star for targeted tumor therapy. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1113739. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1113739>
69. Mathew, M., Nguyen, N., Bhutia, Y., Sivaprakasam, S., & Ganapathy, V. (2024). Metabolic Signature of Warburg Effect in Cancer: An Effective and Obligatory Interplay

- between Nutrient Transporters and Catabolic/Anabolic Pathways to Promote Tumor Growth. *Cancers*, *16*(3), 504. <https://doi.org/10.3390/cancers16030504>
70. Ma, L., Liu, W., Xu, A., Ji, Q., Ma, Y., Tai, Y., Wang, Y., Shen, C., Liu, Y., Wang, T., Han, J., & Zhao, C. (2020). Activator of thyroid and retinoid receptor increases sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma by facilitating the Warburg effect. *Cancer Science*, *111*(6), 2028–2040. <https://doi.org/10.1111/cas.14412>
71. Zhang, J., Zou, S., & Fang, L. (2023). Metabolic reprogramming in colorectal cancer: Regulatory networks and therapy. *Cell & Bioscience*, *13*(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s13578-023-00977-w>
72. Lykhova, O., Zavelevich, M., Philchenkov, A., Vidasov, N., Kozak, T., Lozovska, Y., Andrusyshyna, I., Bishayee, A., Borikun, T., Lukianova, N., & Chekhun, V. (2023). Does insulin make breast cancer cells resistant to doxorubicin toxicity? *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *396*(11), 3111–3122. <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02516-3>
73. Hayashi, M., Nakamura, K., Harada, S., Tanaka, M., Kobayashi, A., Saito, H., Tsuji, T., Yamamoto, D., Moriyama, H., Kinoshita, J., & Inaki, N. (2025). GLUT1 inhibition by BAY-876 induces metabolic changes and cell death in human colorectal cancer cells. *BMC Cancer*, *25*(1), 716. <https://doi.org/10.1186/s12885-025-14141-9>
74. Mao, Y., Xia, Z., Xia, W., & Jiang, P. (2024). Metabolic reprogramming, sensing, and cancer therapy. *Cell Reports*, *43*(12), 115064. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.115064>
75. Yang, L., Li, S., Yu, L., Leng, J., & Li, N. (2025). Targeting glycolysis: Exploring a new frontier in glioblastoma therapy. *Frontiers in Immunology*, *15*, 1522392. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1522392>
76. Pajak, B., Siwiak, E., Sołtyka, M., Priebe, A., Zieliński, R., Fokt, I., Ziemniak, M., Jaśkiewicz, A., Borowski, R., Domoradzki, T., & Priebe, W. (2019). 2-Deoxy-d-Glucose and Its Analogs: From Diagnostic to Therapeutic Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(1), 234. <https://doi.org/10.3390/ijms21010234>
77. Defenouillère, Q., Verraes, A., Laussel, C., Friedrich, A., Schacherer, J., & Léon, S. (2019). The induction of HAD-like phosphatases by multiple signaling pathways confers

resistance to the metabolic inhibitor 2-deoxyglucose. *Science Signaling*, 12(597), eaaw8000. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaw8000>

78. Jin, J., Byun, J.-K., Choi, Y.-K., & Park, K.-G. (2023). Targeting glutamine metabolism as a therapeutic strategy for cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, 55(4), 706–715. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-00971-9>

79. Cui, Y., Li, C., Sang, F., Cao, W., Qin, Z., & Zhang, P. (2022). Natural products targeting glycolytic signaling pathways-an updated review on anti-cancer therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 1035882. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1035882>

80. Gao, J., Zhao, Y., Li, T., Gan, X., & Yu, H. (2022). The Role of PKM2 in the Regulation of Mitochondrial Function: Focus on Mitochondrial Metabolism, Oxidative Stress, Dynamic, and Apoptosis. PKM2 in Mitochondrial Function. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022(1), 7702681. <https://doi.org/10.1155/2022/7702681>

81. Muhammad, S. N. H., Ramli, R. R., Nik Mohamed Kamal, N. N. S., & Fauzi, A. N. (2024). Terpenoids: Unlocking Their Potential on Cancer Glucose Metabolism. *Phytotherapy Research*, 38(12), 5626–5640. <https://doi.org/10.1002/ptr.8346>

82. Matsumoto, K., Noda, T., Kobayashi, S., Sakano, Y., Yokota, Y., Iwagami, Y., Yamada, D., Tomimaru, Y., Akita, H., Gotoh, K., Takeda, Y., Tanemura, M., Umeshita, K., Doki, Y., & Eguchi, H. (2021). Inhibition of glycolytic activator PFKFB3 suppresses tumor growth and induces tumor vessel normalization in hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, 500, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.12.011>

83. Dai, Y., Liu, Y., Li, J., Jin, M., Yang, H., & Huang, G. (2022). Shikonin inhibited glycolysis and sensitized cisplatin treatment in non-small cell lung cancer cells via the exosomal pyruvate kinase M2 pathway. *Bioengineered*, 13(5), 13906–13918. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2086378>

84. Martin, S. P., Fako, V., Dang, H., Dominguez, D. A., Khatib, S., Ma, L., Wang, H., Zheng, W., & Wang, X. W. (2020). PKM2 inhibition may reverse therapeutic resistance to transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01605-y>

85. Pérez-Tomás, R., & Pérez-Guillén, I. (2020). Lactate in the Tumor Microenvironment: An Essential Molecule in Cancer Progression and Treatment. *Cancers*, 12(11), 3244. <https://doi.org/10.3390/cancers12113244>
86. Xing, W., Li, X., Zhou, Y., Li, M., & Zhu, M. (2023). Lactate metabolic pathway regulates tumor cell metastasis and its use as a new therapeutic target. *Exploration of Medicine*, 541–559. <https://doi.org/10.37349/emed.2023.00160>
87. Martínez-Reyes, I., Cardona, L. R., Kong, H., Vasan, K., McElroy, G. S., Werner, M., Kihshen, H., Reczek, C. R., Weinberg, S. E., Gao, P., Steinert, E. M., Piseaux, R., Budinger, G. R. S., & Chandel, N. S. (2020). Mitochondrial ubiquinol oxidation is necessary for tumour growth. *Nature*, 585(7824), 288–292. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2475-6>
88. Duan, G., Qi, M., Xun, L., An, Y., Zuo, Z., Luo, Y., & Song, Z. (2025). Metformin Enhances the Chemosensitivity of Gastric Cancer to Cisplatin by Downregulating Nrf2 Level. *Analytical Cellular Pathology*, 2025(1), 5714423. <https://doi.org/10.1155/ancp/5714423>
89. Pyaskovskaya, O. N., Kolesnik, D. L., Prokhorova, I. V., Burlaka, A. P., Gorbach, O. I., & Solyanik, G. I. (2023). Tumor microenvironment changes tumor cell sensitivity to action of energy metabolism modifiers. *Experimental Oncology*, 42(3), 192–196. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-3.14981>
90. Machado, N. D., Heather, L. C., Harris, A. L., & Higgins, G. S. (2023). Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation: Lessons, advantages, and opportunities. *British Journal of Cancer*, 129(6), 897–899. <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02394-9>
91. Jiang, X., Wang, T., Zhao, B., Sun, H., Dong, Y., Ma, Y., Li, Z., Wu, Y., Wang, K., Guan, X., Long, B., Qin, L., Shi, W., Shi, L., He, Q., Liu, W., Li, M., Xiao, L., Zhou, C., ... Jiao, Z. (2025). KRASG12D-driven pentose phosphate pathway remodeling imparts a targetable vulnerability synergizing with MRTX1133 for durable remissions in PDAC. *Cell Reports Medicine*, 6(2), 101966. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2025.101966>
92. Abdullah, A., Kumbrink, J., Liokatis, P., Mock, A., Abdullah, A., Dewenter, I., & Obermeier, K. T. (2024). The Role of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Skin

