

**Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda**  
**Polskiej Akademii Nauk**  
Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych  
Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej

Aleksandra Czajkowska

**Zmiany składu mikrobiomu jelitowego,  
poziomu markerów endotoksyny i metabolitów bakteryjnych  
w przebiegu nowotworów u myszy**

Changes in the composition of intestinal microbiota,  
level of endotoxin markers and bacterial metabolites in mice cancer models

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem  
dr hab. Bogumiły Szponar, prof. IITD PAN

Wrocław 2023



*Niniejszą pracę pragnę zadedykować mojej wspaniałej **Mamie** oraz **Kubie**,  
dzięki którym miałam możliwość kształcić się i zdobywać cenną wiedzę,  
którzy stale mnie mobilizowali i wspierali przez okres trwania studiów.*

*Za inspirację, wyrozumiałość oraz pomoc przy realizacji tej pracy pragnę złożyć  
serdecznie podziękowania Pani Promotor dr hab. Bogumile Szponar*



*Składam podziękowania prof. dr hab. Joannie Wietrzyk  
i Zespołowi Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej IITD PAN  
za pomoc w prowadzeniu doświadczeń z wykorzystaniem modeli zwierzęcych*

Badania zostały częściowo sfinansowane w ramach  
dotacji projakościowej KNOW na lata 2014-2018 przyznanej Instytutowi Immunologii i  
Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda PAN, wchodzącego w skład  
Konsorcjum Wrocławskie Centrum Biotechnologii,  
Obszar 1: Aktywność naukowo - dydaktyczna - IITD PAN

tytuł zadania: „Badanie zaburzeń homeostazy mikrobiomu jelitowego na modelu mysim”



Krajowy Naukowy  
Ośrodek Wiedzący

Wrocławskie Centrum Biotechnologii 2014-2018



<b>Streszczenie .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Wprowadzenie.....</b>	<b>13</b>
<b>2. Wstęp .....</b>	<b>15</b>
2.1. Rola mikrobiomu w utrzymaniu homeostazy organizmu ludzkiego.....	15
2.1.1. Mikrobiom człowieka .....	15
2.1.2. Mikrobiom jelitowy a dieta.....	16
<b>2.2. Metabolity i markery bakteryjne.....</b>	<b>19</b>
2.2.1. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe.....	19
2.2.1.1. Fermentacja węglowodanów przez bakterie jelitowe i wytwarzanie SCFA ...	20
2.2.1.2. Metabolizm SCFA u bakterii konsorcjum jelitowego .....	23
2.2.1.3. Badania mikrobiomu oraz SCFA na modelach zwierzęcych .....	27
2.2.1.4. SCFA w układzie immunologicznym i procesach przeciwzapalnych .....	27
2.2.2. Lipopolisacharyd (endotoksyna, LPS) .....	34
2.2.2.1. Lipopolisacharyd a mikrobiom jelitowy .....	34
2.2.2.2. Budowa lipopolisacharydu .....	35
2.2.2.3. Zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe wykrywanie LPS-u .....	37
2.2.2.4. Immunogenność lipopolisacharydów .....	37
2.2.2.5. Zastosowanie 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych, składników lipidu A, jako markerów chemicznych lipopolisacharydu i bakterii Gram-ujemnych.....	37
<b>2.3. Zaburzenia homeostazy mikrobiomu jelitowego gospodarza i produktów metabolizmu bakterii jelitowych w patomechanizmie wybranych chorób.....</b>	<b>40</b>
2.3.1. Nowotwór prostaty .....	40
2.3.2. Nowotwór jelita grubego.....	41
2.3.2.1. Mikrobiota jelitowa w przebiegu nowotworu jelita grubego.....	41
2.3.2.2. Relacja dieta-nowotwór-mikrobiota.....	42
2.3.2.3. Suplementacja .....	43
2.3.2.4. Rola maślanu w przebiegu nowotworu jelita grubego .....	43
<b>2.4. Metody badania mikrobiomu.....</b>	<b>45</b>
2.4.1. Metody hodowli bakterii.....	45
2.4.2. Metody detekcji i ocenie ilościowej metabolitów niskocząsteczkowych .....	46
2.4.2.1. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) .....	46
2.4.2.2. Techniki wykorzystujące spektrometrię mas.....	47
2.4.3. Metody biologii molekularnej w badaniu mikrobiomu .....	47
2.4.3.1. Sekwencjonowanie typu shotgun i metagenomika (sekwencjonowanie DNA pierwszej generacji) .....	47
2.4.3.2. Sekwencjonowanie Następnej Generacji (NGS) .....	48
<b>3. Cel pracy .....</b>	<b>52</b>
<b>4. Materiały i metody .....</b>	<b>53</b>
4.1. Zwierzęta doświadczalne .....	53
4.2. Linie komórkowe .....	53
4.3. Pasza .....	53

