

Характеристика пристеночной кишечной микробиоты при раке толстой кишки

С.В. Волков, С.Л. Лобанов

Читинская государственная медицинская академия Минздрава России
672090, г. Чита, ул. Горького, 39а

Резюме

Рак толстой кишки клинически проявляет себя на поздних стадиях, поэтому ранняя диагностика заболевания представляет значительные трудности. В толстой кишке человека существует много видов микроорганизмов, образующих симбиоз с клетками кишечника для поддержания его нормальной функции. Цель исследования – определить состав пристеночной микрофлоры толстой кишки в условиях опухолевого процесса и оценить возможность использования полученных данных в диагностике рака толстой кишки. **Материал и методы.** Основная группа включала 63 человек, оперированных по поводу рака (аденокарциномы) левой половины ободочной кишки (нисходящий, сигмовидный, ректосигмоидный отделы) с I T1-2N0M0, II T3-4aN0M0, III T1-2N1M0 стадиями опухолевого процесса. Среди них 32 мужчины и 31 женщина в возрасте от 20 до 75 лет ($57,7 \pm 3,8$ года). У всех пациентов до госпитализации опухоль была подтверждена посредством колоноскопии с последующим гистологическим исследованием. Группу клинического сравнения в количестве 25 человек составили лица с хроническим геморроем вне обострения, которым проводилась колоноскопия. Забор материала основной группы, биоптаты опухолевой ткани и визуально неизменной слизистой оболочки толстой кишки осуществлялся интраоперационно во время удаления опухоли. У пациентов группы клинического сравнения забор материала осуществлялся в процессе колоноскопии. Состав кишечной микробиоты определялся бактериологическим методом. **Результаты и их обсуждение.** Анализ микробиоты толстой кишки онкологических больных и группы клинического сравнения выявил статистически значимые различия количественного состава *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli* (типичные), *Escherichia coli* (лактозонегативные), *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp. (CNS), *Candida* spp. Впервые установлено, что *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp. и возраст пациента могут быть дополнительно использованы в диагностике злокачественного процесса. **Заключение.** Созданная аддитивная модель может быть использована в качестве дополнительного скринингового критерия в ранней диагностике рака толстой кишки.

Ключевые слова: диагностика рака, опухолевая ткань, рак толстой кишки, кишечная микробиота, биоптат толстой кишки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Волков С.В., e-mail: vsv_19@mail.ru

Для цитирования: Волков С.В., Лобанов С.Л. Характеристика пристеночной кишечной микробиоты при раке толстой кишки. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (2): 74–78. doi: 10.18699/SSMJ20210210

Characterization of the parietal intestinal microbiota in colon cancer

S.V. Volkov, S.L. Lobanov

Chita State Medical Academy of Minzdrav of Russia
672090, Chita, Gorkogo str., 39a

Abstract

Introduction. Colon cancer (RCC) clinically manifests itself in the late stages, therefore, early diagnosis presents significant difficulties. There are many types of microorganisms in the human colon that form symbiosis with intestinal cells to maintain normal function. Aim of the study was to determine the composition of the parietal microflora of the colon under conditions of a tumor process and to assess the possibility of using these data in the diagnosis of colon cancer. **Material and methods.** The main group included 63 patients operated on for cancer (adenocarcinoma) of the left

half of the colon (descending, sigmoid, rectosigmoid regions) with I T1-2N0M0, II T3-4aN0M0, III T1-2N1M0 stages of the tumor process. Among them are 32 men and 31 women aged 20 to 75 years (57.7 ± 3.8 years). In all patients, before hospitalization, the tumor was confirmed by colonoscopy followed by histological examination. The group of clinical comparison in the amount of 25 people consisted of patients with chronic hemorrhoids without exacerbation, who underwent colonoscopy. Material from the main group, biopsies of tumor tissue and visually unchanged colon mucosa, were taken intraoperatively during tumor removal. In patients of the clinical comparison group, the material was taken during the colonoscopy process. The composition of the intestinal microbiota was determined by a bacteriological method. **Results and discussion.** As a result of comparing the colon microbiota of cancer patients and the clinical comparison group, statistically significant differences in the quantitative composition of *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli* (typical), *Escherichia coli* (lactose-negative), Enterobacteriaceae, *Staphylococcus* spp. (CNS), *Candida* spp. It was established for the first time that *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp. and the age of the patient can be further used in the diagnosis of a malignant process. **Conclusion.** The created additive model can be used as an additional screening criterion in the early diagnosis of colon cancer.

