

ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРУЕМОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

О.Н. Ильинская, И.Г. Гатауллин, Д.Р. Сафиуллина, К.Р.к. Мамедзаде,
К.С. Клетенков, А.Р. Гарипов, П.В. Мальцев

ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет, кафедра микробиологии
ГОУ ДПО Казанская Государственная Медицинская Академия, г. Казань

Ильинская Ольга Николаевна,
зав. кафедрой микробиологии Казанского (Приволжского)
федерального университета, д-р биол. наук, профессор,
420008, Россия, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18,
тел. 8 (843) 231-52-53,
e-mail: Olga.Ilinskaya@ksu.ru.

Изучение роли кишечной микрофлоры при онкопатологиях является важным в свете их возможной этиологической значимости для возникновения и развития опухоли. Кишечная микробиота представляется потенциальной мишенью воздействия в процессе терапии колоректальной карциномы. В статье представлены результаты сравнительного анализа ассоциированных с эпителием бактериальных сообществ на различных стадиях онкотрансформации колоректального эпителия. Особое внимание уделено различиям в гемолитической, рибонуклеазной и колициногенной активности бактерий, выделенных в норме и при онкопатологии. Исследование выполнено с применением методов классической микробиологии.

Ключевые слова: колоректальная карцинома, бактериальная микрофлора, антагонизм, гемолиз, рибонуклеазная активность.

CHARACTERISTICS OF CULTIVABLE INTESTINAL MICROFLORA IN COLORECTAL CARCINOGENESIS

O.N. Ilinskaya, I.G. Gataullin, D.R. Safiullina, K.R.k. Mamedzade,
K.S. Kletenkov, A.R. Garipov, P.V. Maltsev

Kazan Federal University, Microbiology Department
Kazan State Medical Academy, Kazan

A role for the intestinal microbiota is routinely cited as a potential aetiological factor in colorectal cancer initiation and progression. In this regard, the intestinal microbiota is considered as a potential drug target in the treatment of colorectal carcinoma. The article represents results of comparative analysis of epithelium-associated bacterial communities at the different stages of oncotransformation of colorectal epithelium. Special attention is focused on the differences in hemolytic, ribonucleolytic and colicinogenic activity of bacteria isolated from normal and oncotransformed tissues. The study was performed using the methods of classical microbiology.

The key words: colorectal carcinoma, bacterial microflora, antagonism, hemolysis, ribonucleolytic activity.

Введение

По оценкам различных исследователей, около 15% случаев возникновения злокачественных новообразований по всему миру могут быть отнесены к возникшим в результате инфекционного процесса. Важнейшие механизмы, с помощью которых бактериальные агенты могут индуцировать канцерогенез, включают в себя хроническую инфекцию,

подавление иммунного ответа либо механизмы его избегания [7]. В ряде исследований установлено, что глубокие нарушения в составе кишечной микрофлоры отмечаются на ранних стадиях онкотрансформации эпителия кишечника, в частности, у больных с полипозами толстой кишки [3], и при хронических воспалительных процессах в кишечнике, предшествующих возникновению рака [10].

Наиболее вероятным гипотетическим механизмом промоции колоректальной карциномы представляется бактериальная активация сигнальных путей, регулирующих экспрессию онкогенов [9]. С другой стороны, продемонстрирована значимость некоторых бактерий (*Streptococcus pyogenes*, *Serratia marcescens*) для элиминации кишечных новообразований [11]. Таким образом, изучение роли микрофлоры при онкопатологиях является важным для понимания возможного механизма промоции и прогрессии опухоли и может служить основой для разработки оригинальных методов диагностики и терапии раковых заболеваний. Мы предположили, что развитие колоректальной карциномы связано с изменением нормального состава микробиоценоза эпителия кишечника. В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилась характеристика культивируемых факультативно аэробных бактерий из биоптатов эпителия прямой кишки, полученных в ходе операционного вмешательства от онкологических больных и условно здоровых пациентов.

