MODIFICĂRILE CANTITATIVE ȘI CALITATIVE ALE MICROBIOTEI INTESTINALE CA PREDICTOR PRECOCE AL CANCERULUI COLORECTAL

QUANTITATIVE AND QUALITATIVE CHANGES IN THE INTESTINAL MICROBIOTA AS AN EARLY PREDICTOR OF COLORECTAL CANCER

Ana LEORDA, ORCID: 0000-0002-2923-8843
Vladimir ȘEPTIȚCHI, ORCID: 0000-0002-6306-7021
Dorina TOLSTENCO, ORCID:
Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie, Universitatea de Stat din Moldova

CZU: 616.34-008.87-006

e-mail: leorda-ana64@mail.ru
e-mail: septitchi@mail.ru
e-mail: tolstencodorina@gmail.com

As a pressing global health problem, colorectal cancer (CRC) requires effective therapeutic strategies, and the underlying mechanisms remain an essential subject of investigation in this field. The problem of identifying some predictive markers of the probability of the appearance of this type of malignant neoplasms is quite current. Disturbance of the normal community of intestinal bacteria represents an important problem in the development of CRC, thus new predictive markers of the probability of the appearance of this type of malignant neoplasms can be identified in changes in the qualitative and quantitative composition of the intestinal microbiota (MI). The subsequent development of preparations based on previously identified indigenous medicinal plants, which on the one hand have an anti-cancer effect, and on the other hand possess prebiotic properties, stimulate the multiplication of normal intestinal microbial flora. Targeted formation and maintenance of normal intestinal microbiota will be the basis for the development of new strategies in the prevention and treatment of CRC.

Keywords: *anti-cancer effect, colorectal cancer, intestinal microbiota, medicinal plants, predictive markers.*

Perturbarea funcționării microbiotei intestinale (MI), crește riscul de a dezvolta un număr semnificativ de boli (infecțioase, metabolice, autoimune, oncologice, neurologice și endocrine) [1]. Cancerul colorectal (CRC) este unul dintre cele mai frecvente forme de cancer la nivel mondial (locul 3 ca frecvență conform estimării GLOBOCAN 2020 pentru 185 de țări și reprezintă o cauză majoră de mortalitate atribuită cancerului (locul 2 la nivel mondial) [2]. Cercetătorii au făcut predicții pentru anul 2023 pentru toate tipurile de cancer, analizând datele pentru cele mai populate cinci țări ale UE – Franța, Germania, Italia, Polonia și Spania – precum și pentru cele 27 de state membre ale UE în ansamblu, cu o analiză separată pentru Regatul Unit. Se estimează, că cancerul pulmonar va fi principala cauză de deces prin cancer atât la bărbați, cât și la femei în UE,

cu rate de 29,8 și, respectiv 13,6 decese la 100.000. Acesta este urmat de CRC (14,7 la 100.000) și de prostată (9,5 la 100.000) la bărbați și cancerul de sân (13,6 la 100.000) și CRC (8,1 la 100.000) la femei. Un model similar a fost observat în Marea Britanie [3]. Fiind o problemă de sănătate atât de stringentă la nivel mondial, CRC necesită strategii terapeutice eficiente, iar mecanismele, care stau la bază rămân un subiect esențial al investigațiilor în domeniul biologiei cancerului. Dacă boala este depistată într-un stadiu tardiv, rata de supraviețuire la 5 ani nu depășește 10%, dar dacă este detectată într-un stadiu incipient, această cifră poate ajunge la 90% [4]. Prin urmare, problema dezvoltării și punerii în practică a unor noi metode de determinare a riscului de dezvoltare a CRC pentru prevenirea și diagnosticul lui precoce, identificarea unor markeri predictivi ai probabilității apariției acestui tip de neoplasme maligne este destul de actuală.

