

Изменение микробиоты кишечника у крыс-самок Wistar при индукции экспериментального рака молочной железы

Черкас В.¹, Кабаков А.^{1*}, Повещенко А.¹, Казаков О.¹, Лемяк А.², Бодрова Н.³

¹ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

² ООО НПФ «Исследовательский центр», р.п. Кольцово, Новосибирская область, Новосибирск, Россия

³ ФГБОУ ВО Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

* valeriya_korol@mail.ru

Ключевые слова: рак молочной железы (РМЖ); кишечная микробиота; индукция; N-метил-N-нитрозомочевина (МНМ); дисбиоз

Мотивация и цель: Учитывая современные знания о роли микробиоты в развитии канцерогенеза, актуальным является исследование микробиоты при РМЖ, так как рак молочной железы является одним из самых распространенных раков во всем мире [1]. Микробиоту кишечника можно рассматривать как потенциальный диагностический онкобиомаркер с одной стороны и патогенетический фактор, на который будет направлена терапия и профилактика РМЖ, с другой стороны. Целью исследования стал анализ изменений количественного и качественного состава кишечной микробиоты у крыс линии Wistar при химической индукции рака молочной железы.

Методы и алгоритмы: Изучение параметров микробной колонизации толстой кишки проводили у самок крыс линии Wistar ($n = 40$) в возрасте 3 месяцев, массой 210–250 г. Индуцирование РМЖ выполнялось 5-кратным подкожным введением N-метил-N-нитрозомочевины (Sigma) с интервалом в 7 дней в область 2-й правой молочной железы. Животные, участвующие в эксперименте, были разделены на 2 группы: 1-я: интактные животные ($n = 20$); 2-я: группа крыс, которым вводили МНМ для индукции РМЖ ($n = 20$). У интактных крыс ($n = 20$) забор кала для исследования микрофлоры толстого кишечника выполняли в 1-й, 14-й и 35-й дни параллельно с группой индукции РМЖ. У крыс 2-й группы ($n = 20$) забор материала для бактериологического исследования проводили в 1-й день (до инъекции N-метил-N-нитрозомочевины), на 14-й и 35-й дни индукции РМЖ. Материалом для бактериологического исследования служили фекалии исследуемых животных. Пробу для исследования брали из последней порции фекалий. Показатели для оценки особенностей микробиоты кишечника для испытаний были выбраны согласно рекомендациям Отраслевого стандарта 91500.11.0004-2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» [2]. Для культивирования бактерий использовали различные питательные среды в соответствии с инструкциями производителя. Результаты принимались в расчет по числу выросших колоний с определением культуральных, морфологических (микроскопия) и тинкториальных свойств (окраска по Граму) после истечения сроков инкубации. Количество выделенных микроорганизмов рассчитывалось согласно формуле: $KOE/г = K \times 10 \times n$, где K – количество выросших колоний; n – разведение суспензии; 10 – коэффициент пересчета на 1 см³ суспензии при посеве 0.1 см³ (0.1 см³ составляет 1/10 см³). Полученный результат переводился в десятичный

логарифм числа колониеобразующих единиц в 1 г исследуемого материала ($\log_{10}$ КОЕ/г). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ «Statistica 10.0». Достоверность различия рассчитывали по U-критерию Манна–Уитни и принимали при значениях $p < 0,05$.

Результаты: В фекалиях, полученных от интактных крыс, не наблюдали изменений среди типичных представителей микробиоты желудочно-кишечного тракта на 1-й, 14-й и 35-й дни исследований. Средняя концентрация *Escherichia coli* (типичных) составила 25.8×10^5 КОЕ/г ($6.4 \pm 0.2 \log_{10}$ КОЕ/г), при этом уровень *Escherichia coli* (лактозонегативных) был $< 10^5$ КОЕ/г. Уровень лактобифидобактерий, клостридий и дрожжеподобных грибов рода *Candida* находился в допустимых пределах: от $< 10^4$ КОЕ/г для грибов рода *Candida* до 10^9 КОЕ/г для бифидобактерий. Стоит отметить, что *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus saprophyticus* не высевались. Микрофлора толстого отдела кишечника во 2-й группе крыс в 1-й день (до инъекции N-метил-N-нитрозомочевины) достоверно не отличалась от показателей интактных животных. К 14-ому дню индукции РМЖ в полученных образцах кала отмечено увеличение концентрации типичных *Escherichia coli*, которое составило 426.4×10^5 КОЕ/г ($7.6 \pm 0.8 \log_{10}$ КОЕ/г), что в 16.5 раза больше, чем в группе интактных крыс. На 35-й день индукции опухоли выявлено достоверное появление патогенной микрофлоры, в частности 60 % случаев *Staphylococcus aureus* в средней концентрации, составившей 9.4×10^5 КОЕ/г ($6.0 \pm 0.2 \log_{10}$ КОЕ/г). Было обнаружено наличие *Staphylococcus saprophyticus* в 100 % случаев на уровне 29×10^5 КОЕ/г ($6.5 \pm 0.2 \log_{10}$ КОЕ/г). Отмечено сохранение типичной *Escherichia coli* на высоком уровне 125.6×10^5 КОЕ/г ($7.1 \pm 0.3 \log_{10}$ КОЕ/г) и возрастание лактозонегативной *Escherichia coli* до значений 19.3×10^5 КОЕ/г ($6.2 \pm 0.6 \log_{10}$ КОЕ/г), что в 1.5 раза выше по сравнению с показателями в группе интактных крыс и у крыс на 14-й день индукции РМЖ. У нескольких крыс на 35-й день индукции РМЖ обнаружено наличие в фекалиях условно-патогенной энтеробактерии *Proteus vulgaris* в значимой концентрации 10^6 КОЕ/г.

