

Т.П. Козак,
О.О. Лихова

Інститут експериментальної
патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: мікробіота,
Bifidobacterium animalis,
рак молочної залози, апоптоз,
активні форми кисню.

DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2024.01.029>

ПРИГНІЧЕННЯ ПРОЛІФЕРАЦІЇ ТА ПІДВИЩЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ПРОАПОПТОТИЧНИХ БІЛКІВ В КЛІТИНАХ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ ПІСЛЯ ЇХ СПІВКУЛЬТИВУВАННЯ З *BIFIDO- BACTERIUM ANIMALIS IN VITRO*

Мета: визначити життєздатність, проліферативну активність і рівень активних форм кисню (АФК) в клітинах раку молочної залози (РМЗ) людини після їх співкультивування з представником мікробіоти людини виду *Bifidobacterium animalis*. **Об'єкт і методи:** дослідження провели *in vitro* на клітинах РМЗ людини ліній MCF-7, T47D та MDA-MB-231. Клітини співкультивували з живими бактеріями виду за умов прямої або опосередкованої через метаболіти (безконтактне співкультивування в системі Insert) взаємодії еукаріотичних і бактеріальних клітин. Продукцію АФК оцінювали методом проточної цитометрії. Методом імуноцитохімічного аналізу оцінювали експресію білків асоційованих з регуляцією проліферації і апоптозу в клітинах РМЗ. **Результати:** найбільш виражені зміни ростових характеристик клітин РМЗ людини *in vitro* спричиняє безпосередня взаємодія бактеріальних і злоякісних клітин, у порівнянні з окремою дією метаболітів бактеріального походження. Клітини люмінального підтипу лінії MCF-7 найбільш чутливі до впливу бактерій *B. animalis*. Співкультивування клітин РМЗ з *B. animalis* призводить до зниження експресії Ki-67 у злоякісних клітинах, підвищення продукції АФК і експресії проапоптичних білків Bax і p21^{WAF1}. У клітинах T47D після їх експозиції з *B. animalis* була виявлена транслокалізація експресії p21^{WAF1} з цитоплазми в ядро клітини. **Висновки:** взаємодія клітин РМЗ людини з *B. animalis* та їх секретованими метаболітами призводила до пригнічення проліферації злоякісних клітин, індукції в них оксидативного стресу і активації програми апоптозу.

Мікробіом відіграє надзвичайно важливу роль у забезпеченні гомеостазу організму людини і порушення його складу та функціональної активності часто асоційовано із ініціацією та розвитком патологічних процесів в організмі, у тому числі і злоякісних [1–4]. При цьому на розвиток онкологічного захворювання може впливати як склад мікробіоти, так і конкретні види бактерій, які беруть участь у розвитку хвороби [5], або можуть спричиняти протипухлинні ефекти [6–9].

Біфідобактерії входять до складу нормальної мікрофлори людини, спричиняючи пробіотичну дію. Окрім того, сьогодні відомо, що біфідобактерії також володіють протипухлинною активністю, яка реалізується шляхом модуляції експресії онкогенів [10], підтримання балансу імунної системи [11], конкуренції з патогенними мікроорганізмами, біотрансформації речовин [12], зміцнення кишкового бар'єру, впливу на склад мікробіоти кишечника, тощо [13]. Було виявлено, що молочнокислі

бактерії, включаючи біфідобактерії, здатні знижувати ризик виникнення раку товстої кишки, сечового міхура, печінки і молочної залози [14]. При цьому основними ефекторними молекулами вважаються метаболіти бактеріального походження, профіль яких відрізняється у різних видах біфідобактерій. Наприклад, токсини, білки, сукцинати, лактони та екзополісахариди відіграють важливу роль у контролі фізіологічних взаємодій різних типів клітин організму хазяїна [15]. Разом з тим, доведено, що інактивовані температурою лакто- і біфідобактерії значно пригнічують проліферацію та індукують апоптоз клітин раку молочної залози (РМЗ) та колоректального раку [16–17]. Однак механізми, за допомогою яких біфідобактерії можуть пригнічувати проліферацію або життєздатність злоякісних клітин, зокрема, РМЗ до кінця не вивчені.

Саме тому метою дослідження була порівняльна оцінка життєздатності клітин РМЗ людини після

їх співкультивування з живими бактеріями виду *Bifidobacterium animalis* за умов прямої або опосередкованої через метаболіти (система Insert) взаємодії еукаріотичних і бактеріальних клітин. Крім того, ми спробували з'ясувати яким чином *B. animalis* можуть впливати на продукцію активних форм кисню (АФК) і експресію білків-регуляторів проліферації або апоптозу в клітинах РМЗ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Культури клітин. Клітини РМЗ людини ліній Т47D, MCF-7 та MDA-MB-231 культивували у поживному середовищі DMEM (Biowest, Франція) з 10% фетальної сироватки теляти (ФСТ) (Biowest, Франція) та 40 мкг/мл пеніциліну-стрептоміцину (Biowest, Франція). Клітини були отримані з Банку клітинних ліній з тканин людини та тварин ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Клітини інкубували у зволоженій атмосфері з 5% CO₂ при 37°C.

Штам бактерій. В роботі використовували ліофілізовані клітини *Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12*, які виділяли з пробіотика виробництва Lek Pharmaceuticals, Любляна, Словенія.

Співкультивування еукаріотичних і бактеріальних клітин.

Модель співкультивування еукаріотичних і бактеріальних клітин за умов їх прямої взаємодії. В лунки 24-лункового планшету висаджували клітини РМЗ у кількості 2·10⁴ клітин/лунку в поживному середовищі DMEM з 10% вмістом ФСТ. Клітини інкубували у CO₂-інкубаторі протягом доби. Далі до еукаріотичних клітин додавали суспензію живих бактерій *B. animalis* до кінцевого співвідношення клітин двох типів 1/100 і 1/25. Клітини інкубували ще 48 год у вологій атмосфері при 5% CO₂ та 37°C.