Studii privind analiza asocierii dintre disbioza microbiană și CRC denotă, că colonul uman găzduiește un număr mare de microorganisme care joacă un rol crucial în carcinogeneza colorectală. În ultimul deceniu, tehnicile de detectare moleculară și metabolomice au extins cunoștințele privind rolul speciilor microbiene specifice în promovarea tumorigenezei [5]. Au fost efectuate multe studii pentru a identifica microorganismele cauzale CRC și pentru a compara microbiota indivizilor sănătoși și a celor cu CRC. Căile prin care microbiota promovează dezvoltarea CRC nu sunt încă pe deplin înțelese, însă mecanismele presupuse includ: deteriorarea ADN-ului, producerea de metaboliți cancerigeni și provocarea inflamației cronice. Într-o stare de disbioză, intestinul pierde bacterii protectoare și este îmbogățit cu bacterii patogene, care promovează cancerul sau funcțiile asociate cu cancerul, cum ar fi angiogeneza, pierderea apoptozei și proliferarea celulară. A fost stabilită o legătură puternică între disbioză și anumite specii de bacterii și chiar virusuri implicate în tumorigeneză. Datorită diversității MI, există o mare posibilitate ca multiplicarea unor, sau diminuarea altor bacterii, cu modificarea funcțiilor lor metabolice să ducă la CRC [6]. În rezultatul unor studii cu implicarea a 30 de pacienți cu polipi și a 30 de voluntari sănătoși (grupul martor) au fost colectate mostre de conținut intestinal și materiale ale biopsiei colonului, precum și a fost analizată anamneza medicală despre caracteristicile dietei voluntarilor. A fost stabilit, că unele tipuri de bacterii sunt depistate numai la pacienții cu polipi, iar altele – numai la persoanele fără polipoză. Prezența bacteriei anaerobe Gram-pozitive *Eubacterium ramulus* a fost stabilită în masele fecale ale pacienților cu excrescențe polipoase, în timp ce la participanții fără polipi s-a observant prevalarea *Ruminococcus sp* și a bacteriilor Gram-pozitive din filumul *Firmicute*. Microorganismele aerobe Gram-negative *Acidovorax sp.* au fost depistate mult mai des în biopsiile pacienţilor cu polipi. Trebuie remarcat faptul, că afectarea cu polipi a intestinului gros se referă la bolile precanceroase.

În prezent, există o creștere a maladiilor canceroase în rândul vârstnicilor. În pofida progreselor evidente în diagnosticul acestei boli si în tratamentul ei, oncopatologia ocupa o pozitie ridicată în structura morbidității generale. Modificări în diverse clustere de bacterii din MI pot servi drept marker timpuriu pentru verificarea malignității neoplasme ale intestinului gros la persoanele din această categorie de vârstă. Unii cercetători suge-