Выводы: Таким образом, установлено, что выделенные бактерии принадлежали к 3 типам, 4 классам, 5 порядкам, 6 семействам, 6 родам домена бактерий. Также было выделено 2 рода грибов, относящихся к порядку *Saccharomycetales*. Выделенные у крыс первой и второй групп бактерии в большинстве своем принадлежали к типам *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Proteobacteria*, являющимися типичными представителями микробиоты желудочно-кишечного тракта крыс, близкой по своему составу к микробиоте кишечника человека [3]. При этом количественный и качественный состав кишечной микробиоты у крыс при индуцировании РМЖ химическим канцерогеном (МНМ) изменялся достоверно с возрастанием концентрации патогенных микроорганизмов к 35-му дню индукции РМЖ, что свидетельствует о формирующемся дисбиозе кишечной микробиоты, который по ряду исследований является предрасполагающим фактором в возникновении хронического воспаления – основополагающего звена, способствующего развитию опухолей в различных органах, включая молочную железу [4].

Changes in the intestinal microbiota in female Wistar rats during the induction of experimental mammary cancer

Cherkas V.^{1*}, Kabakov A.¹, Poveshchenko A.¹, Kazakov O.¹, Lelyak A.², Bodrova N.³

¹ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of SB RAS, Novosibirsk, Russia

² NPF “Research Center”, Novosibirsk region, Koltsovo, Russia

³ Novosibirsk State Agrarian University (NSAU), Novosibirsk, Russia

* valeriya_korol@mail.ru

Key words: breast cancer (BC); intestinal microbiota; induction; N-methyl-N-nitrosourea (MNM); dysbiosis

Motivation and Aim: Considering modern knowledge about the role of microbiota in the development of carcinogenesis, the study of microbiota in breast cancer is relevant, since breast cancer is one of the most common cancers worldwide [1]. Intestinal microbiota can be considered as a potential diagnostic oncobiomarker, on the one hand, and a pathogenetic factor, which will be targeted in the treatment and prevention of breast cancer, on the other hand. The aim of the study was to analyze changes in the quantitative and qualitative composition of the intestinal microbiota in Wistar rats during chemical induction of breast cancer.

Methods and Algorithms: The study of the parameters of microbial colonization of the colon was carried out in female Wistar rats ($n = 40$) aged 3 months, weighing 210–250 g. Induction of breast cancer was carried out by 5-fold subcutaneous injection of N-methyl-N-nitrosourea (Sigma) with an interval of 7 days in the area of the 2nd right breast. The animals participating in the experiment were divided into 2 groups: 1st: intact animals ($n = 20$); 2nd: group of rats that were administered MNM to induce breast cancer ($n = 20$). In intact rats ($n = 20$), feces were collected to study the microflora of the large intestine on 1st, 14th and 35th days in parallel with the breast cancer induction group. In rats of the 2nd group ($n = 20$), material was collected for bacteriological examination on the 1st day (before the injection of N-methyl-N-nitrosourea), on the 14th and 35th days of breast cancer induction. The material for bacteriological research was the feces of the studied animals. The sample for the study was taken from the last portion of feces. Indicators for assessing the characteristics of the intestinal microbiota for testing were selected according to the recommendations of Industry Standard 91500.11.0004-2003 “Protocol for the management of patients. Intestinal dysbiosis” [2]. Various culture media were used to cultivate bacteria according to the manufacturer's instructions. The results were taken into account by the number of grown colonies with the determination of cultural, morphological (microscopy) and tinctorial properties (Gram stain) after the incubation period had expired. The number of isolated microorganisms was calculated according to the formula: $CFU/g = K \times 10 \times n$, where K is the number of grown colonies; n – suspension dilution; 10 is the conversion factor per 1 cm³ of suspension when sowing 0.1 cm³ (0.1 cm³ is 1/10 cm³). The obtained result was converted into the decimal logarithm of the number of colony-forming units in 1 g of the test material (log₁₀ CFU/g). Statistical data processing was carried out using the software package “Statistica 10.0”. The significance of the difference was calculated using the Mann–Whitney U test and accepted at p values < 0.05.