Модель безконтактного співкультивування еукаріотичних клітин і бактерій в системі Insert in vitro. Клітини РМЗ вносили в лунки 24-лункового планшету в поживному середовищі DMEM з 10% ФСТ у кількості 4·10⁴ клітин/лунку. Клітини культивували за стандартних умов 24 год. Через добу до відповідних лунок планшету вкладали Insert з діаметром пор в мембрані 0,1 мкм (Millicell, Merck, Німеччина). В Insert вносили по 0,5 мл DMEM з 10% ФСТ, яке містило живі бактеріальні клітини *B. animalis* у співвідношенні еукаріотичні/бактеріальні клітини 1/100, 1/25. Інкубували клітини в CO₂-інкубаторі ще протягом 48 год. По завершенню інкубації життєздатність клітин РМЗ в експерименті оцінювали в МТТ-тесті.

Визначення життєздатності клітин РМЗ в МТТ-тесті. Життєздатність клітин визначали шляхом оцінки їх дихальної активності. Після завершення контактної або безконтактної співкультивування двох типів клітин бактерії видаляли шляхом 4-кратної зміни поживного середовища у лунках (пряма взаємодія) або видалення вкладки Insert

(безконтактна взаємодія). У лунки додавали 3-(4,5-диметилтіазол-2)-2,5-дифенілтетразоліум бромід (Sigma, США) до кінцевої концентрації 5 мг/мл. Клітини інкубували при 37°C протягом 3 год. Кристали тетраформазану розчиняли у ДМСО (Sigma, США). Результати фіксували за допомогою спектрофотометра з вертикальним ходом променів при λ = 540 нм (спектрофотометр Labsystems Multiskan PLUS, Фінляндія).

Визначення кількості бактеріальних клітин. Кількість бактеріальних клітин у поживному середовищі після їх інкубації з клітинами РМЗ визначали методом турбідиметрії при λ = 600 нм (спектрофотометр Labsystems Multiskan PLUS, Фінляндія).

Оцінка життєздатності еукаріотичних клітин методом проточної цитометрії. Клітини РМЗ вносили в лунки 6-лункового планшету в поживному середовищі DMEM з 10% ФСТ у кількості 1·10⁵ клітин/лунку та додавали *B. animalis* у співвідношенні еукаріотичні/бактеріальні клітини — 1/100 і 1/25. Через 2 доби клітини збирали, видаляючи бактерії шляхом центрифугування клітинної суспензії при 1000 об/хв. протягом 5 хв, промивали фосфатно-сольовим буфером (BioWest, Франція), фарбували пропідій йодидом (PI; Sigma, США) і аналізували на проточному цитометрі DxFlex (Beckman Coulter). 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 плоти FSC-A/FSC-H. Для кожного зразку проводили аналіз не менше 10000 подій. Аналіз отриманих даних проводили за допомогою програми CytExpert для DxFlex.

Визначення продукції АФК клітинами РМЗ методом проточної цитометрії. Клітини РМЗ вносили в лунки 6-лункового планшету в поживному середовищі DMEM з 10% ФСТ в кількості 1·10⁵ клітин/лунку. До клітин додавали суспензію живих бактерій *B. animalis* до кінцевого співвідношення еукаріотичні/бактеріальні клітини — 1/100, 1/25. Інкубували клітини в CO₂-інкубаторі при 37°C та вмісту CO₂ — 5% у вологій атмосфері ще протягом 48 год. Після закінчення інкубації бактеріальні клітини видаляли шляхом 4-кратної зміни поживного середовища в лунках, а клітини РМЗ знімали з субстрату, промивали фосфатно-сольовим буфером і фарбували 15 мкМ розчином DCFH-DA (Sigma, США) протягом 30 хв при 37°C та 5% CO₂. Зразки аналізували за допомогою проточного цитометра DxFLEx.

Імуноцитохімічний аналіз. Клітини РМЗ вносили в чашки Петрі з покривними скельцями у повному поживному середовищі в кількості 1·10⁵ клітин. До клітин додавали живі бактеріальні клітини *B. animalis* до кінцевого співвідношення еукаріотичні/бактеріальні клітини — 1/100, 1/25. Інкубували клітини при 5% CO₂ і 37°C протягом 48 год.

Далі, скельця з клітинами поміщали у фіксуючий розчин (метанол + ацетон: 1:1) на 2 год при -20°C , після чого клітини тричі промивали холодним фосфатно-сольовим буфером. Протягом 1 год інкубували клітини з первинними моноклональними антитілами проти: Ki-67, p53, p21^{WAF1}, Bcl-2 (Thermo Fisher Scientific, США). Для проведення імуноцитохімічної реакції використовували Master Polymer Plus Detection System (Vitro S.A., Іспанія). Реакцію проводили згідно інструкції виробника. Препарати дофарбовували розчином гематоксилін-еозину (Sigma, США) і заключали в Faramount Aqueous Mounting Medium (Thermo Fisher Scientific, США). Аналіз результатів проводили підраховуючи клітини з експресією (коричневе забарвлення клітин) за допомогою світлового мікроскопу та оцінювали за допомогою класичного методу H-Score [18].

Статистичний аналіз. Дослідження повторювали тричі. Середнє значення досліджуваних показників (M) і середнє квадратичне відхилення (SD) розраховували за допомогою програмного пакету Excel 2016. Для оцінки рівнів значущості відмінності досліджуваних показників між групами застосовували t-критерій Стьюдента. Розрахунки виконували за допомогою програмного пакету GraphGad Prism 8. Відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Визначення співвідношення еукаріотичних/бактеріальних клітин. Результати наших попередніх досліджень [19] показали, що за умов співкультивування клітини PM3 і *B. animalis* спричиняють суттєвий взаємовплив на кінетику росту один одного. Саме тому, для адекватного аналізу отриманих ефектів визначали співвідношення кількості еукаріотичних і бактеріальних клітин як на початку дослідження так і на термінальній стадії експерименту — через 48 год після поєднання двох типів клітин. Було показано, що співвідношення клітин змінюється наступним чином: T47D 1/100 $\rightarrow$ 1/185,

1/25 $\rightarrow$ 1/4; MCF-7 1/100 $\rightarrow$ 1/140, 1/25 $\rightarrow$ 1/2; MDA-MB-231 1/100 $\rightarrow$ 1/85, 1/25 $\rightarrow$ 1/2.