Материалы и методы

Клиническим материалом для исследований служили биоптаты слизистой прямой кишки 20 пациентов, подвергшихся оперативному лечению по поводу колоректального рака. Из них у 6 был подтвержден диагноз – рак прямой кишки, у 14 пациентов злокачественных новообразований в кишечнике гистологически выявлено не было. Протокол отбора образцов клинического материала рассмотрен и одобрен Этическим Комитетом ГОУ ДПО КГМА Росздрава на заседании от «7» мая 2009г.

Биоптаты слизистой отбирались стерильно в ходе оперативного вмешательства, помещались в 0.9% раствор NaCl и в течение 2 часов доставлялись в лабораторию. В лабораторных условиях проводилось суспензирование секционного материала и его посев на накопительные и селективные среды с последующей физиолого-биохимической дифференциацией выделенных бактерий.

Идентификацию и физиолого-биохимическую характеристику выделенных бактерий проводили стандартными методами в зависимости от морфотипа и грампринадлежности с использованием дифференциальных комбинированных сред и ряда биохимических тестов [2].

Гемолитическую активность определяли по способности выделенных бактерий проводить α -гемолиз при культивировании в течение 48ч. при 37°C на 20% кровяном агаре. Для определения РНКазной активности применяли синтетическую бесфосфорную среду [6]. Для косвенного определения способности выделенных бактерий секретировать колицины рибонуклеазной природы проводили тест на антагонистическую активность выделенных бактерий по отношению к неколициногенной *E.coli* K12 [5].

Статистический анализ проводили с использованием стандартных математических методов в программе MS Excel. Результат в отдельной группе данных считали достоверным при отклонении внутри группы $\sigma < 15\%$.

Результаты и обсуждение

В ходе анализа состава микрофлоры биоптатов эпителия прямой кишки онкологических больных и условно здоровых пациентов были выделены доминирующие группы бактерий, характерные для области карциномы, прилежащей к ней зоны и неповрежденного эпителия. Установлено, что малигнизированный эпителий был в основном обсеменен грам-отрицательными палочками (76,2%), в то время как для неповрежденного эпителия характерно преобладание грам-положительных палочек (73,3%) и кокков (20,0%) (таблица 1). Закономерность увеличения численности последних по сравнению с неповрежденным эпителием наблюдалась и в области, прилежащей к зоне малигнизации (таблица 1). Грам-положительные кокки обнаруживались только в микробиоценозах неповрежденного эпителия.

Таблица 1

Распределение численности основных групп бактерий в составе факультативно-анаэробных сообществ колоректального эпителия, %*

Тип эпителия	Группы бактерий		
	кокки, грам-положительные	палочки, грам-положительные	палочки, грам-отрицательные
Малигнизированный	0	23,8	76,2
Прилегающий к опухоли	0	29,4	70,6
Условно здоровый	20,0	73,3	6,7

*за 100% принято число изолятов бактерий, выделенных из всех биоптатов определенного типа эпителия

Определение физиолого-биохимических свойств выделенных бактерий позволило отнести представителей доминантных групп к семействам Enterobacteriaceae (грам-отрицательные неспорообразующие палочки, ферментирующие глюкозу, лактозу, сахарозу, каталазопозитивны, восстанавливают нитраты, в основном подвижны), Lactobacillaceae (грам-положительные неспорообразующие неподвижные палочки, не обладающие каталазной и нитратредуктазной активностью, метаболизируют углеводы с образованием кислоты) и Staphylococcaceae (грам-положительные неподвижные кокки, утилизируют глюкозу и лактозу с образованием кислоты, каталазопозитивны, собраны в короткие цепочки). Таким образом, здоровый эпителий в качестве доминантной группы колонизирующих бактерий несет представителей семейства Lactobacillaceae, а трансформированный и прилегающий к нему эпителий – представителей семейства Enterobacteriaceae.