- Cancer Metabolism: A Paradigm Shift in Treatment Approaches. *Cancers*, 17(1), 48. <https://doi.org/10.3390/cancers17010048>
93. Nakamura, M., Magara, T., Yoshimitsu, M., Kano, S., Kato, H., Yokota, K., Okuda, K., & Morita, A. (2024). Blockade of glucose-6-phosphate dehydrogenase induces immunogenic cell death and accelerates immunotherapy. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 12(7), e008441. <https://doi.org/10.1136/jitc-2023-008441>
94. Song, J., Sun, H., Zhang, S., & Shan, C. (2022). The Multiple Roles of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Tumorigenesis and Cancer Chemoresistance. *Life*, 12(2), 271. <https://doi.org/10.3390/life12020271>
95. El-Masry, O. S., Brown, B. L., & Dobson, P. R. M. (2019). AMPK Activation of Apoptotic Markers in Human Breast Cancer Cell Lines with Different p53 Backgrounds: MCF-7, MDA-MB-231 and T47D Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 20(12), 3763–3770. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.12.3763>
96. Farhadi, P., Yarani, R., Valipour, E., Kiani, S., Hoseinkhani, Z., & Mansouri, K. (2022). Cell line-directed breast cancer research based on glucose metabolism status. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 146, 112526. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112526>
97. Zare, M. E., Kansestani, A. N., Hemmati, S., Mansouri, K., & Vaisi-Raygani, A. (2021). The rate of aerobic glycolysis is a pivotal regulator of tumor progression. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 20(1), 523–531. <https://doi.org/10.1007/s40200-021-00774-7>
98. Capes-Davis, A., Capes-Davis, A., & Freshney, R. I. (2021). *Freshney's culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications* (Eighth edition). Wiley-Blackwell.
99. Principles of Indirect Co-culture Method Using Transwell. (2024). In M. Rasouli & F. Safari, *Methods in Molecular Biology*. Springer US. https://doi.org/10.1007/7651_2024_537
100. Ishtiah, A. A. (2024). Unlocking the Potential of 3D Spheroid Cultures in Breast Cancer Stem Cell Enrichment and Isolation. *Eurasian Journal of Medicine and Oncology*, 322–335. <https://doi.org/10.14744/ejmo.2024.97120>

101. Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, 111(1). <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>
102. Nilles, J., Weiss, J., & Theile, D. (2022). Crystal Violet Staining is a Reliable Alternative to Bicinchoninic Acid Assay-Based Normalization. *BioTechniques*, 73(3), 131–135. <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0064>
103. Buranaamnuay, K. (2021). The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: A variety of the assay protocols. *Open Veterinary Journal*, 11(2), 251. <https://doi.org/10.5455/ovj.2021.v11.i2.9>
104. Holkem, A. T., Robichaud, V., Favaro-Trindade, C. S., & Lacroix, M. (2021). Chemopreventive Properties of Extracts Obtained from Blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg.) in Combination with Probiotics. *Nutrition and Cancer*, 73(4), 671–685. <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1761986>
105. Kryptou, E., Scortti, M., Grundström, C., Oelker, M., Luisi, B. F., Sauer-Eriksson, A. E., & Vázquez-Boland, J. (2019). Control of Bacterial Virulence through the Peptide Signature of the Habitat. *Cell Reports*, 26(7), 1815-1827.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.073>
106. Stevenson, K., McVey, A. F., Clark, I. B. N., Swain, P. S., & Pilizota, T. (2016). General calibration of microbial growth in microplate readers. *Scientific Reports*, 6(1), 38828. <https://doi.org/10.1038/srep38828>
107. Zhu, S., Campanella, O., & Chen, G. (2021). Estimation of parameters in the Weibull model from microbial survival data obtained under constant conditions with come-up times. *Journal of Food Engineering*, 292, 110364. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110364>
108. Karbowiak, M., Gałek, M., Szydłowska, A., & Zielińska, D. (2022). The Influence of the Degree of Thermal Inactivation of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Their Postbiotics on Aggregation and Adhesion Inhibition of Selected Pathogens. *Pathogens*, 11(11), 1260. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111260>
109. Solyanik, G. I., Kolesnik, D. L., Prokhorova, I. V., Yurchenko, O. V., & Pyaskovskaya, O. N. (2024). Mitochondrial dysfunction significantly contributes to the

sensitivity of tumor cells to anoikis and their metastatic potential. *Heliyon*, 10(12), e32626. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32626>

110. Riisom, M., Jamieson, S. M. F., & Hartinger, C. G. (2023). Critical evaluation of cell lysis methods for metallodrug studies in cancer cells. *Metallomics*, 15(9), mfad048. <https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfad048>

111. Detre, S., Saclani Jotti, G., & Dowsett, M. (1995). A ‘quickscore’ method for immunohistochemical semiquantitation: Validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *Journal of Clinical Pathology*, 48(9), 876–878. <https://doi.org/10.1136/jcp.48.9.876>

112. Angelopoulou, A., Warda, A. K., O’Connor, P. M., Stockdale, S. R., Shkoporov, A. N., Field, D., Draper, L. A., Stanton, C., Hill, C., & Ross, R. P. (2020). Diverse Bacteriocins Produced by Strains From the Human Milk Microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 11, 788. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00788>

113. Laborda-Illanes, A., Sanchez-Alcoholado, L., Dominguez-Recio, M. E., Jimenez-Rodriguez, B., Lavado, R., Comino-Méndez, I., Alba, E., & Queipo-Ortuño, M. I. (2020). Breast and Gut Microbiota Action Mechanisms in Breast Cancer Pathogenesis and Treatment. *Cancers*, 12(9), 2465. <https://doi.org/10.3390/cancers12092465>

114. Moubareck, C. A. (2021). Human Milk Microbiota and Oligosaccharides: A Glimpse into Benefits, Diversity, and Correlations. *Nutrients*, 13(4), 1123. <https://doi.org/10.3390/nu13041123>