Життєздатність клітин PM3 за умов їх експозиції з *Bifidobacterium animalis*. Результати представлені на *рис. 1* свідчать, що безпосередня взаємодія живих клітин *B. animalis* і клітин PM3 у співвідношенні еукаріотичних/бактеріальних клітин 1/100 призводить до статистично значущого зниження життєздатності клітин T47D, MCF-7 та MDA-MB-231 на відміну від їх безконтактного співкультивування в системі Insert. Експозиція клітин люмінального підтипу T47D з *B. animalis* призводила до зниження життєздатності клітин на 12%, відносно контролю. Найбільш чутливими до інгібуючої дії біфідобактерій виявились клітини люмінального підтипу MCF-7. Оскільки навіть при початковому співвідношенні еукаріотичних/бактеріальних клітин 1/25 відмічали статистично достовірне пригнічення їх життєздатності на 13% у порівнянні з контролем (див. *рис. 1*). Співкультивування клітин базального підтипу MDA-MB-231 з *B. animalis* супроводжувалось зниженням їх життєздатності на 18%.

Слід зазначити, що підвищення початкового співвідношення еукаріотичних бактеріальних клітин до 1/1000 призводило до більш вираженого інгібуючого впливу *B. animalis* на життєздатність клітин PM3 як за умов їх прямої так і безконтактної взаємодії (дані не представлені).

Отримані результати свідчать, що саме безпосередня взаємодія клітин PM3 і поверхневих антигенів біфідобактерій у комплексі з їх секретованими метаболітами спричиняють найбільш суттєвий вплив на життєздатність клітин PM3. Саме тому, подальші дослідження впливу *B. animalis* на злоякісні клітини проводили за умови їх прямої взаємодії.

Вплив *B. animalis* на життєздатність клітин PM3 також аналізували методом проточної цитометрії (*рис. 2*). Було показано, що за умов прямої взаємодії біфідобактерії спричиняють цитотоксичний вплив на клітини PM3 люмінального підтипу ліній

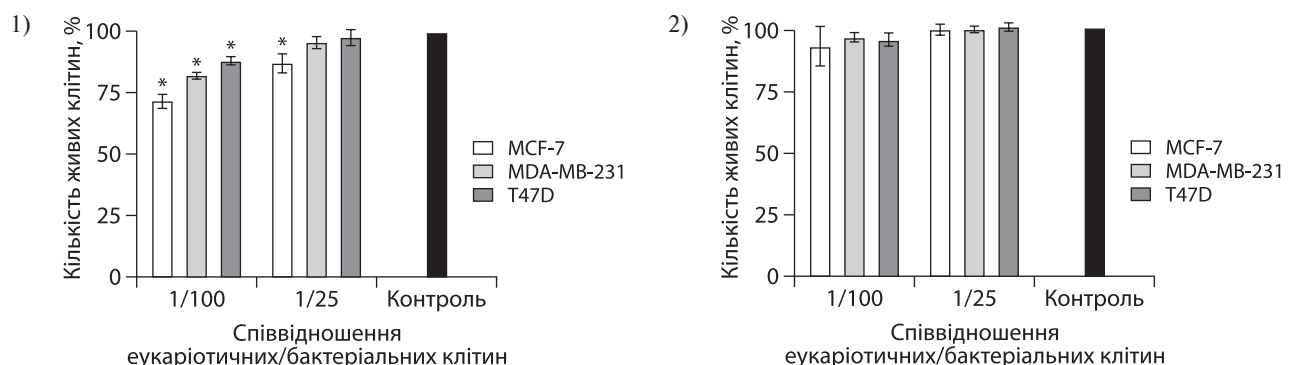


Рис. 1. Життєздатність клітин PM3 після їх співкультивування з *B. animalis* за умов прямого (1) або опосередкованого через метаболіти (2) контакту еукаріотичних і бактеріальних клітин. * — $p < 0,05$ порівняно з показниками контрольної групи