rează, că determinarea numărului de *Fusobacterium* în microbiomul intestinal poate servi drept indicator al primei linii de diagnostic, ceea ce ar contribui la detectarea unui proces patologic în stadiul de precancer. Acest fapt este oportun pentru inițierea unor manipulări terapeutice în timp util, îmbunătățirea calității vieții și creșterea duratei acesteia [7]. În studii recente a fost investigată prevalența *Streptococcus gallolyticus subspecia gallolyticus* (SGG), care este un oportunist patogen și cauzează infecții invazive la vârstnici asociată adesea cu neoplazie de colon. Prevalența SGG în conținutul intestinal al pacienților cu colonoscopie normală (control) a fost comparată cu pacienții cu adenoame colorectale sau cu CRC din stadiile I până la IV. A fost, de asemenea, investigată prezența insulei pks care codifică colibactina, precum și a altor bacterii asociate CRC, cum ar fi *Bacteroides fragilis toxicogene*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*. Rezultatele denotă prevalența SGG semnificativ crescută în grupul cu CRC, o creștere puternică și semnificativă a B. fragilis toxinogenă la pacienții cu adenom în stadiu incipient și a insulei pks la CRC în stadiu avansat, precum și niveluri crescute de *F. nucleatum* și *P. micra* în conținutul intestinal al pacienților cu CRC. În plus, acești cinci markeri bacterieni au fost detectați numai la pacienții cu CRC. Astfel, aceste date indică, că prevalența sau nivelurile relative ale bacteriilor asociate cu CRC variază în perioada dezvoltării acestei maladii. Printre acestea, *B. fragilis* a fost identificat ca fiind singurul patobiont detectat în stadiul incipient al adenomului [8]. Numeroase date denotă implicarea *E. coli* în mecanismul apariției cancerului. Unele tulpini poartă așa-numitele „insule de patogenitate” sau diferite elemente mobile, care sunt asociate cu boli intra- și extra-intestinale. Insula genomică pks codifică elementul necesar pentru sinteza unei genotoxine hibride peptidă-poliketid – colibactina, care induce rupturi duble ale catenei ADN-ului, aberații cromozomiale și perturbarea ciclului celular. Studii recente au descoperit insula de patogenitate și la alți membri ai familiei *Enterobacteriaceae*, cum ar fi: *Citrobacter, Klebsiella* și *Enterobacter* [9]. Astfel, pe lângă factorii de risc cunoscuți, cum ar fi dietele bogate în grăsimi și consumul de alcool, *E. coli intestinală genotoxică,* fiind bacterie producătoare de colibactină, joacă un rol aparte în dezvoltarea CRC. Într-adevăr, studiile microbiomului uman au demonstrat, că diversitatea bacteriană este scăzută atât în CRC, cât și în bolile inflamatorii ale intestinului, fapt asociat cu disbioza. Tulpinile *E. coli,* care conțin insula de patogenitate Pks, *Fusobacterium nucleatum* și *Providencia*, sunt suprareprezentate în CRC, în timp ce lactobacilii, bacteriile producătoare de butirat și bacterii precum *Roseburia* și *Fecalibacterium* sunt subreprezentate [10]. Bacteriile producătoare de colibactină sunt abundente în componența MI în CRC și promovează tumorigeneza colonului la modelele de șoarece. Un studiu recent demonstrează o legătură directă între expunerea celulelor epiteliale intestinale umane la colibactină și două amprente mutaționale unice găsite în CRC la om [11]. Anterior, mai multe rapoarte și studii clinice au arătat, că comportamentul microbian intestinal poate duce la modificări patologice în intestinele gazdei. Modificările pot fi împărțite în: modificări epigenetice și modificări carcinogene la nivel de gene, care în cele din urmă promovează producerea și dezvoltarea CRC. În unele studii sunt analizate căile de sem-