<b>4.4.</b>	<b>Modele doświadczalne</b> .....	<b>54</b>
4.4.1.	<i>Model nowotworu prostaty myszy</i> .....	54
4.4.2.	<i>Model nowotworów jelita grubego myszy MC38</i> .....	55
4.4.2.1.	<i>Model podskórny MC38/EGFP</i> .....	55
4.4.2.2.	<i>Modele podskórny (P) i dojelitowy (DJ) MC38/0</i> .....	56
<b>4.5.</b>	<b>Izolacja i hodowla bakterii z kału myszy</b> .....	<b>57</b>
<b>4.6.</b>	<b>Identyfikacja bakterii z zastosowaniem spektrometrii mas MALDI-TOF MS</b> .....	<b>58</b>
<b>4.7.</b>	<b>Oznaczanie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem UV/Vis (HPLC UV/Vis)</b> .....	<b>59</b>
<b>4.8.</b>	<b>Oznaczanie 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OHFAs), markerów lipopolisacharydu (LPS) z zastosowaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS)</b> .....	<b>61</b>
<b>4.9.</b>	<b>Oznaczanie poziomu receptorów GPR43 oraz GPR109A z zastosowaniem testów immunoenzymatycznych ELISA</b> .....	<b>63</b>
<b>4.10.</b>	<b>Oznaczanie poziomu uzyskanych produktów deacetylowych przez HDAC (test immunoenzymatyczny ELISA)</b> .....	<b>64</b>
<b>4.11.</b>	<b>Oznaczanie poziomu cytokin pro- i przeciwzapalnych, z zastosowaniem testów immunoenzymatycznych ELISA</b> .....	<b>65</b>
<b>4.12.</b>	<b>Sekwencjonowanie NGS</b> .....	<b>66</b>
4.12.1.	<i>Izolacja DNA bakteryjnego</i> .....	66
4.12.2.	<i>Analiza danych sekwencjonowania DNA</i> .....	72
4.12.3.	<i>Analiza statystyczna</i> .....	73
<b>5.</b>	<b>Aparatura</b> .....	<b>74</b>
<b>6.</b>	<b>Wyniki</b> .....	<b>75</b>
6.1.	<i>Model nowotworu prostaty u myszy (TRAMP-C1, TRAMP-C2)</i> .....	75
6.1.1.	<i>Bakterie w mikrobiomie jelitowym myszy z nowotworem prostaty</i> .....	75
6.1.2.	<i>Profil krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFAs) w modelu nowotworu prostaty</i> 76	
6.1.3.	<i>Profil 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OH FAs) w modelu nowotworu prostaty</i> 78	
6.1.4.	<i>Zależności pomiędzy metabolitami bakteryjnymi (SCFAs) a markerami LPSu w modelu nowotworu prostaty</i> .....	84
<b>6.2.</b>	<b>Model nowotworu jelita grubego MC38/EGFP - model podskórny</b> .....	<b>86</b>
6.2.1.	<i>Bakterie mikrobiomu jelitowego myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38-EGFP - sekwencjonowanie NGS</i> .....	86
6.2.2.	<i>Profil markerów lipopolisacharydów</i> .....	95
6.2.3.	<i>Metabolity bakterii jelitowych – krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA) w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP</i> .....	101
6.2.3.1.	<i>Profil SCFA w próbkach kału</i> .....	101



6.2.3.2.	<i>Profil SCFA w surowicy</i> .....	106
6.2.4.	<i>Profil 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OH FAs) w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP</i> .....	109
6.2.4.1.	<i>Profil 3-OH FAs w próbkach kału</i> .....	109
6.2.4.2.	<i>Markery LPSu z podziałem na rzędy w próbkach kału</i> .....	112
6.2.4.3.	<i>Profil 3-OH FAs w próbkach surowicy</i> .....	116
6.2.4.4.	<i>Profil bakteryjny rzędów w próbkach surowicy</i> .....	120
6.2.5.	<i>Zależności pomiędzy metabolitami bakteryjnymi (SCFAs) a markerami LPSu (3-OH FAs) w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP</i> .....	122
6.2.6.	<i>Bakterie w mikrobiomie jelitowym myszy z nowotworem jelita grubego MC38-EGFP - hodowla bezpośrednia i identyfikacja z zastosowaniem MALDI-TOF</i> .....	128
<b>6.3.</b>	<b>Model nowotworu jelita grubego MC38/0 - model podskórny (P) i dojelitowy (DJ)</b>	<b>130</b>
6.3.1.	<i>Wyniki sekwencjonowania NGS w modelu nowotworu jelita grubego</i> .....	130
6.3.2.	<i>Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFAs) w grupach myszy z nowotworem jelita grubego MC38/0</i> .....	139
6.3.3.	<i>Poziom receptorów krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych GPR43 w próbkach tkanek jelita w modelach nowotworu jelita grubego MC38/0</i> .....	145
6.3.4.	<i>Poziom receptorów krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych GPR109A w próbkach tkanek jelita w modelach nowotworu jelita grubego MC38/0</i> .....	147
6.3.5.	<i>Poziom deacetylowanych produktów, markerów aktywności deacetylazy histonów, w tkankach jelita na modelu nowotworu jelita grubego MC38/0</i> .....	149
6.3.6.	<i>Poziom cytokin prozapalnych w surowicy myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38/0</i> .....	152
6.3.7.	<i>Profil 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OH FAs) w próbkach kału w modelach nowotworu jelita grubego MC38/0</i> .....	154
6.3.8.	<i>Profil 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OH FAs) w próbkach kału w modelach nowotworu jelita grubego MC38/0</i> .....	157
6.3.9.	<i>Zależności pomiędzy metabolitami bakteryjnymi (SCFAs), markerami LPSu (3-OH FAs), poziomem receptorów GPR43 i GPR109A oraz cytokinami w modelu nowotworu jelita grubego MC38/0</i> .....	160
<b>7.</b>	<b>Dyskusja</b> .....	<b>169</b>
<b>8.</b>	<b>Wnioski</b> .....	<b>187</b>
<b>9.</b>	<b>Literatura</b> .....	<b>188</b>