Key words: cancer diagnostics, tumor tissue, colon cancer, intestinal microbiota, colon biopsy.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence author: Volkov S.V., e-mail: vsv_19@mail.ru

Citation: Volkov S.V., Lobanov S.L. Characterization of the parietal intestinal microbiota in colon cancer. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (2): 74–78. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210210

Введение

Рак толстой кишки (РТК) клинически проявляется себя на поздних стадиях, поэтому ранняя диагностика заболевания представляет значительные трудности. В толстой кишке человека существует много видов микроорганизмов, образующих симбиоз с клетками кишечника для поддержания его нормальной функции. Известно, что некоторые бактерии обладают собственным канцерогенным потенциалом. Например, *Enterococcus faecalis* разрушает ДНК, индуцируя образование активных форм кислорода и азота [1]. Злокачественной трансформации толстокишечного эпителия способствует ETBF – токсин, выделяемый *Bacteroides fragilis*. У пациентов с РТК значительно повышено содержание антител IgA и IgG к *Fusobacterium* [2]; более того, бактерии *Salmonella enterica* могут модулировать иммунный ответ хозяина, способствуя злокачественной трансформации за счет повреждения ДНК. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, напротив, проявляют антиканцерогенную активность. Выявлены особые физиологические механизмы, специфичные для конкретных штаммов, благодаря которым осуществляется их защитная функция [3].

Канцерогенная активность некоторых бактерий совершенно очевидна и может осуществляться разными путями. Их взаимодействия и комбинации, вероятно, являются важным фактором в развитии РТК. Вместе с тем вопрос о взаимосвязи развития опухолевого процесса в толстой кишке и состава кишечной микробиоты остается малоизученным. Многочисленные, часто противоре-

чивые сведения послужили поводом к настоящему исследованию.

Цель работы – определить состав пристеночной микрофлоры толстой кишки в условиях опухолевого процесса и оценить возможность использования этих данных в диагностике рака толстой кишки.

Материал и методы

Основная группа включала 63 человека, оперированных по поводу рака (аденокарциномы) левой половины ободочной кишки (нисходящий, сигмовидный, ректосигмовидный отделы) с I T1-2N0M0, II T3-4aN0M0, III T1-2N1M0 стадиями опухолевого процесса. Только у пяти пациентов выявлен метастаз в одном регионарном лимфоузле, у остальных регионарного метастазирования не наблюдалось. У всех больных до госпитализации опухоль была подтверждена посредством колоноскопии с последующим гистологическим исследованием. Среди них 32 мужчины и 31 женщина в возрасте от 20 до 75 лет ($57,7 \pm 3,8$ года). Пациенты не получали какого-либо лечения в предоперационном периоде. Группу клинического сравнения составили 25 человек с хроническим геморроем вне обострения, которым проводилась колоноскопия. Пациенты обеих групп дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Забор материала основной группы осуществлялся интраоперационно во время удаления опухоли: первый биоптат был представлен опухолевой тканью, второй – визуально неизменной слизистой оболочкой толстой кишки прокси-

мальнее опухоли на 10 см. У пациентов группы клинического сравнения забор материала выполнялся в процессе колоноскопии. Состав кишечной микробиоты определялся бактериологическим методом с использованием стандартных тест-систем StaphyTest, StreptoTest, и EnteroTest (LaChema, Чехия).