Выявление основных физиолого-биохимических свойств бактерий эпителия прямой кишки внутри каждой доминантной группы показало, что встречаемость некоторых свойств у бактерий одной и той же группы различается в зависимости от области, из которой они выделены. При этом свой-

Таблица 2

Распределение изолятов с определенными физиолого-биохимическими свойствами в основных группах бактерий факультативно-анаэробных сообществ колоректального эпителия (%)¹

Группы бактерий	Lactobacillaceae			Enterobacteriaceae			Staphylococcaceae ²
Тип эпителия ³	З	П	М	З	П	М	З
Гемолиз	0	0	0	0	17	31	67
РНКаза	91	80	60	100	8	81	0
Антагонизм	10	43	23	0	33	25	0
Каталаза	0	0	0	100	92	100	
Нитратредуктаза		40	20	100	100	100	
Тип расщепления глюкозы ⁴	100 (f)	100 (f)	80 (f) / 20 (o,f)	100 (f)	100 (f)	100 (f)	100 (o,f)
Подвижность	0	0	0	100	83	85	0

¹ - за 100% принято число изолятов бактерий, выделенных из всех биоптатов определенного типа эпителия

² - группа выявлена только в здоровом эпителии

³ - «З» - здоровый, «П» - прилегающий к опухоли, «М» - малигнизированный

⁴ - «f» - ферментация, «o» - окисление

Таблица 3

Распределение изолятов с различными сочетаниями признаков гемолитической и рибонуклеолитической активности в составе факультативно-анаэробных сообществ кишечной слизи¹

Активность ²		Эпителий						
РНК-аза	Гемолиз	здоровый			прилегающий к опухоли		малигнизированный	
		staphylococcaceae	lactobacillaceae	enterobacteriaceae	lactobacillaceae	enterobacteriaceae	lactobacillaceae	enterobacteriaceae
+	+	0	0	0	0	8	0	25
-	-	33	9	0	20	84	40	13
+	-	0	91	100	80	0	60	56
-	+	67	0	0	0	8	0	6

¹ - за 100% принято число изолятов бактерий, выделенных из всех биоптатов определенного типа эпителия

² - «+» - наличие активности, «-» - отсутствие активности

тва, характеризующие принадлежность бактерий к определенному семейству, не изменяются в зависимости от области выделения, как, например, подвижность, тип расщепления глюкозы, каталазная и нитратредуктазная активности (таблица 2).

Такие критические факторы конкурентной борьбы бактерий за колонизацию эпителия, как гемолитическая, рибонуклеолитическая и антагонистическая активности, варьируют внутри группы и связаны со степенью онкологического поражения колонизированного эпителия. Для непораженного эпителия характерно присутствие бактерий семейств Lactobacillaceae и Enterobacteriaceae, не обладающих антагонистической и гемолитической активностями, но способных продуцировать секретлируемые рибонуклеазы. Среди представителей семейства Staphylococcaceae, высеянных только со здорового эпителия, более половины – гемолитики, не проявляющие антагонистическую активность по отношению к Escherichia coli. Доля бактерий с антагонистическими свойствами, и гемолитиков семейства Enterobacteriaceae на малигнизированном эпителии значительно выше, чем на неповрежденном. Известно, что повреждение эпителия

ведет к повышению доли гемолитических бактерий: так, при полипозах толстой кишки гемолитические эшерихии обнаруживаются в 44% случаев [3]. Наибольшая частота встречаемости бактерий с антагонистическими свойствами наблюдается на эпителии, прилежащем к опухоли, то есть в зоне активной конкурентной борьбы микроорганизмов (таблица 2). Полученные данные выявляют тенденцию к усилению антагонистических свойств, а также снижению способности к синтезу секретлируемых рибонуклеаз бактериями, колонизирующими малигнизированный эпителий. Последнее свойство особенно важно в свете последних данных, рассматривающих рибонуклеазы как потенциальные терапевтические препараты, избирательно подавляющие рост опухолевых клеток [1]. Анализ возможных вариантов сочетания гемолитических и рибонуклеолитических свойств выделенных бактерий показал, что наличие обеих активностей не характерно для микрофлоры кишечника (таблица 3). В то же время наши данные не дают оснований считать наличие гемолитической активности бактерий характерным только для поврежденной слизистой.