## Streszczenie

Monitorowanie zmian zachodzących w składzie i aktywności metabolicznej mikrobiomu jelitowego w czasie rozwoju nowotworu było prowadzone na modelu nowotworu prostaty i na modelach nowotworu jelita grubego MC38 u myszy. Dodatkowo jako czynnik promujący utrzymanie bądź przywrócenie homeostazy mikrobiomu jelitowego wprowadzono paszę z wysoką zawartością skrobi ziemniaczanej bądź  $\alpha$ -celulozę. Mikrobiom był badany za pomocą sekwencjonowania NGS, przez oznaczanie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) i ich receptorów GPR41, GPR109A i HADC oraz pomiar stężenia 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OH FAs), chemicznych markerów lipopolisacharydu (endotoksyny) bakterii Gram-ujemnych.

W przebiegu nowotworu prostaty u myszy na podstawie analizy poziomu metabolitów bakteryjnych oraz markerów LPSu wykazano znaczną zmienność mikrobiomu jelitowego w czasie procesu chorobowego. Stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych oznaczane w kale było istotnie wyższe u osobników z nowotworem w odniesieniu do grupy kontrolnej, a dynamika zmian mikrobiomu była największa w fazie intensywnego wzrostu guzów.

Na modelu nowotworu jelita grubego myszy MC38 stwierdzono zaburzenia homeostazy mikrobiomu jelitowego związane z progresją choroby, wykazano także, że czynnikiem generującym największą zmienność mikrobiomu jelitowego było wprowadzenie diety wysokobłonnikowej ( $\alpha$ -celulozy lub skrobi ziemniaczanej). Zwiększona zawartość błonnika ( $\alpha$ -celulozy) w paszy korelowała z obniżonym stężeniem krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (za wyjątkiem kwasu mlekowego) i markerów LPSu; sugeruje to łagodzenie procesu zapalnego i spowolnienie translokacji LPSu z jelita do krwiobiegu. Obserwowano wzrost poziomu *Bacteroidetes* i *Verrucomicrobia* oraz obniżenie *Actinobacteria* i *Firmicutes*. Obecność  $\alpha$ -celulozy w paszy promowała wzrost *Akkermansia muciniphila* i hamowała *Lactobacillus reuterii*.

Zwiększona zawartość błonnika (skrobi ziemniaczanej) w paszy korelowała ze wzrostem stężenia krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych u myszy zdrowych i myszy z nowotworem MC38, było także związane ze wzrostem poziomu *Bifidobacterium*, *Parvibacter*, przedstawicieli *Coriobacteriaceae* i *Ruminococcaceae*, *Faecalibaculum* oraz rodziny *Clostridiales vadin BB60 group* i rzędu *Rhodospirillales*.

Uzyskane korelacje składu taksonomicznego, stężenia metabolitów bakteryjnych oraz markerów LPS potwierdziły wartość tych oznaczeń jako uzupełniających sekwencjonowanie NGS w poszukiwaniu interakcji zachodzących w mikrobiomie jelitowym podczas rozwoju nowotworu.

## Summary

Monitoring of changes in the composition and metabolic activity of the intestinal microbiome during tumor development was carried out on a prostate cancer model and on the MC38 colorectal cancer model in mice. In addition, feed with a high content of potato starch or  $\alpha$ -cellulose was introduced as a factor promoting the maintenance or restoration of intestinal microbiome homeostasis. The microbiome was studied by NGS sequencing, by assessment of the short-chain fatty acids (SCFA) and their receptors GPR41, GPR109A and HADC, and by measuring the concentration of 3-hydroxy fatty acids (3-OH FAs), chemical markers of lipopolysaccharide (endotoxin) of Gram-negative bacteria.

In the course of prostate cancer in mice, based on the analysis of the level of bacterial metabolites and LPS markers, significant variability of the intestinal microbiome was shown during the disease process. The concentration of short-chain fatty acids determined in the feces was significantly higher in individuals with cancer compared to the control group, and the dynamics of microbiome changes was the highest in the phase of intensive tumor growth.

In the MC38 mouse colorectal cancer model, disturbances in the homeostasis of the intestinal microbiome associated with disease progression were found, it was also shown that the factor generating the greatest variability of the intestinal microbiome was the introduction of a high-fiber diet ( $\alpha$ -cellulose or potato starch). Increased content of fiber ( $\alpha$  cellulose) in feed correlated with reduced concentration of short-chain fatty acids and LPS markers; this suggests moderation of the inflammatory process and slowing down the translocation of LPS from the intestine into the bloodstream. There was an increase in *Bacteroidetes* and *Verrucomicrobia* and a decrease in *Actinobacteria* and *Firmicutes* observed. The presence of  $\alpha$ -cellulose in the feed promoted the growth of *Akkermansia muciniphila* and inhibited *Lactobacillus reuterii*.

The increased content of fiber (potato starch) in the feed correlated with an increase in the concentration of short-chain fatty acids in healthy mice and mice with tumor MC38, it was also associated with an increase in the level of *Bifidobacterium*, *Parvibacter*, representatives of the *Coriobacteriaceae* and *Ruminococcaceae*, *Faecalibaculum* and the family *Clostridiales* vadin BB60 group, and the order of *Rhodospirillales*.