Проверка нормальности распределения значений переменных в группах наблюдения проводилась с использованием критерия Шапиро – Уилка. Переменные представлены в виде медианы и межквартильных интервалов (Me [Q1—Q3]). Для оценки значимости статистических различий между исследуемыми группами в силу отсутствия нормального распределения переменных

использовали непараметрический ранговый критерий Краскела – Уоллиса. Для анализа корреляционной связи между исследуемыми признаками применялся коэффициент корреляции Спирмена, сила корреляционной связи оценивалась как статистически значимая при $p < 0,05$. При помощи регрессионного логистического анализа дана оценка влияния возраста пациента и определенных бактерий толстой кишки на формирование возможных групп риска по развитию рака толстой кишки. Значимые факторы вынесены в прогностическую модель, данные которой представлены в табл. 1. Чувствительность и специфичность построенной аддитивной модели определяли при помощи ROC-анализа.

Таблица 1. Составляющие аддитивной модели

Table 1. Components of the additive model

Предиктор	Коэффициент	Отношение шансов [95%-й доверительный интервал]	Wald χ^2	p
Константа	10,29		3,329	0,0681
Возраст	0,1756	1,19 [1,09–1,36]	10,553	0,00116
<i>Bifidobacterium</i> spp.	–1,876	0,153 [0,0312–0,414]	8,748	0,0031
<i>Enterococcus</i> spp.	–1,283	0,277 [0,0833–0,67]	6,208	0,0127

Таблица 2. Состав кишечной микробиоты больных РТК и группы клинического сравнения (количество микроорганизмов в 1 г биоптата ($\lg = 101$ КОЕ/г))

Table 2. The composition of the parietal microflora of the colon under conditions of a tumor process and clinical comparison group

Микроорганизмы	Больные РТК		Группа клинического сравнения (3)	p_{1-2}	p_{1-3}	p_{2-3}
	Неизменная слизистая оболочка (1)	Опухолевая ткань (2)				
<i>Lactobacillus</i> spp.	6,6 [6,0–8,0]	5,5 [5,0–6,0]	8,2 [7,0–9,0]	0,003	0,003	0,002
<i>Bifidobacterium</i> spp.	6,9 [6,0–8,0]	5,6 [5,0–7,0]	7,6 [6,0–8,0]	0,001	0,026	0,001
<i>Clostridium</i> spp.	2,9 [2,0–3,0]	3,7 [2,0–5,0]	2,2 [2,0–3,0]	0,004	0,001	0,001
<i>E. coli</i> (типичные)	5,4 [5,0–6,0]	4,6 [3,0–6,0]	6,1 [6,0–7,0]	0,001	0,049	0,009
<i>E. coli</i> (гемолитические)	3,1 [3,0–4,0]	3,3 [3,0–6,0]	3,0 [3,0–3,0]	0,003	>0,05	0,042
<i>E. coli</i> (лактозонегативные)	3,3 [3,0–4,0]	3,7 [3,0–4,0]	3,1 [3,0–4,0]	0,004	>0,05	0,002
Enterobacteriaceae	5,4 [4,0–6,0]	5,8 [3,0–6,0]	5,8 [5,0–6,0]	0,001	0,001	0,029
<i>Pseudomonas</i> spp.	3,0 [3,0–3,0]	3,2 [3,0–4,0]	3,0 [3,0–3,0]	0,008	>0,05	>0,05
<i>Staphylococcus</i> spp. (CNS)	3,0 [3,0–3,0]	3,0 [3,0–3,0]	3,3 [3,0–4,0]	>0,05	0,002	0,002
<i>Candida</i> spp.	2,8 [2,0–3,0]	3,2 [3,0–4,0]	3,0 [3,0–4,0]	0,002	<0,0001	0,002

Результаты

В ходе исследования у пациентов в толстой кишке выявлены следующие микроорганизмы: *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli* (типичные), *E. coli* (гемолитические), *E. coli* (лактозонегативные), *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp. (CNS), *Candida* spp., *Pseudomonas* spp., *Helicobacter pylori*. Анализ микробиоты толстой кишки онкологических больных и группы клинического сравнения выявил статистически значимые различия количественного состава *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp., *E. coli* (типичные), *E. coli* (лактозонегативные), *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp. (CNS), *Candida* spp. (табл. 2).