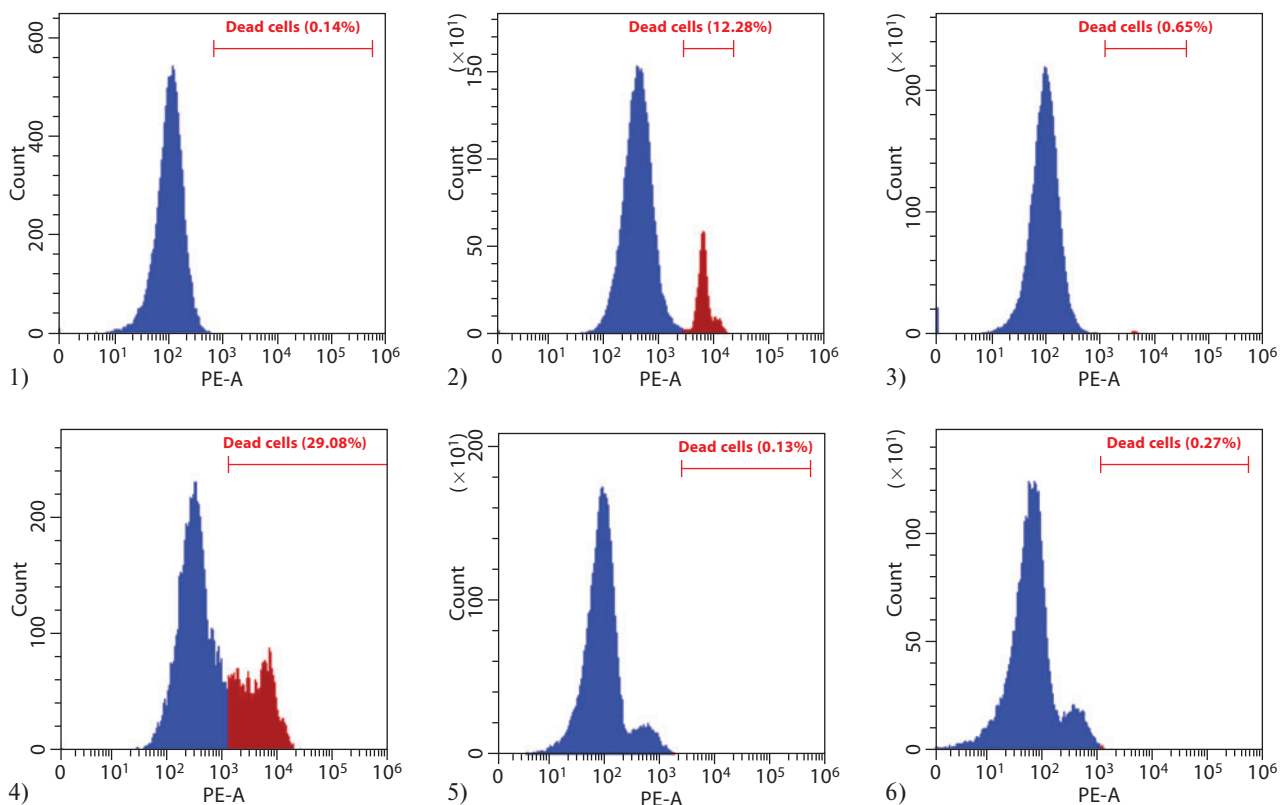


Рис. 2. Життєздатність клітин РМЗ після їх експозиції з *B. animalis* за результатами проточної цитометрії (мертві клітини, фарбовані PI, позначені на графіку червоними піками): 1 — T47D контроль; 2 — T47D + *B. animalis* 1/100; 3 — MCF-7 контроль; 4 — MCF-7 + *B. animalis* 1/100; 5 — MDA-MB-231 контроль; 6 — MDA-MB-231 + *B. animalis* 1/100

T47D та MCF-7. Зменшення кількості живих клітин MDA-MB-231 після їх експозиції з *B. animalis*, вірогідно, є результатом антипроліферативного впливу мікроорганізмів.

Аналіз даних літератури, присвячених особливостям взаємодії пухлинних клітин різного гістогенезу та біфідобактерій, свідчать, що отримані нами результати підтверджують і доповнюють інформацію щодо здатності таких пробіотичних мікроорганізмів *in vitro* пригнічувати проліферацію і життєздатність злоякісних клітин [20].

Сьогодні показано, що біфідобактерії продукують метаболіти (коротколанцюгові жирні кислоти, вторинні жовчні кислоти, поліаміни та вітаміни), які здатні пригнічувати життєздатність, проліферацію клітин РМЗ та індукувати в них апоптоз [21–24]. Окрім того, *Bifidobacterium sp.* здатні пригнічувати проліферацію злоякісних клітин опосередковано, наприклад, через метаболізм активних фармацевтичних інгредієнтів, внаслідок чого утворюються цитотоксичні для клітин РМЗ метаболіти [25]. Також відомо, що пробіотики, які містять *Lactobacillus* і *Bifidobacterium spp.* здатні пригнічувати транскрипцію та вивільнення TNF- α зі злоякісних клітин шляхом цілеспрямованого пригнічення активності ключових клітинних прозапальних сигнальних шляхів [26].

Незважаючи на значну кількість даних, які описують вплив метаболітів біфідобактерій на біологію пухлинної клітини, механізми прямої міжклітинної взаємодії еукаріотичних і бактеріальних клітин залишаються недостатньо вивченими і потребують подальших досліджень.

Продукція АФК в клітинах РМЗ після їх співкультивування з *Bifidobacterium animalis*. З метою пошуку механізмів впливу *B. animalis* на життєздатність клітин РМЗ, які можуть пояснити різну чутливість злоякісних клітин до дії мікроорганізму, досліджували продукцію АФК в клітинах РМЗ і аналізували експресію білків-регуляторів клітинного циклу і апоптозу після їх експозиції з *B. animalis*. Адже відомо, що сигнальні шляхи, чутливі до АФК, у злоякісних клітинах беруть участь у процесах проліферації, диференціації, синтезу білка і виживанні клітин [27].

Результати представлені на *рис. 3* свідчать, що експозиція клітин РМЗ з *B. animalis* супроводжується статистично достовірним підвищенням продукції АФК у злоякісних клітинах в 1,5–3,0 разів відносно контролю. Однак, внаслідок різного окисно-відновлювального потенціалу і потужності антиоксидантних систем досліджуваних клітин РМЗ рівень продукції АФК і зміни цього показника після їх співкультивування з *B. animalis*

суттєво відрізняються. Найбільш виражені зміни продукції АФК відмічали в клітинах MDA-MB-231 і MCF-7, що характеризуються подібним рівнем експресії ферментів системи intestinal dual oxidase (DUOX) [28].

Отримані результати дозволяють припустити, що взаємодія клітин РМЗ з поверхневими антигенами та секретованими метаболітами *B. animalis* відбувається через індуковану бактеріями DUOX систему, що призводить до подібного підвищення продукції АФК у клітинах РМЗ [29, 30].

Важливу роль такого механізму дії біфідобактерій на клітини РМЗ підтверджують результати досліджень Alexander і співавт. на моделях лімфоми і раку товстої кишки миші *in vivo*. Авторами було показано, що введення сполук, які здатні пригнічувати виробництво АФК еукаріотичними клітинами, може суттєво знижувати протипухлинну ефективність пробіотичних представників мікробому [31].

Експресія білків-регуляторів клітинного циклу і апоптозу в клітинах РМЗ після їх експозиції з *B. animalis*. Аналіз експресії маркера проліферації Ki-67 в клітинах РМЗ свідчить, що *B. animalis* здатні пригнічувати експресію ядерного білка на 45–60% відносно контролю. Однак, такий ефект спостерігали лише за умови експозиції злоякісних клітин з біфідобактеріями у співвідношенні 1/100 (рис. 4 (1)).

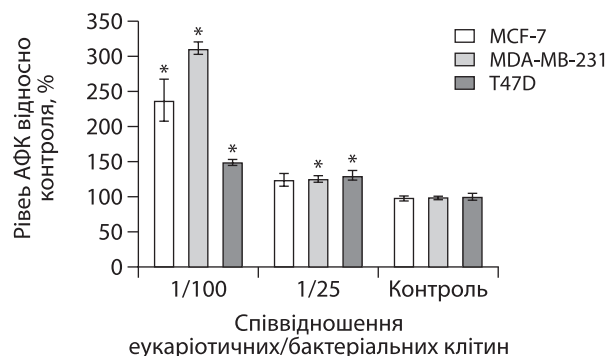


Рис. 3. Продукція АФК у клітинах РМЗ після їх співкультивування з *B. animalis*. * — $p < 0,05$ порівняно з показниками контрольної групи

Аналіз експресії білків-регуляторів клітинного циклу і апоптозу (рис. 4 (2–4)) в клітинах T47D виявив, що *B. animalis* спричиняє проапоптичний вплив на досліджувані клітини, про що свідчить статистично достовірне підвищення експресії p21^{WAF1} (ядерна експресія) (рис. 5) і проапоптичних білків Вах (рис. 6) відносно контролю клітин. Слід зазначити, що саме у цих клітинах виявляли транслокалізацію експресії p21^{WAF1} — з цитоплазми (контроль) в ядро (після експозиції з *B. animalis*). За таких умов p21^{WAF1} буде діяти як білок-онкосупресор [32].