Results: In feces obtained from intact rats, no changes were observed among typical representatives of the gastrointestinal tract microbiota on 1st, 14th and 35th days of the

study. The average concentration of *Escherichia coli* (typical) was 25.8×10^5 CFU/g ($6.4 \pm 0.2 \log_{10}$ CFU/g), while the level of *Escherichia coli* (lactose-negative) was $< 10^5$ CFU/g. The level of lactobifidobacteria, clostridia and yeast-like fungi of the genus *Candida* was within acceptable limits: from $< 10^4$ CFU/g for fungi of the genus *Candida* to 10^9 CFU/g for bifidobacteria. It is worth noting that *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus saprophyticus* were not cultured. The microflora of the large intestine in the 2nd group of rats on the 1st day (before the injection of N-methyl-N-nitrosourea) did not differ significantly from the indicators of intact animals. By the 14th day of breast cancer induction, an increase in the concentration of typical *Escherichia coli* was noted in the obtained stool samples, which amounted to 426.4×10^5 CFU/g ($7.6 \pm 0.8 \log_{10}$ CFU/g), which is 16.5 times more than in group of intact rats. On the 35th day of tumor induction, a significant appearance of pathogenic microflora was revealed, in particular 60 % of cases of *Staphylococcus aureus* in an average concentration of 9.4×10^5 CFU/g ($6.0 \pm 0.2 \log_{10}$ CFU/g). The presence of *Staphylococcus saprophyticus* was detected in 100 % of cases at a level of 29×10^5 CFU/g ($6.5 \pm 0.2 \log_{10}$ CFU/g). It was noted that typical *Escherichia coli* remained at a high level of 125.6×10^5 CFU/g ($7.1 \pm 0.3 \log_{10}$ CFU/g) and an increase in lactose-negative *Escherichia coli* to values of 19.3×10^5 CFU/g ($6.2 \pm 0.6 \log_{10}$ CFU/g), which is 1.5 times higher compared to the indicators in the group of intact rats and in rats on the 14th day of breast cancer induction. In several rats on the 35th day of breast cancer induction, the presence in the feces of the opportunistic enterobacterium *Proteus vulgaris* was detected at a significant concentration of 10^6 CFU/g.

Conclusion: Thus, it was established that the isolated bacteria belonged to 3 types, 4 classes, 5 orders, 6 families, 6 genera of the bacterial domain. Also, 2 genera of fungi belonging to the order *Saccharomycetales* were isolated. The bacteria isolated from rats of the first and second groups mostly belonged to the types *Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*, which are typical representatives of the microbiota of the gastrointestinal tract of rats, similar in composition to the human intestinal microbiota [3]. At the same time, the quantitative and qualitative composition of the intestinal microbiota in rats when breast cancer was induced by a chemical carcinogen (MNM) changed significantly with an increase in the concentration of pathogenic microorganisms by the 35th day of breast cancer induction, which indicates the emerging dysbiosis of the intestinal microbiota, which, according to a number of studies, is a predisposing factor in the occurrence chronic inflammation is a fundamental link that promotes the development of tumors in various organs, including the mammary gland [4].

Список литературы/References

- 1 Sung H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi 10.3322/caac.21660
- 2 ОСТ 91500.11.0004-2003. Отраслевой стандарт. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200119089> [OST 91500.11.0004-2003. Industry standard. Patient management protocol. Intestinal dysbiosis Available at: <https://docs.cntd.ru/document/1200119089>]
- 3 Flemer B. et al. Fecal microbiota variation across the lifespan of the healthy laboratory rat. *Gut Microbes.* 2017;8(5):428-439. doi 10.1080/19490976.2017.1334033
- 4 Buchta Rosean C. et al. Preexisting commensal dysbiosis is a host-intrinsic regulator of tissue inflammation and tumor cell dissemination in hormone receptor-positive breast cancer. *Cancer Res.* 2019;79(14):3662-3675. doi 10.1158/0008-5472.CAN-18-3464