115. Wu, H., Ganguly, S., & Tollefsbol, T. O. (2022). Modulating Microbiota as a New Strategy for Breast Cancer Prevention and Treatment. *Microorganisms*, 10(9), 1727. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091727>

116. Pei, B., Peng, S., Huang, C., & Zhou, F. (2024). Bifidobacterium modulation of tumor immunotherapy and its mechanism. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 73(5). <https://doi.org/10.1007/s00262-024-03665-x>

117. Wei, H., Chen, L., Lian, G., Yang, J., Li, F., Zou, Y., Lu, F., & Yin, Y. (2018). Antitumor mechanisms of bifidobacteria (Review). *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8692>

118. Li, Q., Li, Y., Wang, Y., Xu, L., Guo, Y., Wang, Y., Wang, L., & Guo, C. (2021). Oral administration of *Bifidobacterium breve* promotes antitumor efficacy via dendritic cells-derived interleukin 12. *OncoImmunology*, 10(1), 1868122. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1868122>
119. Qi, Y., Yu, L., Tian, F., Zhao, J., & Zhai, Q. (2023). In vitro models to study human gut-microbiota interactions: Applications, advances, and limitations. *Microbiological Research*, 270, 127336. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127336>
120. Wong, W.-Y., Chan, B. D., Cho, P.-T., Leung, T.-W., & Tai, W. C.-S. (2024). Beneficial and immunomodulatory effects of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L137 in normal and acute colitis mice. *Journal of Functional Foods*, 116, 106167. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106167>
121. Cruciani, M., Sandini, S., Etna, M. P., Giacomini, E., Camilli, R., Severa, M., Rizzo, F., Bagnoli, F., Hiscott, J., & Coccia, E. M. (2019). Differential Responses of Human Dendritic Cells to Live or Inactivated *Staphylococcus aureus*: Impact on Cytokine Production and T Helper Expansion. *Frontiers in Immunology*, 10, 2622. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02622>
122. Markowicz, C., Kubiak, P., Grajek, W., & Schmidt, M. T. (2016). Inactivation of *Lactobacillus rhamnosus* GG by fixation modifies its probiotic properties. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(1), 72–82. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0249>
123. Goers, L., Freemont, P., & Polizzi, K. M. (2014). Co-culture systems and technologies: Taking synthetic biology to the next level. *Journal of The Royal Society Interface*, 11(96), 20140065. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0065>
124. Schöpping, M., Gaspar, P., Neves, A. R., Franzén, C. J., & Zeidan, A. A. (2021). Identifying the essential nutritional requirements of the probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium longum* through genome-scale modeling. *Npj Systems Biology and Applications*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41540-021-00207-4>
125. Kozak, T., Lykhova, O., Serhiichuk, T., Bezdieniezhnykh, N., & Chekhun, V. (2023). Optimization Of Experimental Model Systems For Evaluating Reciprocal Influence Of *Bifidobacterium Animalis* And Human Breast Cancer Cells In Vitro.

Experimental Oncology, 45(4), 504–514. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2023.04.504>

126. Козак, Т., Лихова, Олександра, & Безденежних, Н. (2024). Особливості впливу *Bifidobacterium animalis* на життєздатність клітин РМЗ людини *in vitro*. *Матеріали Міжнародної наукової конференції «Єдине здоров'я – 2024»*, 13–14.

127. Jaworska, M., Szczudło, J., Pietrzyk, A., Shah, J., Trojan, S. E., Ostrowska, B., & Kocemba-Pilarczyk, K. A. (2023). The Warburg effect: A score for many instruments in the concert of cancer and cancer niche cells. *Pharmacological Reports*, 75(4), 876–890. <https://doi.org/10.1007/s43440-023-00504-1>

128. Mathew, M., Nguyen, N., Bhutia, Y., Sivaprakasam, S., & Ganapathy, V. (2024). Metabolic Signature of Warburg Effect in Cancer: An Effective and Obligatory Interplay between Nutrient Transporters and Catabolic/Anabolic Pathways to Promote Tumor Growth. *Cancers*, 16(3), 504. <https://doi.org/10.3390/cancers16030504>

129. Tufail, M., Jiang, C.-H., & Li, N. (2024). Altered metabolism in cancer: Insights into energy pathways and therapeutic targets. *Molecular Cancer*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-024-02119-3>

130. Mikó, E., Kovács, T., Sebő, É., Tóth, J., Csonka, T., Ujlaki, G., Sipos, A., Szabó, J., Méhes, G., & Bai, P. (2019). Microbiome—Microbial Metabolome—Cancer Cell Interactions in Breast Cancer—Familiar, but Unexplored. *Cells*, 8(4), 293. <https://doi.org/10.3390/cells8040293>

131. Procaccianti, G., Roggiani, S., Conti, G., Brigidi, P., Turroni, S., & D'Amico, F. (2023). *Bifidobacterium* in anticancer immunochemotherapy: Friend or foe? *Microbiome Research Reports*, 2(4). <https://doi.org/10.20517/mrr.2023.23>

132. Martin, S. D., & McGee, S. L. (2019). A systematic flux analysis approach to identify metabolic vulnerabilities in human breast cancer cell lines. *Cancer & Metabolism*, 7(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s40170-019-0207-x>

133. Le, T. K. C., Hosaka, T., Nguyen, T. T., Kassu, A., Dang, T. O., Tran, H. B., Pham, T. P., Tran, Q. B., Le, T. H. H., & Pham, X. D. (2015). *Bifidobacterium* species lower serum glucose, increase expressions of insulin signaling proteins, and improve adipokine

- profile in diabetic mice. *Biomedical Research*, 36(1), 63–70.
<https://doi.org/10.2220/biomedres.36.63>
134. Biello, F., Platini, F., D'Avanzo, F., Cattrini, C., Mennitto, A., Genestroni, S., Martini, V., Marzullo, P., Aimaretti, G., & Gennari, A. (2021). Insulin/IGF Axis in Breast Cancer: Clinical Evidence and Translational Insights. *Biomolecules*, 11(1), 125.
<https://doi.org/10.3390/biom11010125>
135. Shin, E., & Koo, J. S. (2021). Glucose Metabolism and Glucose Transporters in Breast Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.728759>
136. Hanbazazh, M., Samman, A., Samargandy, S., & Al-Maghrabi, J. (2023). Prognostic value of glucose transporter proteins-1 (GLUT1) in breast carcinoma. *Libyan Journal of Medicine*, 18(1). <https://doi.org/10.1080/19932820.2023.2283953>
137. Zhao, J., Sun, H., Wang, C., & Shang, D. (2024). Breast cancer therapy: From the perspective of glucose metabolism and glycosylation. *Molecular Biology Reports*, 51(1).
<https://doi.org/10.1007/s11033-024-09466-w>
138. Zhu, P., Liu, G., Wang, X., Lu, J., Zhou, Y., Chen, S., Gao, Y., Wang, C., Yu, J., Sun, Y., & Zhou, P. (2022). Transcription factor c-Jun modulates GLUT1 in glycolysis and breast cancer metastasis. *BMC Cancer*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-022-10393-x>
139. Karpathiou, G., Papoudou-Bai, A., Ferrand, E., Dumollard, J. M., & Peoc'h, M. (2021). STAT6: A review of a signaling pathway implicated in various diseases with a special emphasis in its usefulness in pathology. *Pathology - Research and Practice*, 223, 153477. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153477>
140. Li, Y.-J., Zhang, C., Martincuks, A., Herrmann, A., & Yu, H. (2023). STAT proteins in cancer: Orchestration of metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 23(3), 115–134.
<https://doi.org/10.1038/s41568-022-00537-3>
141. He, L. (2020). Metformin and Systemic Metabolism. *Trends in Pharmacological Sciences*, 41(11), 868–881. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.09.001>
142. Hönigova, K., Navratil, J., Peltanova, B., Polanska, H. H., Raudenska, M., & Masarik, M. (2022). Metabolic tricks of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*