Зміни експресії білків-регуляторів апоптозу в клітинах MCF-7 свідчать, що *B. animalis* індукуює

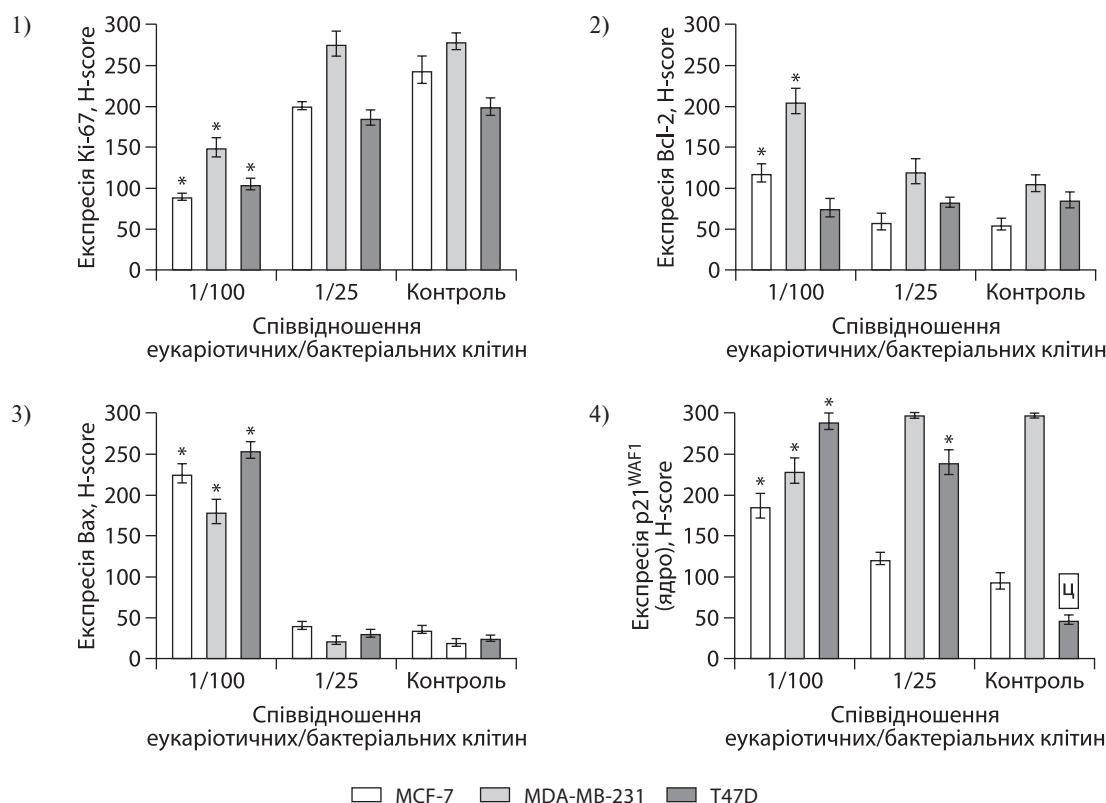


Рис. 4. Експресія білків-регуляторів клітинного циклу (1, 4) та апоптозу (2, 3) у клітинах РМЗ після їх співкультивування з *B. animalis*. * — $p < 0,05$ порівняно з показниками контрольної групи; ц — цитоплазма

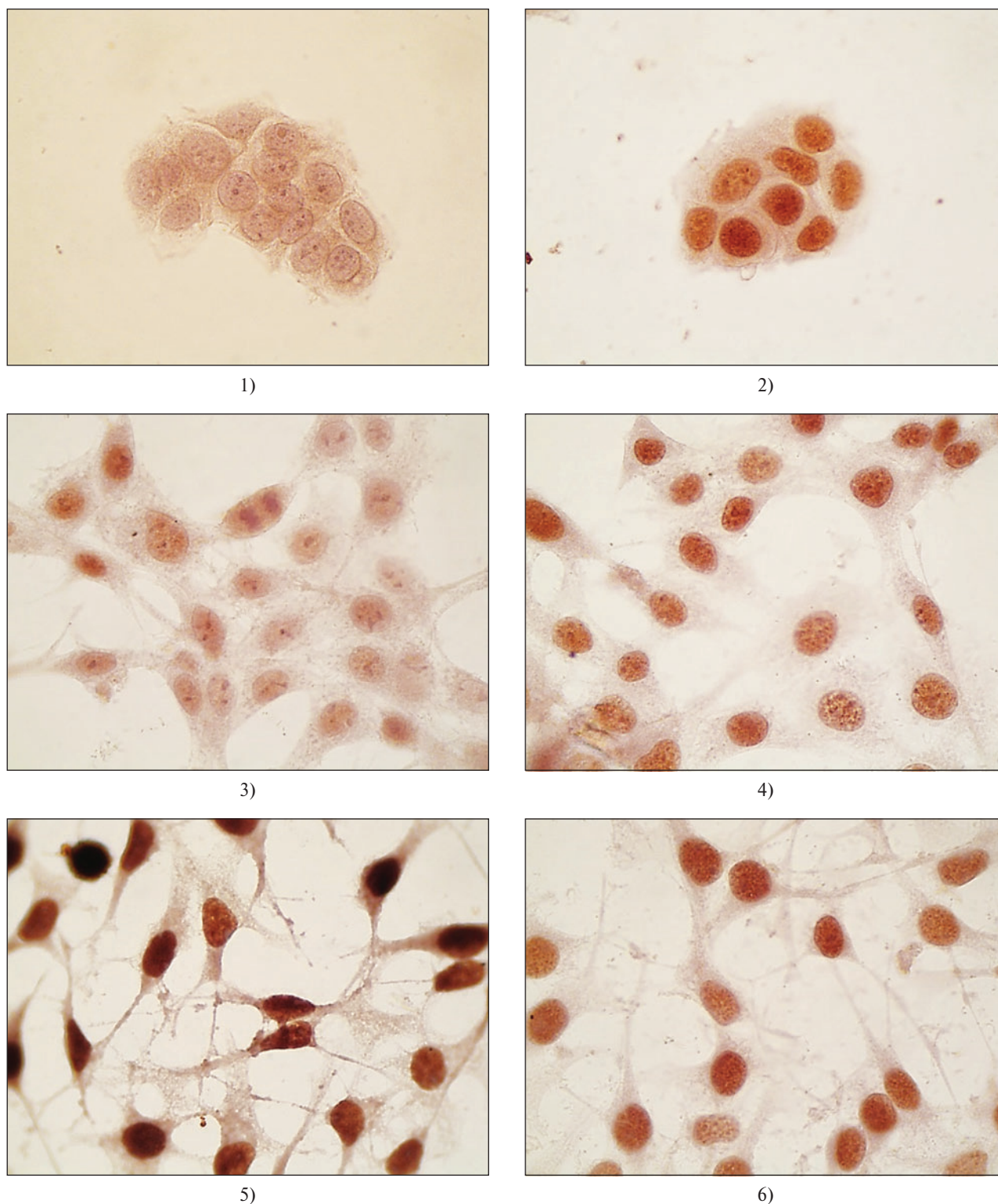
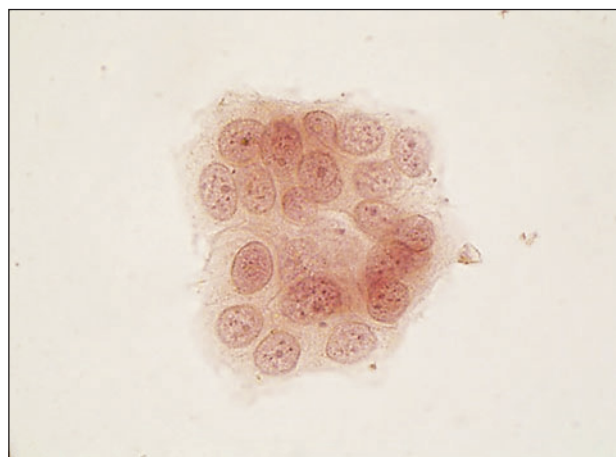