The obtained correlations of the taxonomic composition, the concentration of bacterial metabolites and LPS markers confirmed the value of these features in the microbiome studies as complementary to NGS sequencing in the search for interactions occurring in the gut microbiome during the development of cancer.

## 1. Wprowadzenie

O krytycznym znaczeniu mikrobioty jelitowej (zespół mikroorganizmów występujący w danym środowisku ekologicznym) dla utrzymania homeostazy układu odpornościowego u ssaków zaświadcza szereg danych eksperymentalnych oraz obserwacji klinicznych. Znaczącą rolę w zachowaniu równowagi mikrobiomu pełnią krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA), metabolity bakteryjne powstające w wyniku fermentacji w jelicie grubym pochodzące z diety poli-oligo- i disacharydów, oraz lipopolisacharyd (endotoksyna), składnik ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych.

Pionierski dla kompleksowych badań ekosystemu bakterii jelitowych projekt opisujący ludzki mikrobiom - Integrative Human Microbiome Project (HMP) otwarty w 2007 roku przez National Institute of Health wykazał w pierwszej fazie obecność interakcji między organizmem gospodarza i jego mikrobiomem, pogłębiona analiza obejmowała odpowiedź immunologiczną, metaboliczną oraz dynamiczną aktywność molekularną. Projekt dostarczył kilkadziesiąt terabajtów danych multi-omicznych, które stały się fundamentem dalszych badań o krytycznym znaczeniu dla zrozumienia homeostazy układu odpornościowego i kondycji zdrowotnej człowieka.

Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe stanowią rodzaj komunikatorów pomiędzy mikrobiotą a układem odpornościowym gospodarza i odpowiadają za utrzymanie równowagi reakcji przeciw- i prozapalnej: jako ligandy w mechanizmie regulacyjnym opartym na inhibicji enzymu deacylazy histonowej (HDAC) oraz na drodze przekazywania sygnału poprzez zespół receptorów wolnych kwasów tłuszczowych (GPR), w tym GPR43 i GPR109A. Szczególną właściwością krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych jest indukcja komórek T-regulatorowych (Treg), która odbywa się poprzez inhibicję deacylazy histonowej, a największym potencjałem w tym zakresie charakteryzuje się kwas masłowy, odpowiedzialny za proliferację i zwiększenie funkcjonalnych możliwości komórek Treg.

Rola zmian zachodzących w mikrobiomie i jego metabolitach u chorych z nowotworami jelita grubego jest szczególnie ze względu na właściwości proapoptotyczne maślanu. Z drugiej strony, w środowisku bogatym w maślan pojawia się rodzaj oporności na ten związek, a subpopulacja komórek nowotworowych unika apoptozy indukowanej maślanem na rzecz formacji guza. Mechanizmy odpowiadające za takie dwutorowe działanie maślanu w rozwoju nowotworu jelita grubego nie są w pełni wyjaśnione i dlatego intensywnie badane.

W relacji trzech czynników: nowotwór - kwas masłowy - indukcja apoptozy zaobserwowano zmienioną ekspresję HDAC, ale także receptorów GPR43 i GPR109A, co sugeruje, że suplementacja SCFA może stać się narzędziem w walce z nowotworem jelita grubego.

Ocenę zmienności mikrobioty jelitowej prowadzi się metodami wysokoprzepustowego

sekwencjonowania DNA (NGS), których dostępność i poziom zaawansowania znacznie wzrosły w ostatnich latach, ponadto stosuje się klasyczne metody identyfikacji bakterii za pomocą hodowli. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe i chemiczne markery lipopolisacharydu oznaczane są metodami analitycznymi za pomocą wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) i chromatografii gazowo-ciekowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GLC-MS), wzbogacając warsztat metodyczny służący badaniom mikrobioty.

Koncepcja chemicznych markerów mikroorganizmów wykorzystuje oznaczanie unikalnych substancji niewystępujących w innych strukturach biologicznych w przyrodzie i ze względu na ich uniwersalny charakter jest szeroko wykorzystywana w diagnostyce i badaniach środowiskowych. Chemiczne markery lipopolisacharydu (LPS, endotoksyny) bakterii Gram-ujemnych, czyli 3-hydroksylowe kwasy tłuszczowe (3-OHFAs) budują lipid A, konserwatywny fragment LPSu. Markery te korelowały ze stanem klinicznym pacjentów cierpiących na chorobę Leśniowskiego-Crohna, wykazywano także ich wartość w rozpoznaniu fazy aktywnej i remisji wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Profil 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych uzupełnia panel nieinwazyjnych metod diagnozowania przebiegu przewlekłych schorzeń jelitowych poprzez monitorowanie mikrobioty w różnych fazach choroby.

Tezy niniejszej pracy obejmowały wykazanie interakcji kluczowych metabolitów bakterii jelitowych – krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) i lipopolisacharydu - stymulatora procesów zapalnych oraz znaczenia diety wysokobłonnikowej dla tych interakcji w odniesieniu do zmian zachodzących w mikrobiocie jelitowej w przebiegu procesu nowotworowego u myszy.