- (BBA) - Reviews on Cancer, 1877(3), 188705.
<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188705>
143. Abu Samaan, T. M., Samec, M., Liskova, A., Kubatka, P., & Büsselberg, D. (2019). Paclitaxel's Mechanistic and Clinical Effects on Breast Cancer. *Biomolecules*, 9(12), 789.
<https://doi.org/10.3390/biom9120789>
144. Kaveh Zenjanab, M., Alimohammadvand, S., Doustmihan, A., Kianian, S., Sadeghzadeh Oskouei, B., Mazloomi, M., Akbari, M., & Jahanban-Esfahlan, R. (2024). Paclitaxel for breast cancer therapy: A review on effective drug combination modalities and nano drug delivery platforms. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 95, 105567. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.105567>
145. Scribano, C. M., Wan, J., Esbona, K., Tucker, J. B., Lasek, A., Zhou, A. S., Zasadil, L. M., Molini, R., Fitzgerald, J., Lager, A. M., Laffin, J. J., Correia-Staudt, K., Wisinski, K. B., Tevaarwerk, A. J., O'Regan, R., McGregor, S. M., Fowler, A. M., Chappell, R. J., Bugni, T. S., ... Weaver, B. A. (2021). Chromosomal instability sensitizes patient breast tumors to multipolar divisions induced by paclitaxel. *Science Translational Medicine*, 13(610), eabd4811. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd4811>
146. Ali, T., Li, D., Ponnampurumage, T. N. F., Peterson, A. K., Pandey, J., Fatima, K., Brzezinski, J., Jakusz, J. A. R., Gao, H., Koelsch, G. E., Murugan, D. S., & Peng, X. (2024). Generation of Hydrogen Peroxide in Cancer Cells: Advancing Therapeutic Approaches for Cancer Treatment. *Cancers*, 16(12), 2171.
<https://doi.org/10.3390/cancers16122171>
147. Semreen, M. H., Alniss, H., Cacciatore, S., El-Awady, R., Mousa, M., Almehdi, A. M., El-Huneidi, W., Zerbini, L., & Soares, N. C. (2020). GC–MS based comparative metabolomic analysis of MCF-7 and MDA-MB-231 cancer cells treated with Tamoxifen and/or Paclitaxel. *Journal of Proteomics*, 225, 103875.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103875>
148. Kozak, T., Lykhova, O., & Bezdieniezhnykh, N. (2025). The increase in sensitivity of ER+PR+ breast cancer cells to 2-deoxyglucose as a result of co-cultivation with *Bifidobacterium animalis in vitro*. Y *Proceedings of the 14th International scientific and practical conference «Transformations of the individual and society: challenges of the*

- future»* (Tokyo, Japan, April 08-11, 2025), 46–48.
<https://doi.org/10.46299/ISG.2025.1.14>
149. Kozak, T., Lykhova, O., & Chekhun, V. (2025). Reprogramming of glucose metabolism in human breast cancer cells after co-cultivation with *Bifidobacterium animalis*. *Experimental Oncology*, 47(1), 3–15. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2025.01.003>
150. Kozak, T. P., Lykhova, O. O., Virych, P. A., & Chekhun, V. F. (2025). Modification of breast cancer cells' sensitivity to metformin due to co-cultivation with B. animalis. *Biotechnologia Acta*, 18(2), 54–56. <https://doi.org/10.15407/biotech18.02.054>
151. Козак, Т., Лихова, О., Безденєжних, Н., & Чехун, В. (2024). Зміни метаболізму глюкози в клітинах РМЗ людини після їх співкультивування з *Bifidobacterium animalis* in vitro. *Book of Abstracts Contains the Materials of the 7 Th Congress of the All-Ukrainian Public Organization «Ukrainian Society of Cell Biology» with International Representation*, 38. <https://doi.org/10.30970/uscb.2024>
152. Козак, Т., & Лихова, О. (2025). *Bifidobacterium animalis* and metformin as modifiers of glucose metabolism by breast cancer cells in vitro. In *Advancements in Life Sciences: Proceedings of the XXII International Scientific Conference of Students and Young Scientists «Shevchenko Spring»*, 185–187.
153. Lasorsa, F., Di Meo, N. A., Rutigliano, M., Ferro, M., Terracciano, D., Tataru, O. S., Battaglia, M., Ditunno, P., & Lucarelli, G. (2023). Emerging Hallmarks of Metabolic Reprogramming in Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 910. <https://doi.org/10.3390/ijms24020910>
154. Zakic, T., Pekovic-Vaughan, V., Cvoro, A., Korac, A., Jankovic, A., & Korac, B. (2023). Redox and metabolic reprogramming in breast cancer and cancer-associated adipose tissue. *FEBS Letters*. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14794>
155. Karimi Ardestani, S., Tafvizi, F., & Tajabadi Ebrahimi, M. (2019). Heat-killed probiotic bacteria induce apoptosis of HT-29 human colon adenocarcinoma cell line via the regulation of Bax/Bcl2 and caspases pathway. *Human & Experimental Toxicology*, 38(9), 1069–1081. <https://doi.org/10.1177/0960327119851255>