nalizare microbiană în bariera epitelială intestinală, rolul MI în tumorile inflamatorii colorectale și carcinogeneza microbiană tipică, și tind să atingă obiectivul de a trata CRC, folosind tehnologiile actuale uzuale, cum ar fi transplantul microbiologic fecal [12]. Rolul microorganismelor intestinale, care inițiază și facilitează procesul CRC devine din ce în ce mai clar. Studii recente au identificat *Streptococcus bovis, Bacteroides fragilis enterotoxigen, Fusobacterium nucleatum, Enterococcus faecalis, Escherichia coli* și *Peptostreptococcus anaerobiusca* în calitate de potențiali agenți patogeni ai CRC. Unele rezultate rezumă mecanismele implicate în carcinogeneza colorectală legată de microbiotă, inclusiv inflamația, bacteriile patogene și factorii lor de virulență, genotoxinele, stresul oxidativ, metaboliții bacterieni și biofilmul [4]. Studiile asupra CRC denotă, că acest tip de cancer este întâlnit la ambele sexe și poate debuta la orice vârstă, dar este seminificativ mai frecvent in rândul bărbaților după vârsta de 50 de ani (riscul crește odată cu înaintarea în vârstă) [13]. Aproximativ 80% dintre cazuri sunt sporadice și apar la persoane fără riscuri aparente, din cauza unor factori externi cum ar fi dieta, fumatul (în special, în cazurile unor debuturi precoce au o influență foarte mare în determinarea cancerului la colon) și alcoolul (consumat în cantități crescute zilnic). Privind dieta – consumul crescut de grăsimi și neglijarea aportului de fibre alimentare, în special grăsimile animale nesaturate, uleiurile vegetale saturate; reducerea fibrelor vegetale din dietă – acestea, fiind consumate determină formarea unui scaun moale, care crește gradul de eliminare a factorilor carcinogeni ingerați. Dietele bogate în fibre reglează MI, reduc riscul de dezvoltare a CRC și pot fi rezultative în gestionarea mai bună a terapiei [14]. Unele boli inflamatorii intestinale – rectocolita ulcerohemoragica și boala Crohn cresc riscul de CRC de 4-20 de ori față de populația generală. Au fost revizuite diverse specii microbiene și asocierea lor cu tumorigeneza colorectală și consumul de carne roșie/procesată. Literatura de specialitate a demonstrat o abundență semnificativă de *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus bovis/gallolyticus*, *Escherichia coli* și *Bacteroides fragilis* la pacientii cu adenom sau adenocarcinoma, comparativ cu indivizii sanatosi. Legătura dintre dietă, microbiomul intestinal și CRC a fost abordată și de Bultman S.J. [10]. Autorul susține că fibrele alimentare, carnea roșie, grăsimile animale au efecte deosebit de puternice asupra structurii microbiomului și influențează diferit riscul de CRC. Schimbările de durată în dieta noastră influențează CRC prin modificări ale microbiomului. Mecanismele de promovare a carcinogenezei de colon în acest caz includ: capacitatea microorganismelor de aderare la celulele colonului, modularea inhibării genelor supresoare tumorale, activarea oncogenelor și genotoxicitatea, precum și a țintelor responsabile de angiogeneză. Rolul acestor microorganisme în conjugarea cu componentele cărnii, inclusiv compușii N-nitrozo, amine heterociclice și hem a fost, de asemenea, evident în rezultatul unor studii multiple. Datele obținute în urma acestor investigații susțin rolul consumului de carne roșie în modularea progresiei CRC, precum și probabilitatea, că microbiomul intestinal poate să influențeze relația dintre CRC și dietă [5]. Conceptul recent al organismului uman, care susține o comunitate diversă de microorganisme a relevat rolul important pe care acestea îl joacă în mod sinergic în menținerea homeosta-