## 2. Wstęp

### 2.1. Rola mikrobiomu w utrzymaniu homeostazy organizmu ludzkiego

#### 2.1.1. Mikrobiom człowieka

Kompleksowy projekt opisu ludzkiego mikrobiomu - Integrative Human Microbiome Project (HMP) wprowadził nowe podejście do badania homeostazy organizmu i zasiedlających go zespołów drobnoustrojów (Proctor et al. 2019). W pierwszej fazie HMP uzyskano nukleotydowe sekwencje pojedynczych mikroorganizmów, ale przełomem była kompleksowa analiza metagenomowa próbek kału obejmująca opracowanie protokołów izolacji i sekwencjonowania materiału genetycznego, generowania danych mikrobiomowych i ich kompleksowej analizy (Aagaard et al. 2013). Najważniejszym wnioskiem płynącym z pierwszej fazy badań HMP było stwierdzenie słabej korelacji składu taksonomicznego mikrobiomu z fenotypem gospodarza (Huttenhower et al. 2012). Druga część projektu HMP koncentrowała się na poznawaniu interakcji gospodarz-mikrobiom, w uwzględnieniu związków z odpowiedzią immunologiczną, aktywnością metaboliczną oraz ingerencją drobnoustrojów w aktywność molekularną (enzymatyczną) organizmu wyższego. Na fundamencie HMP powstały nowe projekty i publikacje, diametralnie zmieniając pogląd na homeostazę gospodarza i drobnoustrojów, w wielkiej różnorodności zasiedlających jego organizm.

W mikrobiomie jelitowym człowieka dominują dwa typy taksonomiczne: *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, uzupełniane przez mniej liczne *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* i *Cyanobacteria*. W tych grupach występują m. in. rodzaje *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Streptococcus* (Zeng et al. 2019).

Budowa histologiczna jelita ssaków sprzyja harmonijnemu współistnieniu drobnoustrojów i gospodarza: pojedyncza warstwa nabłonka oddziela światło jelita od tkanek właściwych, a gęsta warstwa śluzu chroni nabłonek przed bezpośrednim kontaktem z bakteriami. Bariere śluzową zapewnia produkcja hiperglikozylowanej mucyny (MUC2), która nie tylko tworzy warstwę ochronną, ale także ogranicza immunogenność antygenów jelitowych poprzez dostarczanie sygnałów tolerogennych (poprzez komórki dendrytyczne) (Shan et al. 2013). Połączenia zamykające (tight junctions) są kluczową strukturą jelitową umożliwiającą przepuszczalność transnabłonkową, zaś mikrobiota jelitowa wydzielając różne metabolity (np. pochodne indolu), poprawia barierę nabłonka poprzez wzmacnianie połączeń zamykających (Bansal et al. 2010).

Mikrobiota jelitowa komunikuje się ze swoim gospodarzem za pomocą neuroprzekaźników.

Należy do nich kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA), produkowany przez bakterie z rodziny *Lactobacillus*, a także monoaminy: noradrenalina, dopamina i serotonina, również wydzielane przez bakterie. Mikrobiom jelitowy reguluje dostępność tryptofanu niezbędnego do syntezy 5-hydroksytryptaminy (serotoniny) w układzie krążenia gospodarza (Liu et al. 2020).

Mikrobiota jelitowa posiada znaczący potencjał destabilizacji zdrowia gospodarza. W warunkach homeostazy patobionty – zasadniczo drobnoustroje symbiotyczne - nie wpływają na zdrowie gospodarza, jednak w sytuacji stresu podobnie jak inne mikroorganizmy zmieniają swój metabolizm, co może prowadzić do zaburzenia równowagi mikrobioty, rozwoju zapalenia i innych stanów patologicznych. Do patobiontów zaliczane są m.in. *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Fusobacterium nucleatum* czy enterotoksyczne szczepy *Bacteroidetes fragilis* (Ratajczak et al. 2019).

Istotną cechą wykorzystywaną do wyznaczania wzorców kompozycyjnych zespołów bakterii jelitowych i opracowania reguł nimi rządzących, jest nieodzowność mikrobioty dla prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego na styku z układem pokarmowym. Już wczesne badania wykazały, że u myszy pozbawionych bakterii jelitowych (germ free, GF) występowały ubytki tkanki limfoidalnej oraz defekty układu immunologicznego (Bauer et al. 1963), a liczba limfocytów śród błonkowych  $\alpha\beta$  i  $\gamma\delta$  była znacząco zredukowana w porównaniu do myszy konwencjonalnych. Ponadto u myszy GF nieobecne są komórki Th17, ale ich produkcję indukowała wtórna kolonizacja mikrobiotą jelitową, w szczególności bakteriami SFB (segmented filamentous bacteria) oraz innymi mikroorganizmami komensalnymi (Zheng et al. 2020).

### 2.1.2. Mikrobiom jelitowy a dieta

Kluczowym elementem utrzymującym odpowiednią kondycję bakterii jelitowych jest dobrze zbilansowana dieta, a zmianą zwyczajów żywieniowych można modulować skład oraz zróżnicowanie mikrobioty jelitowej.

U osób stosujących typową dietę typu zachodniego masa bakterii zasiedlających kątnicę i okrężnicę to 250-750 g (przy założeniu  $10^{10}$ - $10^{11}$  cfu/g). Biomasa bakteryjna stanowi 40-55% stałej masy stolca. U humanizowanych myszy gnotobiotycznych zmiana diety z niskotłuszczowej, bogatej w roślinne polisacharydy na dietę bogatotłuszczową i o wysokiej zawartości cukru zmieniała strukturę mikrobiomu nawet w ciągu 24 godzin, ale wprowadzenie nowych składników odżywczych związanych np. z wyborem innego rodzaju chleba, nie powodowało znaczących zmian w składzie taksonomicznym mikrobioty (Turnbaugh et al. 2009).