156. Meng, Z., Ye, Z., Zhu, P., Zhu, J., Fang, S., Qiu, T., Li, Y., & Meng, L. (2022). New Developments and Opportunities of Microbiota in Treating Breast Cancers. *Frontiers in Microbiology*, 13, 818793. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.818793>
157. Khan, A. Q., Rashid, K., AlAmodi, A. A., Agha, M. V., Akhtar, S., Hakeem, I., Raza, S. S., & Uddin, S. (2021). Reactive oxygen species (ROS) in cancer pathogenesis and therapy: An update on the role of ROS in anticancer action of benzophenanthridine alkaloids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 143, 112142. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112142>
158. Fortunato, R. S., Gomes, L. R., Munford, V., Pessoa, C. F., Quinet, A., Hecht, F., Kajitani, G. S., Milito, C. B., Carvalho, D. P., & Menck, C. F. M. (2018). DUOX1 Silencing in Mammary Cell Alters the Response to Genotoxic Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/3570526>
159. Gopalakrishnan, V., Helmink, B. A., Spencer, C. N., Reuben, A., & Wargo, J. A. (2018). The Influence of the Gut Microbiome on Cancer, Immunity, and Cancer Immunotherapy. *Cancer Cell*, 33(4), 570–580. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.015>
160. Kozak, T., & Lykhova, O. (2024). Suppression of proliferation and increased of pro-apoptotic proteins expression in human breast cancer cells after their co-cultivation with *Bifidobacterium animalis in vitro*. *Oncology*, 25(1), 29–37. <https://doi.org/10.15407/oncology.2024.01.029>
161. Shvets, Yu. V., Lykhova, O. O., & Chekhun, V. F. (2023). Human microbiota and breast cancer. *Experimental Oncology*, 44(2), 95–106. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-2.17855>
162. Tang, G., Millar, E. K. A., Graham, P. H., & Beretov, J. (2025). Interaction between the breast tumor microenvironment and gut microbiome. *Gut Microbes*, 17(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2025.2514136>
163. Chen, J., Chen, X., & Ho, C. L. (2021). Recent Development of Probiotic Bifidobacteria for Treating Human Diseases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.770248>

164. Tripodi, L., Feola, S., Granata, I., Whalley, T., Passariello, M., Capasso, C., Coluccino, L., Vitale, M., Scalia, G., Gentile, L., De Lorenzo, C., Guarracino, M. R., Castaldo, G., D'Argenio, V., Szomolay, B., Cerullo, V., & Pastore, L. (2023). Bifidobacterium affects antitumor efficacy of oncolytic adenovirus in a mouse model of melanoma. *iScience*, 26(10), 107668. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107668>
165. El Houari, A., Ecale, F., Mercier, A., Crapart, S., Laparre, J., Soulard, B., Ramnath, M., Berjeaud, J.-M., Rodier, M.-H., & Crépin, A. (2022). Development of an in vitro Model of Human Gut Microbiota for Screening the Reciprocal Interactions With Antibiotics, Drugs, and Xenobiotics. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.828359>
166. Moskal, K., Khurana, N., Siegert, L., Lee, Y. S., Clevers, H., Elinav, E., & Puschhof, J. (2024). Modeling cancer–microbiome interactions in vitro: A guide to co-culture platforms. *International Journal of Cancer*, 156(11), 2053–2067. <https://doi.org/10.1002/ijc.35298>
167. Pham, V. T., & Mohajeri, M. H. (2018). The application of *in vitro* human intestinal models on the screening and development of pre- and probiotics. *Beneficial Microbes*, 9(5), 725–742. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0164>
168. Fernández, M., Reina-Pérez, I., Astorga, J., Rodríguez-Carrillo, A., Plaza-Díaz, J., & Fontana, L. (2018). Breast Cancer and Its Relationship with the Microbiota. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(8), 1747. <https://doi.org/10.3390/ijerph15081747>
169. Andrade, J. C., Almeida, D., Domingos, M., Seabra, C. L., Machado, D., Freitas, A. C., & Gomes, A. M. (2020). Commensal Obligate Anaerobic Bacteria and Health: Production, Storage, and Delivery Strategies. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00550>
170. Yonezawa, S., Xiao, J. Z., Odamaki, T., Ishida, T., Miyaji, K., Yamada, A., Yaeshima, T., & Iwatsuki, K. (2010). Improved growth of bifidobacteria by cocultivation with *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*. *Journal of Dairy Science*, 93(5), 1815–1823. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2708>

171. Gao, P.-P., Liu, H.-Q., Ye, Z.-W., Zheng, Q.-W., Zou, Y., Wei, T., Guo, L.-Q., & Lin, J.-F. (2023). The beneficial potential of protein hydrolysates as prebiotic for probiotics and its biological activity: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–13. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2260467>
172. Li, S., Tang, S., He, Q., Hu, J., & Zheng, J. (2019). Changes in Proteolysis in Fermented Milk Produced by *Streptococcus thermophilus* in Co-Culture with *Lactobacillus plantarum* or *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* During Refrigerated Storage. *Molecules*, 24(20), 3699. <https://doi.org/10.3390/molecules24203699>
173. Lugli, G. A., Argentini, C., Tarracchini, C., Mancabelli, L., Viappiani, A., Anzalone, R., Angelini, L., Alessandri, G., Longhi, G., Bianchi, M. G., Taurino, G., Bussolati, O., Milani, C., Turroni, F., & Ventura, M. (2024). Characterization of a *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* reference strain based on ecology and transcriptomics. *Applied and Environmental Microbiology*, 90(10). <https://doi.org/10.1128/aem.01080-24>
174. Schöpping, M., Vesth, T., Jensen, K., Franzén, C. J., & Zeidan, A. A. (2022). Genome-Wide Assessment of Stress-Associated Genes in Bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(7). <https://doi.org/10.1128/aem.02251-21>
175. Cordeiro, R. L., Santos, C. R., Domingues, M. N., Lima, T. B., Pirolla, R. A. S., Morais, M. A. B., Colombari, F. M., Miyamoto, R. Y., Persinoti, G. F., Borges, A. C., De Farias, M. A., Stoffel, F., Li, C., Gozzo, F. C., Van Heel, M., Guerin, M. E., Sundberg, E. J., Wang, L.-X., Portugal, R. V., ... Murakami, M. T. (2023). Mechanism of high-mannose N-glycan breakdown and metabolism by *Bifidobacterium longum*. *Nature Chemical Biology*, 19(2), 218–229. <https://doi.org/10.1038/s41589-022-01202-4>
176. Fushinobu, S., & Abou Hachem, M. (2021). Structure and evolution of the bifidobacterial carbohydrate metabolism proteins and enzymes. *Biochemical Society Transactions*, 49(2), 563–578. <https://doi.org/10.1042/bst20200163>
177. Moestedt, J., Müller, B., Nagavara Nagaraj, Y., & Schnürer, A. (2020). Acetate and Lactate Production During Two-Stage Anaerobic Digestion of Food Waste Driven by *Lactobacillus* and *Aeriscardovia*. *Frontiers in Energy Research*, 8. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2020.00105>