При детальном анализе установлено, что возраст пациента не имел статистически значимых корреляционных связей с уровнем каждого конкретного микроорганизма, но его значение при комплексной оценке совершенно очевидно. В результате получено сочетание данных (*Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp. и возраст пациента), которое позволило создать аддитивную модель (чувствительность 92 %, специфичность 95,2 %) для формирования возможных групп риска по развитию рака толстой кишки (см. табл. 1, рисунок):

$$B = B_0 + B_1 \times X_1 + \dots + B_n \times X_n$$

$$B = 10,29 + 0,1756 \times \text{Возраст} - 1,876 \times$$

$$\times \text{Bifidobacterium} - 1,283 \times \text{Enterococcus}$$

$$p(\text{ИСХОД}) = 1/(1+e^{-B})$$

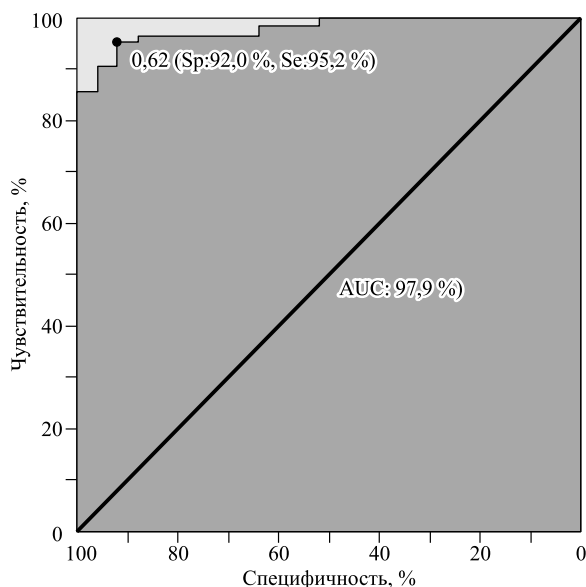


Рис. Результаты ROC-анализа аддитивной модели
Fig. ROC analysis results of the additive model

Обсуждение

На современном этапе развития науки совершенно очевидно, что ранняя диагностика РТК, основанная на исследовании кишечной микробиоты, является перспективной и требует детального изучения. По данным современной научной литературы неоднократно подтверждено, что микроорганизмы как стимулируют канцерогенез (*Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Bacteroides fragilis*, *Streptococcus bovis* / *Streptococcus gallolyticus*, *Fusobacterium nucleatum*, *H. pylori*, *Salmonella enterica*), так и препятствуют (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) канцерогенным воздействиям на эпителий толстой кишки при непосредственном или опосредованном влиянии на организм [3–5]. В подобных исследованиях брались за основу количественный и качественный состав кишечной микробиоты и выделяемые микроорганизмами биологические вещества [2, 6, 7]. При исследовании биопсийного материала у пациентов с РТК выявлено, что 10 микробов (*Escherichia* / *Shigella*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Prevotella*, *Oribacterium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Neisseria*, *Porphyromonas* и *Akkermansia*) имеют значимую связь с РТК ($p < 0,05$) [8, 9]. В нашем исследовании проведено сравнение количественного и качественного состава микробиоты толстого кишечника относительно здоровых людей и больных РТК (биоптаты опухолевой ткани и неизменной слизистой оболочки). Впервые установлено, что *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp. и возраст пациента при их комплексной оценке могут быть дополнительно использованы в диагностике злокачественного процесса. Более того, полученные результаты позволяют систематизировать выявленные закономерности в конкретную универсальную аддитивную модель для максимально раннего выявления потенциальной группы риска и последующих диагностических мероприятий.