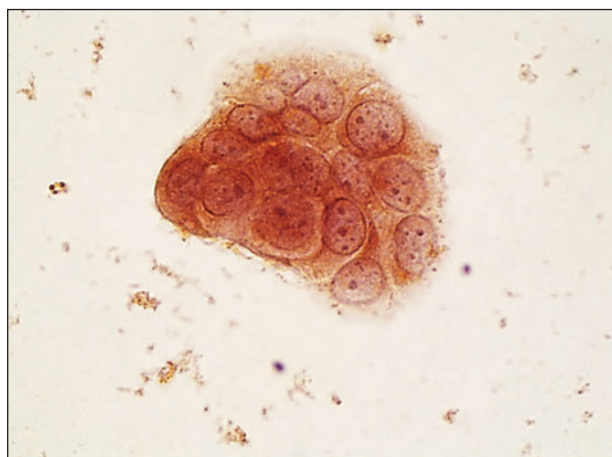
Рис. 5. Зміни експресії білка-регулятора клітинного циклу $p21^{WAF1}$ у клітинах РМЗ людини ліній Т47D (1, 2), МСF-7 (3, 4) та МDА-МВ-231 (5, 6) після їх співкультивування з *B. animalis*

статистично значуще підвищення експресії про-апоптичних білків Bax і $p21^{WAF1}$ (ятерна експресія) на фоні збільшення експресії антиапоптичного білка Bcl-2 (див. *рис. 4 (2–4)*). Отримані результати свідчать про активацію програми апоптозу в цих клітинах.

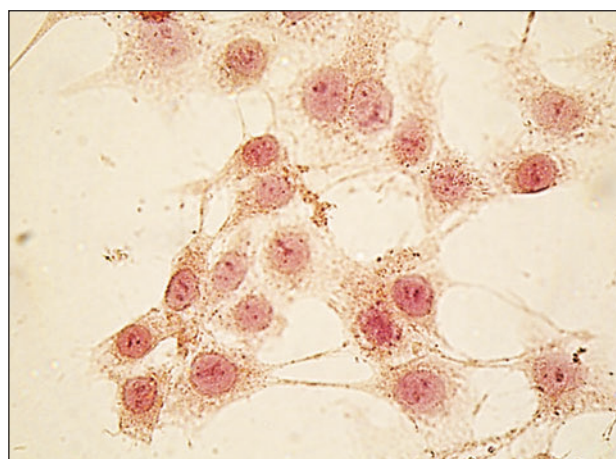
Експозиція клітин МDА-МВ-231 з *B. animalis* призводила до статистично достовірного підвищення експресії проапоптичного білка Bax і антиапоптичного білка Bcl-2 у порівнянні з контролем (*рис. 4 (2, 3)*). Цікаво, що саме у цих клітинах відмічали зниження ядерної експресії $p21^{WAF1}$



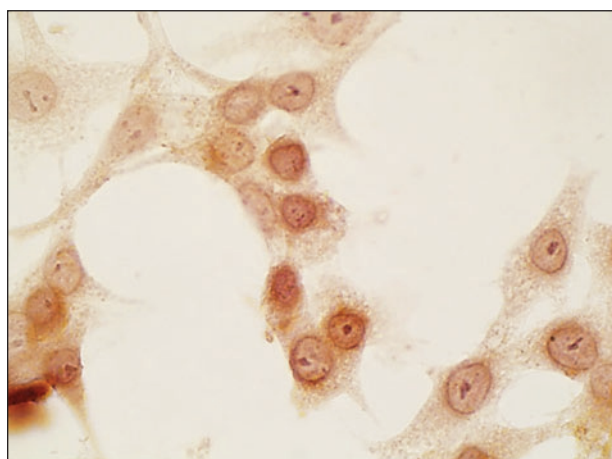
1)



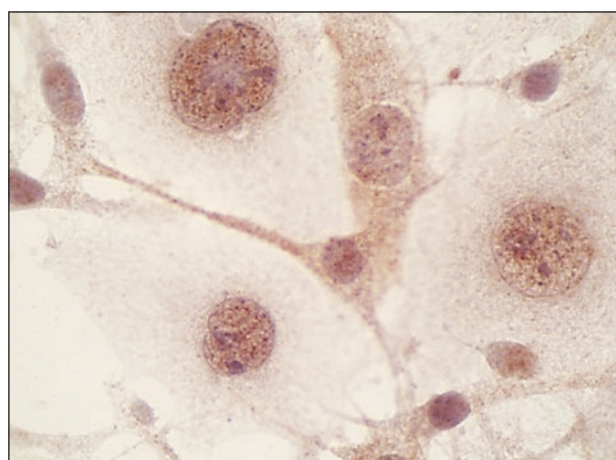
2)