178. Michl, J., Park, K. C., & Swietach, P. (2019). Evidence-based guidelines for controlling pH in mammalian live-cell culture systems. *Communications Biology*, 2(1), 144. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0393-7>
179. Lee, S., & Shanti, A. (2021). Effect of Exogenous pH on Cell Growth of Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9910. <https://doi.org/10.3390/ijms22189910>
180. Abdelhamid, A. G., & El-DougDoug, N. K. (2021). Comparative genomics of the gut commensal *Bifidobacterium bifidum* reveals adaptation to carbohydrate utilization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 547, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.02.046>
181. Liu, K., Liu, Y., Yang, Z., Yu, J., & Yao, G. (2024). Regulation of Cultivation Temperature on Biomass and Activity of *Bifidobacterium breve* B2798. *Fermentation*, 10(11), 553. <https://doi.org/10.3390/fermentation10110553>
182. Tindjau, R., Chua, J.-Y., & Liu, S.-Q. (2023). Growth, Substrate, and Metabolite Changes of Probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* in Soy (Tofu) Whey. *Fermentation*, 9(12), 1024. <https://doi.org/10.3390/fermentation9121024>
183. Mortazavi Farsani, S. S., & Verma, V. (2023). Lactate mediated metabolic crosstalk between cancer and immune cells and its therapeutic implications. *Frontiers in Oncology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1175532>
184. Sharma, D., Gajjar, D., & Seshadri, S. (2023). Understanding the role of gut microfloral *bifidobacterium* in cancer and its potential therapeutic applications. *Microbiome Research Reports*, 3(1). <https://doi.org/10.20517/mrr.2023.51>
185. Arnone, A. A., Tsai, Y.-T., Cline, J. M., Wilson, A. S., Westwood, B., Seger, M. E., Chiba, A., Howard-McNatt, M., Levine, E. A., Thomas, A., Soto-Pantoja, D. R., & Cook, K. L. (2025). Endocrine-targeting therapies shift the breast microbiome to reduce estrogen receptor- α breast cancer risk. *Cell Reports Medicine*, 6(1), 101880. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2024.101880>
186. Niamah, A. K., Al-Sahlany, S. T. G., Verma, D. K., Shukla, R. M., Patel, A. R., Tripathy, S., Singh, S., Baranwal, D., Singh, A. K., Utama, G. L., Chávez González, M. L., Alhilfi, W. A. H., Srivastav, P. P., & Aguilar, C. Noe. (2024). Emerging lactic acid

- bacteria bacteriocins as anti-cancer and anti-tumor agents for human health. *Heliyon*, 10(17), e37054. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e37054>
187. Nowak, A., Paliwoda, A., & Błasiak, J. (2019). Anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-oxidative activity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains: A review of mechanisms and therapeutic perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(21), 3456–3467. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1494539>
188. Asadollahi, P., Ghanavati, R., Rohani, M., Razavi, S., Esghaei, M., & Talebi, M. (2020). Anti-cancer effects of *Bifidobacterium* species in colon cancer cells and a mouse model of carcinogenesis. *PLOS ONE*, 15(5), e0232930. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232930>
189. Chandel, N. S. (2021). Metabolism of Proliferating Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(10), a040618. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040618>
190. Cordani, M., Michetti, F., Zarrabi, A., Zarepour, A., Rumio, C., Strippoli, R., & Marcucci, F. (2024). The role of glycolysis in tumorigenesis: From biological aspects to therapeutic opportunities. *Neoplasia*, 58, 101076. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2024.101076>
191. Zhou, D., Duan, Z., Li, Z., Ge, F., Wei, R., & Kong, L. (2022). The significance of glycolysis in tumor progression and its relationship with the tumor microenvironment. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1091779>
192. Ediriweera, M. K., & Jayasena, S. (2023). The Role of Reprogrammed Glucose Metabolism in Cancer. *Metabolites*, 13(3), 345. <https://doi.org/10.3390/metabo13030345>
193. Pavlova, N. N., Zhu, J., & Thompson, C. B. (2022). The hallmarks of cancer metabolism: Still emerging. *Cell Metabolism*, 34(3), 355–377. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.01.007>
194. Vella, V., Nicolosi, M. L., Giuliano, M., Morrione, A., Malaguarnera, R., & Belfiore, A. (2019). Insulin Receptor Isoform A Modulates Metabolic Reprogramming of Breast Cancer Cells in Response to IGF2 and Insulin Stimulation. *Cells*, 8(9), 1017. <https://doi.org/10.3390/cells8091017>
195. Smith, S. F., Collins, S. E., & Charest, P. G. (2020). Ras, PI3K and mTORC2 – three’s a crowd? *Journal of Cell Science*, 133(19). <https://doi.org/10.1242/jcs.234930>

196. Wu, Q., Ba-Alawi, W., Deblois, G., Cruickshank, J., Duan, S., Lima-Fernandes, E., Haight, J., Tonekaboni, S. A. M., Fortier, A.-M., Kuasne, H., McKee, T. D., Mahmoud, H., Kushida, M., Cameron, S., Dogan-Artun, N., Chen, W., Nie, Y., Zhang, L. X., Vellanki, R. N., ... Arrowsmith, C. H. (2020). GLUT1 inhibition blocks growth of RB1-positive triple negative breast cancer. *Nature Communications*, *11*(1), 4205. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18020-8>
197. Agrawal, S., Łuc, M., Ziółkowski, P., Agrawal, A. K., Pielka, E., Walaszek, K., Zduniak, K., & Woźniak, M. (2017). Insulin-induced enhancement of MCF-7 breast cancer cell response to 5-fluorouracil and cyclophosphamide. *Tumor Biology*, *39*(6), 101042831770290. <https://doi.org/10.1177/1010428317702901>
198. Yue, X., Wang, J., Chang, C., Liu, J., Yang, X., Zhou, F., Qiu, X., Bhatt, V., Guo, J. Y., Su, X., Zhang, L., Feng, Z., & Hu, W. (2022). Leukemia inhibitory factor drives glucose metabolic reprogramming to promote breast tumorigenesis. *Cell Death & Disease*, *13*(4). <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04820-x>
199. Barbosa, A. M., & Martel, F. (2020). Targeting Glucose Transporters for Breast Cancer Therapy: The Effect of Natural and Synthetic Compounds. *Cancers*, *12*(1), 154. <https://doi.org/10.3390/cancers12010154>
200. Ghanavat, M., Shahrouzian, M., Deris Zayeri, Z., Banihashemi, S., Kazemi, S. M., & Saki, N. (2021). Digging deeper through glucose metabolism and its regulators in cancer and metastasis. *Life Sciences*, *264*, 118603. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118603>
201. Zhang, Y., Li, Q., Huang, Z., Li, B., Nice, E. C., Huang, C., Wei, L., & Zou, B. (2022). Targeting Glucose Metabolism Enzymes in Cancer Treatment: Current and Emerging Strategies. *Cancers*, *14*(19), 4568. <https://doi.org/10.3390/cancers14194568>
202. Ju, H.-Q., Lin, J.-F., Tian, T., Xie, D., & Xu, R.-H. (2020). NADPH homeostasis in cancer: Functions, mechanisms and therapeutic implications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00326-0>
203. Mele, L., La Noce, M., Paino, F., Regad, T., Wagner, S., Liccardo, D., Papaccio, G., Lombardi, A., Caraglia, M., Tirino, V., Desiderio, V., & Papaccio, F. (2019). Glucose-6-phosphate dehydrogenase blockade potentiates tyrosine kinase inhibitor effect on breast