Wysokie dzienne spożycie tłuszczu (głównie nasyconych) jest skorelowane ze zredukowaną ilością i mniejszym zróżnicowaniem mikrobioty układu pokarmowego zarówno u dorosłych, jak i



dzieci (Wolters et al. 2019). Dominującą pozycję zdobywa typ *Proteobacteria*, w większości bakterie Gram-ujemne, zawierające w ścianie komórkowej lipopolisacharydy, które na drodze translokacji przenikają do krwioobiegu, co wykazano u myszy (Cani et al. 2007) i ludzi (Zmora et al. 2019). Poziom wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3 (PUFA), których spożycie przez osoby zdrowe koreluje ze wzrostem bakterii produkujących krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA), ma działanie przeciwnowotworowe i przeciwzapalne (Watson et al. 2018). W mikrobiocie myszy otrzymujących olej bogaty w nienasycone kwasy tłuszczowe dominują bakterie rodzajów *Bifidobacterium*, *Akkermansia* i *Lactobacillus* (Caesar et al. 2015). Dobór odpowiedniego źródła tłuszczu w diecie należy zatem do kluczowych czynników odpowiadających za utrzymanie homeostazy mikrobioty jelitowej.

Ważnym elementem diety ingerującym znacząco w jakościowy i ilościowy skład mikrobioty jelitowej są białka, ponieważ nawet krótkoterminowa dieta zakładająca znaczne spożycie białka zwierzęcego powoduje wzrost liczby bakterii tolerujących wysoki poziom kwasów żółciowych (np. *Alistripes*, *Bilophila* i *Bacteroides*) oraz spadek w liczności bakterii sacharolitycznych (np. *Roseburia* spp., *Eubacterium rectale* i *Ruminococcus bromii*). Z kolei spożywanie białka pochodzenia roślinnego promuje wzrost bakterii z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* oraz zwiększoną produkcję SCFA (Świątecka et al. 2011).

Węglowodany stanowią podstawowy substrat dla większości bakterii jelitowych. Błonnik zawarty w diecie może znacząco wpływać na mikrobiotę, zwiększając występowanie bakterii rodzajów *Bacteroides* i *Prevotella* (Schnorr et al. 2014). U osób z nadwagą stosujących dietę bogatą w węglowodany złożone obserwuje się znaczący wzrost reprezentacji typu *Firmicutes*, bakterii produkujących maślan, w tym przedstawicieli *Ruminococcus*, *Roseburia* spp. i *Eubacterium rectale* (Walker et al. 2011), w przypadku niskiego ich spożycia występuje znacząca redukcja *Firmicutes* (Duncan et al. 2007). Na poziomie histologicznym zaobserwowano, że u myszy deprywacja błonnika pokarmowego promuje ekspansję bakterii niszczących warstwę śluzu nabłonka jelitowego, które uszkodzają barierę ochronną jelita (Desai et al. 2016).

Na homeostazę mikrobiomu ma wpływ rytm dobowy gospodarza, tj. czas snu i aktywności oraz jedzenia i postu, które są skorelowane ze zmianami w funkcjach i składzie mikrobioty jelitowej. Obserwuje się znaczne wahania *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Proteobacteria* oraz poziomu ich metabolitów i markerów (Zarrinpar et al. 2014). W przedstawicieli rdzennej społeczności Hadza w Tanzanii występuje sezonowa, cykliczna zmienność mikrobiomu, co odzwierciedla aktualną dostępność produktów spożywczych w porze suchej i deszczowej (Proctor et al. 2019).

Podstawową reakcją fermentacji bakteryjnej w jelicie grubym jest hydroliza pochodzących z diety polisacharydów, oligosacharydów i disacharydów do cukrów prostych, które stanowią

substrat dla bakteryjnego aparatu enzymatycznego. Fermentacja węglowodanów w proksymalnej części okrężnicy uwalnia krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA) i wodór (Roberfroid 2007).

Zastosowanie odpowiedniej interwencji żywieniowej może znacząco wesprzeć prewencję i terapię niektórych chorób jelit, w związku z tym opracowano różnorodne strategie dietetyczne, mające na celu poprawę kondycji układu pokarmowego. Aby mikrobiota jelitowa utrzymana była w homeostazie, wymagana jest obecność trzech kategorii składników: prebiotyków, probiotyków i postbiotyków.

### **Prebiotyki**

Prebiotyki zostały zdefiniowane jako nietrawione składniki pożywienia, które selektywnie stymulują wzrost i/lub aktywność specyficznych bakterii jelitowych i poprawiają zdrowie gospodarza. Należą do nich różne węglowodany złożone. Spożycie fermentowalnych form błonnika w postaci inuliny, oligofruktozy, fruktooligosacharydów lub galaktooligosacharydów zwiększa m.in. licznosc bakterii rodzajów *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* w kale (Meyer and Stasse-Wolthuis 2009). Zadaniem prebiotyków jest pożyteczne dla gospodarza oddziaływanie na cały jego mikrobiom, nie zaś promocja wzrostu konkretnego gatunku bakterii czy jego selektywnej aktywności metabolicznej (Gibson et al. 2017).