ziei normale. Echilibrul dintre microbiom și celulele epiteliale ale corpului uman este esențial pentru fiziologia normală. Dovezile din analiza meta-genomului sunt bazate pe faptul depistării unui dezechilibru sever al MI la pacienții cu CRC. Mai multe studii au sugerat, că MI poate secreta metaboliți – acizi grași cu lanț scurt (SCFA), vitamine, polifenoli și poliamine, care modulează susceptibilitatea colonului și a rectului, modificând inflamația și deteriorarea ADN-ului. Starea de dezechilibru a microbiomului (disbioza) a fost raportată la pacienții cu CRC, cu o populație în creștere de microbi patogeni, care provoacă o stare proinflamatoare și o scădere a microbilor, cunoscuți și sub denumirea de microbi comensali, care produc butirat. Asocierea complexă dintre comunitățile microbiene patologice care duce la progresia cancerului nu este încă pe deplin înțeleasă. Însă un lucru este cert, că un profil modificat al metaboliților microbieni joacă un rol direct în metabolismul CRC [10]. Modularea microbiomului este una dintre cele mai perspective strategii în medicină pentru a îmbunătăți sănătatea indivizilor. Prin urmare, cercetările ulterioare cu implicarea MI în studiile clinice în oncologie, precum și în tratamentul pacienților cu CRC sunt justificate pentru a determina eficacitatea tratamentelor sistemice a CRC, pentru a minimiza efectele adverse și pentru a crește ratele de supraviețuire [15]. Un număr tot mai mare de studii recente sugerează, că progresia CRC este legată de compoziția MI, care în condiții normale servește drept barieră pentru alți agenți patogeni sau infecții din intestin și modulează inflamația prin implicarea sistemului imunitar al gazdei. Componența MI nu este legată doar de inflamația intestinală asociată cu tumorigeneza, ci și de modularea răspunsului imun anticancer. Studiile au arătat, că MI poate fi folosită în calitate de biomarker pentru a prezice efectul imunoterapiei și pentru a îmbunătăți eficacitatea imunoterapiei în tratarea CRC prin modulare [16]. Mai sus au fost indicate mai multe specii bacteriene, care sunt implicate în dezvoltarea CRC, însă modificările asociate cu CRC ale microbiotei fecale și potențialul lor pentru screening-ul acestui tip de cancer rămân a fi explorate. Au fost efectuate studii, privind secvențierea metagenomică a probelor fecale pentru identificarea markerilor taxonomici care disting pacienții cu CRC de grupul martor (fără tumori) într-o populație de studiu de 156 de participanți. Depistarea hemoragiilor oculte în scaun, se realizează de obicei cu ajutorul unui test imunologic efectuat din fecale (FIT), metoda fiind extrem de fiabilă, inclusiv pentru detectarea unor cantități extrem de mici de sânge, aflate în compoziția fecalelor. Rezultatele acestor investigații au arătat, că precizia detectării metagenomice a CRC a fost similară cu FIT, iar atunci când ambele abordări au fost combinate, sensibilitatea s-a îmbunătățit cu > 45% față de FIT, menținându-și în același timp specificitatea. Precizia detectării metagenomice a CRC nu se deosebea semnificativ între cancerul în stadiu incipient și cel tardiv și a fost validată în populații independente de pacienți și de control (N = 335) din diferite țări. Modificările asociate cu CRC în microbiomul fecal au reflectat, cel puțin parțial, compoziția comunității microbiene la nivelul tumorii în sine, indicând faptul că diferențele observate pot dezvălui interacțiuni gazdă-microb legate de tumoră. Într-adevăr, a fost dedusă o schimbare metabolică de la degradarea fibrelor în grupul martor la utilizarea carbohidraților și aminoacizilor gazdă la pacienții cu

CRC, însoțită de o creștere a metabolismului lipopolizaharidelor [16, 17]. Evaluarea MI umane poate fi critică în acest sens, deoarece perturbarea comunității normale de bacterii intestinale este o problemă importantă în dezvoltarea CRC. Cu toate acestea, mai multe studii au evaluat deja diferite aspecte ale asocierii dintre microbiotă și CRC. Nu numai că au fost elucidate modificările bacteriilor intestinale detectate în probele de scaun și țesut la pacienții cu CRC, dar în plus, a fost evaluată importanța metaboliților derivați din bacteriile intestinale, relația lor cu microbiota și modificările epigenetice [18]. Prin urmare, CRC reprezintă până în prezent unul dintre cele mai comune tipuri de cancer din lume, iar tot mai multe dovezi indică faptul, că MI este implicată în carcinogeneza, formarea și progresia CRC, precum și în răspunsul său la diferite terapii sistemice. Influența geografiei, rasei, vârstei, sexului și dietei asupra compoziției MI servesc drept informații importante pentru screening-ul, detectarea precoce și predicția rezultatului tratamentului CRC. Măsurile menite pentru a îmbunătăți valorile clinice ale MI vor sta la baza noilor strategii pentru prevenirea și tratarea CRC.

Astfel, perturbarea comunității normale de bacterii intestinale reprezintă o problemă importantă în dezvoltarea CRC, astfel noi markeri predictivi ai probabilității apariției acestui tip de neoplasme maligne pot fi identificați în modificări ale compoziției calitative şi cantitative a MI. Este argumentată elaborarea ulterioară a preparatelor în baza plantelor medicinale autohtone identificate anterior, care pe de o parte au efect anti-cancer, iar pe de altă parte posedă și proprietăți prebiotice, stimulând multiplicarea florei microbiene intestinale normale. Formarea dirijată și menținerea valorilor clinice ale microbiotei intestinale va sta la baza elaborării noilor strategii în prevenirea și tratarea CRC.