- cancer cells through autophagy perturbation. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 160. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1164-5>
204. Dufort, F. J., Bleiman, B. F., Gumina, M. R., Blair, D., Wagner, D. J., Roberts, M. F., Abu-Amer, Y., & Chiles, T. C. (2007). Cutting Edge: IL-4-Mediated Protection of Primary B Lymphocytes from Apoptosis via Stat6-Dependent Regulation of Glycolytic Metabolism. *The Journal of Immunology*, 179(8), 4953–4957. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.8.4953>
205. Venmar, K. T., Kimmel, D. W., Cliffler, D. E., & Fingleton, B. (2015). IL4 receptor α mediates enhanced glucose and glutamine metabolism to support breast cancer growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(5), 1219–1228. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.020>
206. Wei, M., Liu, B., Gu, Q., Su, L., Yu, Y., & Zhu, Z. (2013). Stat6 cooperates with Sp1 in controlling breast cancer cell proliferation by modulating the expression of p21Cip1/WAF1 and p27Kip1. *Cellular Oncology*, 36(1), 79–93. <https://doi.org/10.1007/s13402-012-0115-3>
207. Verhoeven, Y., Tilborghs, S., Jacobs, J., De Waele, J., Quatannens, D., Deben, C., Prenen, H., Pauwels, P., Trinh, X. B., Wouters, A., Smits, E. L. J., Lardon, F., & Van Dam, P. A. (2020). The potential and controversy of targeting STAT family members in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 60, 41–56. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.10.002>
208. Wagner, W., Ciszewski, W., Kania, K., & Dastyh, J. (2016). Lactate Stimulates IL-4 and IL-13 Production in Activated HuT-78 T Lymphocytes Through a Process That Involves Monocarboxylate Transporters and Protein Hyperacetylation. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 36(5), 317–327. <https://doi.org/10.1089/jir.2015.0086>
209. Glaviano, A., Foo, A. S. C., Lam, H. Y., Yap, K. C. H., Jacot, W., Jones, R. H., Eng, H., Nair, M. G., Makvandi, P., Georger, B., Kulke, M. H., Baird, R. D., Prabhu, J. S., Carbone, D., Pecoraro, C., Teh, D. B. L., Sethi, G., Cavalieri, V., Lin, K. H., ... Kumar, A. P. (2023). PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. *Molecular Cancer*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01827-6>

210. Niu, Z., He, J., Wang, S., Xue, B., Zhang, H., Hou, R., Xu, Z., Sun, J., He, F., & Pei, X. (2025). Targeting Glycolysis for Treatment of Breast Cancer Resistance: Current Progress and Future Prospects. *International Journal of Biological Sciences*, 21(6), 2589–2605. <https://doi.org/10.7150/ijbs.109803>
211. Terraza-Silvestre, E., Villamuera, R., Bandera-Linero, J., Letek, M., Oña-Sánchez, D., Ramón-Barros, C., Moyano-Jimeno, C., & Pimentel-Muiños, F. X. (2025). An unconventional autophagic pathway that inhibits ATP secretion during apoptotic cell death. *Nature Communications*, 16(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-025-58619-3>
212. Obaid, Q. A., Khudair, K. K., & Al-Shammari, A. M. (2022). Glucose deprivation using 2-deoxyglucose and acarbose induce metabolic oxidative stress and apoptosis in female mice bearing breast cancer. *Biochimie*, 195, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.01.007>
213. Amaral, I., Silva, C., Correia-Branco, A., & Martel, F. (2018). Effect of metformin on estrogen and progesterone receptor-positive (MCF-7) and triple-negative (MDA-MB-231) breast cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.008>
214. Zhang, D., Li, J., Wang, F., Hu, J., Wang, S., & Sun, Y. (2014). 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer Letters*, 355(2), 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.09.003>
215. Schmidt, M. C., & O'Donnell, A. F. (2021). ‘Sugarcoating’ 2-deoxyglucose: Mechanisms that suppress its toxic effects. *Current Genetics*, 67(1), 107–114. <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01122-7>
216. Xian, H., Wang, Y., Bao, X., Zhang, H., Wei, F., Song, Y., Wang, Y., Wei, Y., & Wang, Y. (2023). Hexokinase inhibitor 2-deoxyglucose coordinates citrullination of vimentin and apoptosis of fibroblast-like synoviocytes by inhibiting HK2 /mTORC1-induced autophagy. *International Immunopharmacology*, 114, 109556. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109556>
217. Zagorodna, O., Martin, S. M., Rutkowski, D. T., Kuwana, T., Spitz, D. R., & Knudson, C. M. (2012). 2-Deoxyglucose-induced toxicity is regulated by Bcl-2 family

- members and is enhanced by antagonizing Bcl-2 in lymphoma cell lines. *Oncogene*, *31*(22), 2738–2749. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.454>
218. Ibrahim, R. S., Ibrahim, S. S., El-Naas, A., Koklesová, L., Kubatka, P., & Büsselberg, D. (2023). Could Metformin and Resveratrol Support Glioblastoma Treatment? A Mechanistic View at the Cellular Level. *Cancers*, *15*(13), 3368. <https://doi.org/10.3390/cancers15133368>
219. Hampsch, R. A., Wells, J. D., Traphagen, N. A., McCleery, C. F., Fields, J. L., Shee, K., Dillon, L. M., Pooler, D. B., Lewis, L. D., Demidenko, E., Huang, Y. H., Marotti, J. D., Goen, A. E., Kinlaw, W. B., & Miller, T. W. (2020). AMPK Activation by Metformin Promotes Survival of Dormant ER+ Breast Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*, *26*(14), 3707–3719. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-20-0269>
220. Qiao, Q., Hu, S., & Wang, X. (2024). The regulatory roles and clinical significance of glycolysis in tumor. *Cancer Communications*, *44*(7), 761–786. <https://doi.org/10.1002/cac2.12549>
221. Savova, M. S., Mihaylova, L. V., Tews, D., Wabitsch, M., & Georgiev, M. I. (2023). Targeting PI3K/AKT signaling pathway in obesity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *159*, 114244. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114244>
222. Zhao, L.-Y., Mei, J.-X., Yu, G., Lei, L., Zhang, W.-H., Liu, K., Chen, X.-L., Kołat, D., Yang, K., & Hu, J.-K. (2023). Role of the gut microbiota in anticancer therapy: From molecular mechanisms to clinical applications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01406-7>
223. Nizami, Z. N., Aburawi, H. E., Semlali, A., Muhammad, K., & Iratni, R. (2023). Oxidative Stress Inducers in Cancer Therapy: Preclinical and Clinical Evidence. *Antioxidants*, *12*(6), 1159. <https://doi.org/10.3390/antiox12061159>
224. Burgueño, J. F., Fritsch, J., González, E. E., Landau, K. S., Santander, A. M., Fernández, I., Hazime, H., Davies, J. M., Santaolalla, R., Phillips, M. C., Diaz, S., Dheer, R., Brito, N., Pignac-Kobinger, J., Fernández, E., Conner, G. E., & Abreu, M. T. (2021). Epithelial TLR4 Signaling Activates DUOX2 to Induce Microbiota-Driven Tumorigenesis. *Gastroenterology*, *160*(3), 797–808.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.10.031>