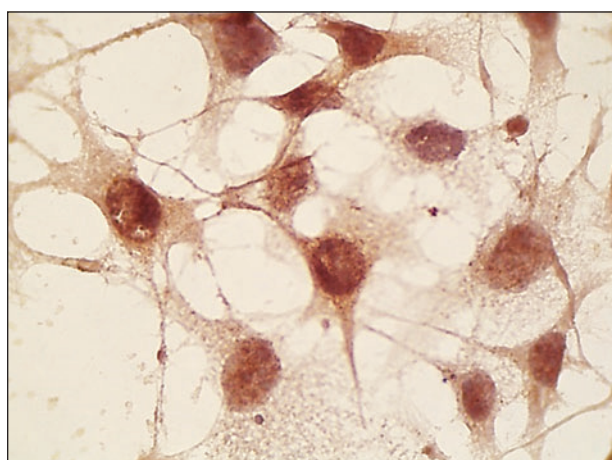
3)



4)



5)



6)

Рис. 6. Підвищення експресії проапоптичного білка Вах у клітинах РМЗ людини ліній Т47D (1, 2), МСF-7 (3, 4) та МDА-МВ-231 (5, 6) після їх співкультивування з *B. animalis*

(рис. 4 (4)). Отримані результати дозволяють припустити, що досліджувані біфідобактерії в клітинах МDА-МВ-231 активують програму апоптозу, однак індукція антиапоптичних механізмів не менш потужна, що забезпечує виживаність цих клітин.

Отже, отримані нами результати свідчать, що клітини люмінального підтипу лінії МСF-7 найбільш чутливі до впливу бактерій *B. animalis*. При цьому найбільш виражені зміни ростових характеристик клітин РМЗ людини *in vitro* спричиняє безпосередня взаємодія бактеріальних і злоякісних

клітин у порівнянні з окремою дією метаболітів бактеріального походження. Співкультивування клітин РМЗ з *B. animalis* призводить до підвищення у злоякісних клітинах продукції АФК і активації програми апоптозу.

Робота виконана в рамках НДР “Вивчення впливу представників лактобактерій, біфідобактерій та умовно-патогенних представників мікробіоти людини на особливості реалізації механізмів метаболічних порушень при пухлинному процесі” (№ держреєстрації 0121U113840).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Belkaid Y, Harrison OJ. Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity* 2017; **46** (4): 562–76. doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.008.
- González-Sánchez P, DeNicola GM. The microbiome(s) and cancer: know thy neighbor(s). *J Pathol* 2021; **254** (4): 332–43. doi: 10.1002/path.5661.
- Gopalakrishnan V, Helmink BA, Spencer CN, et al. The influence of the gut microbiome on cancer, immunity, and cancer immunotherapy. *Cancer Cell* 2018; **33** (4): 570–80. doi: 10.1016/j.ccell.2018.03.015.
- Kundu P, Blacher E, Elinav E, Pettersson S. Our gut microbiome: the evolving inner self. *Cell* 2017; **171** (7): 1481–93. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.024.
- Viswanathan S, Parida S, Lingipilli BT, et al. Role of gut microbiota in breast cancer and drug resistance. *Pathogens* 2023; **12** (3): 468. doi: 10.3390/pathogens12030468.
- Meng Z, Ye Z, Zhu P, et al. New developments and opportunities of microbiota in treating breast cancers. *Front Microbiol* 2022; **13**: 818793. doi: 10.3389/fmicb.2022.818793.
- Ravnik Z, Muthiah I, Dhanaraj P. Computational studies on bacterial secondary metabolites against breast cancer. *J Biomol Struct Dyn* 2021; **39** (18): 7056–64. doi: 10.1080/07391102.2020.1805361.
- Salimi V, Shahsavari Z, Safizadeh B, et al. Sodium butyrate promotes apoptosis in breast cancer cells through reactive oxygen species (ROS) formation and mitochondrial impairment. *Lipids Health Dis* 2017; **16** (1): 208. doi: 10.1186/s12944-017-0593-4.
- Thirunavukkarasan M, Wang C, Rao A, et al. Short-chain fatty acid receptors inhibit invasive phenotypes in breast cancer cells. *PLOS ONE* 2017; **12** (10): e0186334. doi: 10.1371/journal.pone.0186334.
- Wickramasinghe S, Pacheco AR, Lemay DG, Mills DA. Bifidobacteria grown on human milk oligosaccharides down-regulate the expression of inflammation-related genes in Caco-2 cells. *BMC Microbiol* 2015; **15** (1): 172. doi: 10.1186/s12866-015-0508-3.
- Wu BB, Yang Y, Xu X, Wang WP. Effects of Bifidobacterium supplementation on intestinal microbiota composition and the immune response in healthy infants. *World J Pediatr* 2016; **12** (2): 177–82. doi: 10.1007/s12519-015-0025-3.
- Kim KA, Jung IH, Park SH, Ahn YH, Huh CS, Kim DH. Comparative analysis of the gut microbiota in people with different levels of ginsenoside RB1 degradation to compound K. *PLoS ONE* 2013; **8** (4): e62409. doi: 10.1371/journal.pone.0062409.
- Schroeder BO, Birchenough GMH, Ståhlman M, et al. Bifidobacteria or fiber protects against diet-induced microbiota-mediated colonic mucus deterioration. *Cell Host Microbe* 2018; **23** (1): 27–40.e7. doi: 10.1016/j.chom.2017.11.004.
- Kim JE, Kim JY, Lee KW, Lee HJ. Cancer chemopreventive effects of lactic acid bacteria. *J Microbiol Biotechnol* 2007; **17** (8): 1227–35. PMID: 18051589.
- Nakkarach A, Foo HL, Song AAL, et al. Anti-cancer and anti-inflammatory effects elicited by short chain fatty acids produced by *Escherichia coli* isolated from healthy human gut microbiota. *Microb Cell Factories* 2021; **20** (1): 36. doi: 10.1186/s12934-020-01477-z.
- Górska A, Przysupski D, Niemczura MJ, et al. Probiotic bacteria: a promising tool in cancer prevention and therapy. *Curr Microbiol* 2019; **76**: 939–49. doi: 10.1007/s00284-019-01679-8.
- Karimi Ardestani S, Tafvizi F, Tajabadi Ebrahimi M. Heat-killed probiotic bacteria induce apoptosis of HT-29 human colon adenocarcinoma cell line via the regulation of Bax/Bcl2 and caspases pathway. *Hum Exp Toxicol* 2019; **38** (9): 1069–81. doi: 10.1177/0960327119851255.
- Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A ‘quickscore’ method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol* 1995; **48** (9): 876–8. doi: 10.1136/jcp.48.9.876.
- Kozak T, Lykhova O, Serhiichuk T, et al. Optimization of experimental model systems for evaluating reciprocal influence of *Bifidobacterium animalis* and human breast cancer cells in vitro. *Exp Oncol* 2023; **45** (4): 504–14. doi: 10.15407/exp-oncology.2023.04.504.
- Shimizu Y, Isoda K, Taira Y, et al. Anti-tumor effect of a recombinant Bifidobacterium strain secreting a claudin-targeting molecule in a mouse breast cancer model. *Eur J Pharmacol* 2020; **887**: 173596. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173596.
- Meng Z, Ye Z, Zhu P, et al. New Developments and Opportunities of Microbiota in Treating Breast Cancers. *Frontiers in Microbiology* 2022; **13**: 818793. doi.org/10.3389/fmicb.2022.818793.
- Ravnik Z, Muthiah I, Dhanaraj P. Computational studies on bacterial secondary metabolites against breast cancer. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 2021; **39** (18): 7056–64. doi.org/10.1080/07391102.2020.1805361.
- Salimi V, Shahsavari Z, Safizadeh B, et al. Sodium butyrate promotes apoptosis in breast cancer cells through reactive oxygen species (ROS) formation and mitochondrial impairment. *Lipids in Health and Disease* 2017; **16** (1): 208. doi.org/10.1186/s12944-017-0593-4.
- Thirunavukkarasan M, Wang C, Rao A, et al. Short-chain fatty acid receptors inhibit invasive phenotypes in breast cancer cells. *PLOS ONE* 2017; **12** (10): e0186334. doi.org/10.1371/journal.pone.0186334.
- Bilenduke E, Sterrett JD, Ranby KW, et al. Impacts of breast cancer and chemotherapy on gut microbiome, cognitive functioning, and mood relative to healthy controls. *Sci Rep* 2022; **12** (1): 19547. doi: 10.1038/s41598-022-23793-7.
- Vincenzi A, Goettert MI, de Souza CFV. An evaluation of the effects of probiotics on tumoral necrosis factor (TNF-α) signaling and gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev* 2021; **57**: 27–38. doi: 10.1016/j.cytogfr.2020.10.004.
- Khan AQ, Rashid K, AlAmodi AA, et al. Reactive oxygen species (ROS) in cancer pathogenesis and therapy: An update on the role of ROS in anticancer action of benzophenanthridine alkaloids. *Biomed Pharmacother* 2021; **143**: 112–42. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112142.
- Fortunato RS, Gomes LR, Munford V, et al. DUOX1 silencing in mammary cell alters the response to genotoxic stress. *Oxid Med Cell Longev* 2018; **2018**: 1–9. doi: 10.1155/2018/3570526.
- Kim SH, Lee WJ. Role of DUOX in gut inflammation: lessons from Drosophila model of gut-microbiota interactions. *Front Cell Infect Microbiol* 2014; **3**: 116. doi: 10.3389/fcimb.2013.00116.
- Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota engages different