Выводы

1. При РТК происходит изменение количественного и качественного состава кишечной микробиоты. Наиболее значимые различия выявлены для *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp., *E. coli* (типичные), *E. coli* (лактозонегативные), *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp. (CNS), *Candida* spp.

2. Созданная аддитивная модель может быть использована в качестве одного из скрининговых критериев в комплексной диагностике рака толстой кишки, что позволит оптимизировать лечебную тактику и использовать хирургический

метод лечения РТК в качестве основного и единственного.

Список литературы / References

1. Dai Z., Zhang J., Wu Q., Chen J., Liu J., Wang L., Chen C., Xu J., Zhang H., Shi C., Li Z., Fang H., Lin C., Tang D., Wang D. The role of microbiota in the development of colorectal cancer. *Int. J. Cancer*. 2019; 145 (8): 2032–2041. doi: 10.1002/ijc.32017
2. Hernández-Luna M.A., López-Briones S., Luría-Pérez R. The four horsemen in colon cancer. *J. Oncol.* 2019; 2019: 5636272. doi: 10.1155/2019/5636272
3. Bahmani S., Azarpira N., Moazamian E. Anti-colon cancer activity of Bifidobacterium metabolites on colon cancer cell line SW742. *Turk. J. Gastroenterol.* 2019; 30 (9): 835–842. doi: 10.5152/tjg.2019.18451
4. Sivan A., Corrales L., Hubert N., Williams J.B., Aquino-Michaels K., Earley Z.M., Benyamin F.W., Lei Y.M., Jabri B., Alegre M.L., Chang E.B., Gajewski T.F. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*. 2015; 350 (6264): 1084–1089. doi: 10.1126/science.aac4255
5. Wei Y., Li F., Li L., Huang L., Li Q. Genetic and biochemical characterization of an exopolysaccharide with in vitro antitumoral activity produced by *Lactobacillus fermentum* YL-11. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 2898. doi: 10.3389/fmicb.2019.02898
6. Dai Z., Zhang J., Wu Q., Chen J., Liu J., Wang L., Chen C., Xu J., Zhang H., Shi C., Li Z., Fang H., Lin C., Tang D., Wang D. The role of microbiota in the development of colorectal cancer. *Int. J. Cancer*. 2019; 145 (8): 2032–2041. doi: 10.1002/ijc.32017
7. Zamani S., Taslimi R., Sarabi A., Jasemi S., Sechi L.A., Feizabadi M.M. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a possible etiological candidate for bacterially-induced colorectal precancerous and cancerous lesions. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2020; 9: 449. doi: 10.3389/fcimb.2019.00449
8. Sheng Q.S., He K.X., Li J.J., Zhong Z.F., Wang F.X., Pan L.L., Lin J.J. Comparison of gut microbiome in human colorectal cancer in paired tumor and adjacent normal tissues. *Onco Targets Ther.* 2020; 13: 635–646. doi: 10.2147/OTT.S218004
9. Zorron Cheng Tao Pu L., Yamamoto K., Honda T., Nakamura M., Yamamura T., Hattori S., Burt A.D., Singh R., Hirooka Y., Fujishiro M. Microbiota profile is different for early and invasive colorectal cancer and is consistent throughout the colon. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2019; 35 (3): 433–437. doi: 10.1111/jgh.14868

Сведения об авторах

Степан Владимирович Волков, ORCID: 0000-0002-8696-9562; e-mail: vsv_19@mail.ru

Сергей Леонидович Лобанов, д.м.н., профессор, ORCID: 0000-0003-1665-3754; e-mail: slobanov15@mail.ru

Information about the authors:

Stepan V. Volkov, ORCID: 0000-0002-8696-9562; e-mail: vsv_19@mail.ru

Sergey L. Lobanov, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0003-1665-3754; e-mail: slobanov15@mail.ru

Поступила в редакцию 08.12.2020

Принята к публикации 11.03.2021

Received 08.12.2020

Accepted 11.03.2021