Spożywanie zwiększonej ilości węglowodanów wpływa na zmianę mikrobiomu jelitowego, np. arabinoksylian w ludzkim jelicie grubym jest degradowany przez bakterie *Roseburia*, *Bacteroides*, *Prevotella* i *Porphyromonas* (Grootaert et al. 2009), spożycie inuliny promuje wzrost *Bifidobacterium bifidum*, *Faecalibacterium prausnitzii*, a zmniejsza ilość *Enterococcus* (Ramirez-Farias et al. 2009), natomiast zwiększona konsumpcja  $\beta$ -glukanu prowadzi do wzrostu występowania *Bacteroides* i obniżenia *Firmicutes* (Wang Y. et al. 2016). Spożywanie różnych typów skrobi odpornej (resistant starch, RS) ma także wpływ na mikrobiotę jelitową gospodarza. Zgodnie z mechanizmem, który zapobiega rozkładowi przez enzymy amylolityczne, skrobię oporną klasyfikuje się do czterech podstawowych typów. Udowodniono, że zwiększone spożycie skrobi odpornej typu 4 zwiększa liczebność *Actinobacteria* i *Bacteroidetes*, zmniejsza natomiast *Firmicutes* (Cronin et al. 2021).

### **Probiotyki**

Probiotyki to bakterie modyfikujące skład mikrobioty jelitowej. Suplementacja szczepami bakterii probiotycznych wprowadza korzystne mikroorganizmy komensalne, które mają za zadanie przywrócić homeostazę przewodu pokarmowego. Najczęściej stosowane probiotyki to bakterie rodzajów *Lactobacillus* oraz *Bifidobacterium* (Martyniak et al. 2021).

## **Postbiotyki**

Postbiotyki, definiowane jako rozpuszczalne produkty pośrednie lub metabolity wydzielane (albo produkowane) przez bakterie jelitowe, wykazują aktywność biologiczną w stosunku do gospodarza. Najważniejszymi postbiotykami są krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA), tryptofan i bakteriocyny. Bezpośrednie korzyści wynikają z działania postbiotyków wprost na komórki gospodarza, zaś skutki pośrednie to promocja namnażania się szczepów konkurujących z patogenami i hamujących ich wzrost (Martyniak et al. 2021).

## **Synbiotyki**

Synbiotyki to preparaty zawierające żywe mikroorganizmy i związki selektywnie wykorzystywane przez mikroorganizmy, przykładem są szczepy bakterii o działaniu probiotycznym i związki prebiotyczne, np. szczepy *Lactobacillus* i inulina, czy bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* i krótkołańcuchowe fruktooligosacharydy (Li T. et al. 2022). Połączenie probiotyków i prebiotyków jest uważane za obiecujące podejście i intensywnie badane pod kątem skuteczności i zastosowania, m.in. u osób z IBD (Martyniak et al. 2021; Skrzydło-Radomańska et al. 2020).

## **2.2. Metabolity i markery bakteryjne**

### **2.2.1. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe**

Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (short-chain fatty acids, SCFA) są głównymi, a zarazem końcowymi, produktami metabolizmu bakterii bytujących w świetle jelita grubego ssaków (Macfarlane and Macfarlane 2003). Zaledwie około 5% wytworzonych w jelicie grubym SCFA jest wydalanych z kałem, ponieważ 95% absorbują komórki nabłonka jelitowego (Topping and Clifton 2001). Podstawowym substratem do wytwarzania SCFA przez bakterie jelitowe są polisacharydy skrobiowe, skrobio-podobne oraz bezskrobiowe, które nie zostały wcześniej strawione przez enzymy układu pokarmowego. Należą do nich kwasy organiczne składające się z 1 do 6 atomów węgla w łańcuchu alifatycznym: kwas octowy, propionowy, masłowy, walerianowy, kapronowy (Wong et al., 2006, Tan J. et al., 2014).

Stężenie SCFA zmienia się: w dystalnym odcinku okrężnicy jest niższe (20-70 mM), zaś wyższe w proksymalnym (70-140 mM), co wynika ze wzrastającej dostępności węglowodanów i wody w przebiegu jelita grubego (Macfarlane and Macfarlane 2003). Stosunek molowy octanu, propionianu i maślanu wytwarzanych w okrężnicy wynosi odpowiednio 60:25:15 i zależy od wielu czynników, w tym diety, wieku i ewentualnych schorzeń (Topping and Clifton 2001). Najbardziej znaczące zmiany w stężeniu SCFA dotyczą maślanu.