225. Faria, C. C. D., & Fortunato, R. S. (2020). The role of dual oxidases in physiology and cancer. *Genetics and Molecular Biology*, 43(1 suppl 1). <https://doi.org/10.1590/1678-4685/gmb-2019-0096>
226. Arfin, S., Jha, N. K., Jha, S. K., Kesari, K. K., Ruokolainen, J., Roychoudhury, S., Rathi, B., & Kumar, D. (2021). Oxidative Stress in Cancer Cell Metabolism. *Antioxidants*, 10(5), 642. <https://doi.org/10.3390/antiox10050642>
227. An, X., Yu, W., Liu, J., Tang, D., Yang, L., & Chen, X. (2024). Oxidative cell death in cancer: Mechanisms and therapeutic opportunities. *Cell Death & Disease*, 15(8), 556. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06939-5>
228. Engeland, K. (2022). Cell cycle regulation: P53-p21-RB signaling. *Cell Death & Differentiation*, 29(5), 946–960. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z>
229. Saddam, Md., Paul, S. K., Habib, M. A., Fahim, Md. A., Mimi, A., Islam, S., Paul, B., & Helal, M. M. U. (2024). Emerging biomarkers and potential therapeutics of the BCL-2 protein family: The apoptotic and anti-apoptotic context. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s43042-024-00485-7>

ДОДАТОК А
ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ
ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Kozak, T.**, Lykhova, O., Serhiichuk, T., Bezdieniezhnykh, N., Chekhun, V. (2023). Optimization of experimental model systems for evaluating reciprocal influence of *Bifidobacterium animalis* and human breast cancer cells *in vitro*. *Experimental Oncology*. – 2023; 45(4): 504–514. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2023.04.504> (*Scopus Q4, Особистий внесок здобувача: вивчення ростових і метаболічних характеристик Bifidobacterium animalis, оцінка життєздатності клітин РМЗ різних молекулярних підтипів за умови їх співкультивування з живими та інактивованими теплом біфідобактеріями, визначення концентрації і життєздатності Bifidobacterium animalis мікробіологічними методами, аналіз літературних джерел, написання та оформлення статті*).
2. **Козак, Т.**, Лихова, О. (2024). Пригнічення проліферації та підвищення експресії проапоптотичних білків в клітинах раку молочної залози людини після їх співкультивування з *Bifidobacterium animalis in vitro*. *Онкологія*. – 2024; 25(1): 29–37. <https://doi.org/10.15407/oncology.2024.01.029> (*Категорія «Б», Особистий внесок здобувача: визначення життєздатності і продукції активних форм кисню в клітинах раку молочної залози людини різних молекулярних підтипів після їх співкультивування з Bifidobacterium animalis, імуноцитохімічні дослідження щодо визначення експресії маркерів проліферації та апоптозу, аналіз літературних джерел, написання та оформлення статті*).
3. **Kozak, T.**, Lykhova, O., Chekhun, V. (2025). Reprogramming of glucose metabolism in human breast cancer cells after co-cultivation with *Bifidobacterium animalis*. *Experimental Oncology*. – 2025; 47(1): 3–15. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2025.01.003> (*Scopus Q4, Особистий внесок здобувача: вивчення метаболічного профілю клітин РМЗ людини різних молекулярних підтипів біохімічними методами, оцінка експресії білків, асоційованих з регуляцією сигнальних шляхів метаболізму глюкози методом імуноцитохімічного аналізу та*

проточної цитометрії, статистичний аналіз даних, аналіз літературних джерел, написання та оформлення статті).

4. **Kozak, T. P.**, Lykhova, O. O., Virych, P. A., Chekhun. (2025). Modification of breast cancer cells' sensitivity to metformin due to co-cultivation with *B.animalis*. *Biotechnologia Acta*. – 2025; 18(2): 54–56. <https://doi.org/10.15407/biotech18.02.054> (Категорія «Б», Особистий внесок здобувача: проводила співкультивування клітин раку молочної залози з *Bifidobacterium animalis*, визначала життєздатності клітин, приймала участь у написанні та оформленні статті).

5. **Козак Т.**, Лихова О., Безденежних Н., Чехун В. Зміни метаболізму глюкози в клітинах РМЗ людини після їх співкультивування з *Bifidobacterium animalis in vitro*. Book of Abstracts Contains the Materials of the 7th Congress of the All-Ukrainian Public Organization «Ukrainian Society of Cell Biology» with International Representation, 2024: 38.

6. **Kozak T.**, Lykhova O., Bezdeniezhnykh N. The increase in sensitivity of ER+PR+ breast cancer cells to 2-deoxyglucose as a result of co-cultivation with *Bifidobacterium animalis in vitro*. Proceedings of the 14th International scientific and practical conference «Transformations of the individual and society: challenges of the future», 2025: 46–48. <https://doi.org/10.46299/ISG.2025.1.14>

7. **Kozak T.**, Lykhova O. *Bifidobacterium animalis* and metformin as modifiers of glucose metabolism by breast cancer cells *in vitro*. In *Advancements in Life Sciences: Proceedings of the XXII International Scientific Conference of Students and Young Scientists «Shevchenko Spring»*. Kyiv, 2025:185–187. Kyiv: VPC «Kyivskyi Universytet».

8. **Козак Т.П.**, Лихова О.О., Безденежних Н.О. Особливості впливу *Bifidobacterium animalis* на життєздатність клітин РМЗ людини *in vitro*. У «Єдине здоров'я – 2024»: Матеріали міжнародної наукової конференції (м. Київ, Україна, 19–20 вересня 2024 р.), с. 13–14.

Відомості про апробацію результатів дисертації

1. Міжнародна наукова конференція «Єдине здоров'я – 2024» (19-20 вересня 2024 року, Київ, Україна) – усна доповідь.
2. VII з'їзд Всеукраїнської громадської організації «Українське товариство клітинної біології» з міжнародним представництвом (11-13 вересня 2024 року, Львів, Україна) – постерна доповідь.
3. XIV Міжнародна науково-практична конференція «Transformations of the individual and society: challenges of the future» (08-11 квітня 2025 року, Токіо, Японія) – тези.
4. XXII Міжнародна наукова конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська Весна – 2025» (23-25 квітня 2025 року, Київ, Україна) – тези.
5. Конференція молодих науковців «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2025» (5-6 травня 2025 року, Київ, Україна) – усна доповідь.