Отметим, что численность негемолитических бактерий, продуцирующих РНКазы, на малигнизированной слизистой не превышает 60%, тогда как на здоровой эта цифра достигает 100% (таблица 3). Этот факт согласуется с результатами исследований по выявлению колицина ЕЗ, обладающего РНКазной активностью, у *E. coli*, выделенной из толстого кишечника: из 77-и обследованных пациентов с колоректальной карциномой синтезирующие колицин бактерии *E. coli* обнаружены у 32-х человек (41,6%), в то время как из 160-и здоровых обследованных такие бактерии обнаружены у 102 человек (63,8%) [4]. Колицин ЕЗ оказывает цитотоксическое действие, ингибируя синтез белка путем расщепления 16S РНК малой рибосомальной субъединицы, являясь высокоспецифичной рРНКазой и потенциальным противораковым агентом [8]. Вероятно, другие бактериальные РНКазы также могут препятствовать развитию колоректальной карциномы.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют сделать вывод о позитивном вкладе лактобацилл и бактерий-рибонуклеолитиков в сохранение нормального состояния эпителия кишечника.

Заключение

Особенности физиологии и распределения факультативно анаэробной и аэробной микрофлоры в биоптатах слизистой прямой кишки от онкологических больных и условно здоровых пациентов свидетельствуют о том, что при развитии колоректальной карциномы наблюдается смена микробиоценозов, ассоциированных с кишечной слизистой. При этом возрастает доля представителей Enterobacteriaceae, обладающих гемолитической, экзорибонуклеазной активностью, и снижается доля лактобацилл. В этой связи применение антибиотикотерапии и комбинированных пробиотических препаратов лактобацилл и бактерий, проявляющих высокую рибонуклеазную активность, для коррекции состава пристеночной кишечной микрофлоры у больных с предопухолевой патологией толстой кишки представляется перспективным способом предотвращения колоректального рака.

Список литературы

1. Ильинская О.Н., Макаров А.А. Почему рибонуклеазы вызывают гибель раковых клеток // Молекулярная биология. – 2005. – №1. – С. 3–13.
2. Поздеев О.К., Федоров Р.В. Энтеробактерии: руководство для врачей. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 720 с.
3. Чеснокова М.Г. Дисбактериоз у больных полипозом толстой кишки // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2001. – №2. – С. 50–51.
4. Bures J. Colicinogeny in colorectal cancer / J.Bures, V.Horak, B. Fixa et al. // Neoplasia. – 1986. – Vol. 33. – P. 233–237.
5. Cursino, L. Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae / L. Cursino, J. Smarda, E. Chartone-Souza et al. // Brazilian Journal of Microbiology. – 2002. – Vol. 33. – P. 185–195.
6. Jeffries, C.D. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids / C.D. Jeffries, D.F. Holtman, D.G. Guse // Journ of Bacteriol. – 1957. – Vol. 73. – P. 590–591.
7. Kuper H. Infections as a major preventable cause of human cancer. / H.Kuper, H.O. Adami, D. Trichopoulos. // J Intern Med. – 2000. – Vol. 248. – P. 171–183.
8. Lancaster L.E. Colicins and their potential in cancer treatment / L.E.Lancaster, W.Wintermeyer, M.V. Rodnina // Blood Cells Mol. Dis. – 2007. – Vol. 38. – P. 15–18.
9. Lee S.H. ERK activation drives intestinal tumorigenesis in Apcmin/+ mice / H. L. Sung, L. Hu, J. Gonzalez-Navajas et al. // Nat Medicine. – 2010. – Vol. 16. – P. 665–670.
10. Mylonaki M. Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease / M. Mylonaki, N.B. Rayment, D.S. Rampton et al. // Inflamm Bowel Dis. – 2005. – Vol. 11. – №5. – P. 481–487.
11. Mager D.L. Bacteria and cancer: cause, coincidence or cure? A review / D.L. Mager // Journal of Translational Medicine. – 2006. – Vol. 4. – P. 14–32.