Referințe:

1. TLASKALOVA-HOGENOVA H., STĚPANKOVA R., KOZAKOVA H. ET AL. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. In: *Cell. Mol. Immunol.* 2011; 8: 110-120.
2. SUNG, HYUNA; FERLAY, JACQUES; SIEGEL, REBECCA L. ET AL. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. In: *A Cancer Journal for Clinicians.* 71 (3), 2021, p. 209-249.
3. M. MALVEZZI1, C. SANTUCCI1, P. BOFFETTA, ET AL. European cancer mortality predictions for the year 2023 with focus on lung cancer. In: *Annals of oncology*. Volume 34 - Issue 4 – 2023, p. 410-419.
4. CHENG Y, LING Z, LI L. The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. In: *Front Immunol.* 2020 Nov 30;11:615056. doi: 10.3389/fimmu.2020.615056.
5. NADINE ABU-GHAZALEH, WENG JOE CHUA, VINOD GOPALAN. Intestinal microbiota and its association with colon cancer and red/processed

meat consumption. In: *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. Vol.36, iss.1. 2021, p. 75-88.

6. ARTEMEV A, NAIK S, POUGNO A, ET AL. The Association of Microbiome Dysbiosis With Colorectal Cancer. In: *Cureus*. 2022 Feb 12;14(2):e22156.
7. ЛАГУТИНА С.Н., ЗУЙКОВА А.А., ДОБРЫНИНА И.С. И ДР. Изменение кишечной микробиоты как предиктор развития колоректального рака у лиц пожилого возраста: клинический случай. В: *Клиническая практика.* 2022;13(3):109-113.
8. BRUNO PÉRICHON, JULIAN LICHTL-HÄFELE, EMMA BERGSTEN ET AL. Detection of Streptococcus gallolyticus and Four Other CRC-Associated Bacteria in Patient Stools Reveals a Potential “Driver” Role for Enterotoxigenic Bacteroides fragilis. In: *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2022, 12, 794391
9. MARCOS-FERNÁNDEZ RAQUEL, BLANCO-MÍGUEZ AITOR, GUADAMURO LUCÍA ET AL. Explorando la presencia de la isla genómica PKS mediante anticuerpos específicos dirigidos a la maquinaria productora de colibactina. In: *XI Workshop de la Sociedad Española de Microbiota, Probióticos y Prebióticos*. 2020.
10. BULTMAN S.J. Interplay between diet, gut microbiota, epigenetic events, and colorectal cancer. In: *Molecular nutrition and food research.* 2017; vol. 61(1): 1500902.
11. ARTHUR JC. Microbiota and colorectal cancer: colibactin makes its mark. In: *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2020, 17 (6): 317-318.
12. DAI Z, ZHANG J, WU Q, ET.AL. The role of microbiota in the development of colorectal cancer. In: *Int J Cancer*. 2019 Oct 15;145(8):2032-2041.
13. GANGIREDDY, VENU GOPALA REDDY; TALLA, SWATHI. Gender Disparities in the Incidence of Colorectal Cancer in the Era of Screening Colonoscopy. *American Journal of Gastroenterology*. 2018, 113: 99-101.
14. MAHA-HAMADIEN ABDULLA, DISHA AGARWAL, JAIKEE KUMAR SINGH ET AL. Association of the microbiome with colorectal cancer development (Review). In: *International Journal of Oncology*. Volume 58 Issue 5. 2021.
15. REBERSEK, M. Gut microbiome and its role in colorectal cancer. In: *BMC Cancer.* 21, 2021, p.1325.
16. KIM J, LEE HK. Potential Role of the Gut Microbiome In Colorectal Cancer Progression. In: *Front Immunol.* 2022 Jan 7;12:807648.
17. ZELLER G., TAP J., VOIGT A.Y. ET AL. Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. In: *Mol Syst Biol.* 2014; 10: 766.
18. TARASHI S, SIADAT SD, AHMADI BADI S, ET AL. Gut Bacteria and their Metabolites: Which One Is the Defendant for Colorectal Cancer? In: *Microorganisms*. 2019 Nov 13;7(11):561.