signaling pathways to induce Duox2 expression in the ileum and colon epithelium. *Mucosal Immunol* 2015; **8** (2): 372–9. doi: 10.1038/mi.2014.74.

31. Alexander JL, Wilson ID, Teare J, *et al.* Gut microbiota modulation of chemotherapy efficacy and toxicity. *Nat Rev*

Gastroenterol Hepatol 2017, **14** (4): 356–65. doi: 10.1038/nrgastro.2017.20.

32. Čmielová J, Řezáčová M. Protein and its function based on a subcellular localization. *Journal of Cellular Biochemistry* 2011; **112** (12): 3502–06. doi: 10.1002/jcb.23296.

SUPPRESSION OF PROLIFERATION AND INCREASED OF PRO-APOPTOTIC PROTEINS EXPRESSION IN HUMAN BREAST CANCER CELLS AFTER THEIR CO-CULTIVATION WITH BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS IN VITRO

T. Kozak, O. Lykhova

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Summary. Aim: to determine the viability, proliferative activity, and reactive oxygen species (ROS) production in human breast cancer (BC) cells after their co-cultivation with a human microbiota member *Bifidobacterium animalis*. **Object and methods:** the study was conducted in vitro on human BC cells of MCF-7, T47D, and MDA-MB-231 lines. Cells were co-cultured with live *B. animalis* bacteria in direct or metabolite-mediated (contactless co-cultivation in the Insert system) interaction between eukaryotic and bacterial cells. ROS production was assessed by flow cytometry. The expression of proteins associated with the regulation of proliferation and apoptosis in BC cells was evaluated by immunocytochemical analysis. **Results:** the most pronounced changes in the growth characteristics of human BC cells in vitro are caused by

the direct interaction of bacterial and malignant cells, compared to the bacterial metabolite-mediated action. MCF-7 cells of the luminal subtype are most sensitive to the effects of *B. animalis*. Co-cultivation of BC cells with *B. animalis* leads to a decrease of Ki-67 expression in malignant cells, an increase in ROS production, and the expression of pro-apoptotic proteins Bax and p21^{WAF1}. Translocation of p21^{WAF1} expression from the cytoplasm to the cell nucleus was detected in T47D cells after exposure to *B. animalis*. **Conclusions:** the interaction of human BC cells with *B. animalis* and their secreted metabolites led to inhibition of the malignant cells proliferation, induction of oxidative stress, and apoptosis program activation in BC cells.

Keywords: microbiota, *Bifidobacterium animalis*, breast cancer, apoptosis, reactive oxygen species.

Адреса для листування:

Лихова О.О.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України
E-mail: AlexxDNA@gmail.com

Одержано: 05.04.2024