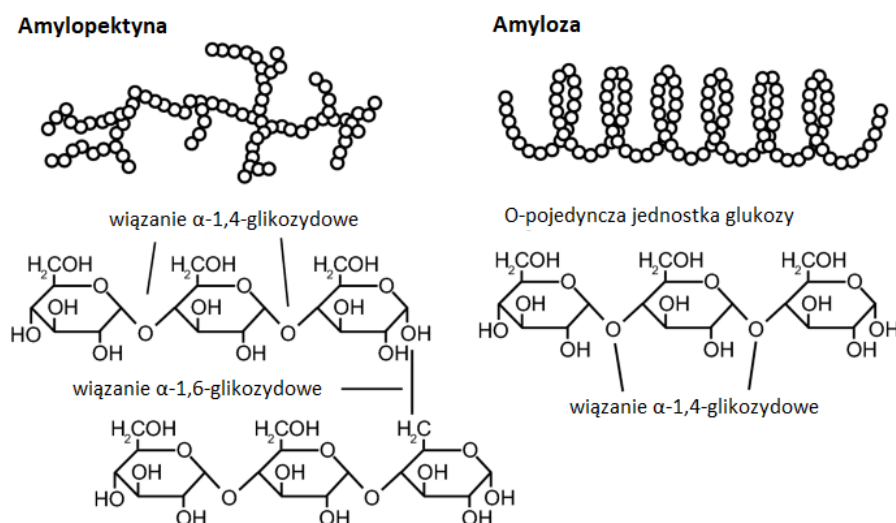
Szczególną rolę pełnią metabolity bakteryjne w dolnych odcinkach układu pokarmowego w interakcjach z komórkami układu odpornościowego i modulacją wydzielania cytokin przez komórki Th, kluczowych dla organizmu gospodarza ze względu na udział w prawidłowym funkcjonowaniu układu immunologicznego (Geuking et al. 2011; Round and Mazmanian 2009).

### 2.2.1.1. Fermentacja węglowodanów przez bakterie jelitowe i wytwarzanie SCFA

U ssaków polisacharydy są zazwyczaj w całości trawione w jelicie cienkim, z wytworzeniem glukozy. Inne cukry złożone, niestrawione bądź strawione częściowo, podlegają fermentacji bakteryjnej przez bakterie beztlenowe w okrężnicy. Związki te, tradycyjnie nazywane fermentującymi, są klasyfikowane jako polisacharydy bezskrobiowe (non-starch polysaccharides, NSP), błonnik pokarmowy oraz skrobia oporna.

Skrobia jest polisacharydem złożonym z łańcuchów reszt glukozy połączonych wiązaniami glikozydowymi, a jej struktura ma charakter przestrzenny. Budują ją dwie frakcje: amyloza - liniowa, słabo rozgałęziona, ze średnim stopniem polimeryzacji, z resztami glukozy połączonymi wiązaniami  $\alpha$ -1,4-glikozydowymi, oraz amylopektyna - frakcja rozgałęziona, w której występują wiązania  $\alpha$ -1,4-glikozydowe i  $\alpha$ -1,6-glikozydowe (Rys. 1).

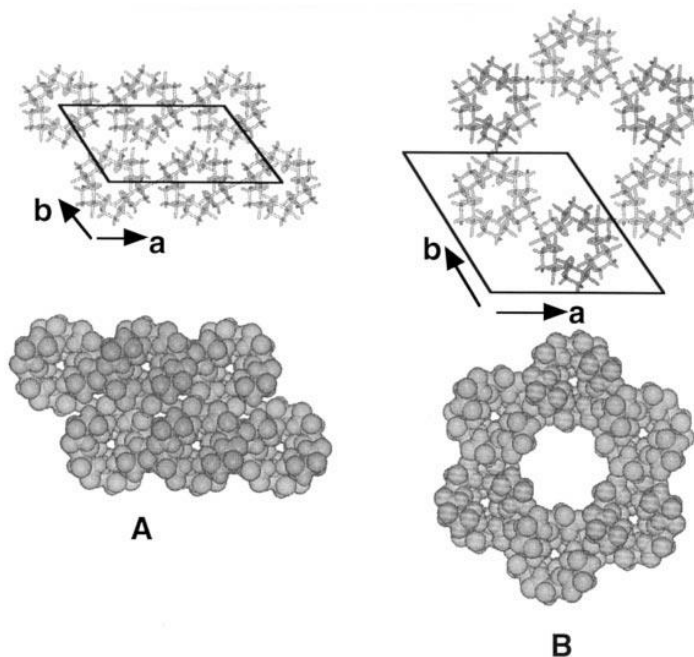
Proporcja amylozy do amylopektyny w skrobi zależy od jej pochodzenia. Zwykle zawartość amylozy mieści się w zakresie 10-35%, ale w skrobi wysokoamylozowej osiąga nawet 70%.



Rysunek 1 Przestrzenna i chemiczna struktura amylopektyny i amylozy ze skrobi kukurdzianej (Willfahrt et al. 2019)

Polimorfizm skrobi wynika z różnej długości łańcuchów bocznych amylopektyny oraz ze stopnia uporządkowania podwójnych helis. Na podstawie budowy krystalicznej wyodrębniono trzy typy skrobi. W skrobi typu A łańcuchy podwójnych helis zazwyczaj mają długość 10-12 reszt glukozy, krystalizujących w układzie heksagonalnym, bardzo upakowanych, z niewielkim udziałem

cząsteczek wody (4 cz. wody na 12 reszt glukozy). Do typu A zaliczamy skrobie pochodzące ze zbóż (pszenica, kukurydza, owies) i roślin korzeniowych (tapioka, bataty, taro), typ B występuje u roślin korzeniowych, bulwiastych (ziemniaki) i niektórych zbóż (wysokoamylozowe: jęczmień, kukurydza, ryż), zaś typ C występuje u roślin strączkowych. Typ B występuje w systemie pseudoheksagonalnym, z luźno upakowanymi podwójnymi helisami, składającymi się z łańcuchów glukozy o długości 13-18 reszt oraz z większą zawartością cząsteczek wody (36 na 12 reszt glukozy). Forma C jest mieszaniną typów A i B (Gernat et al. 1990) (Rys. 2).



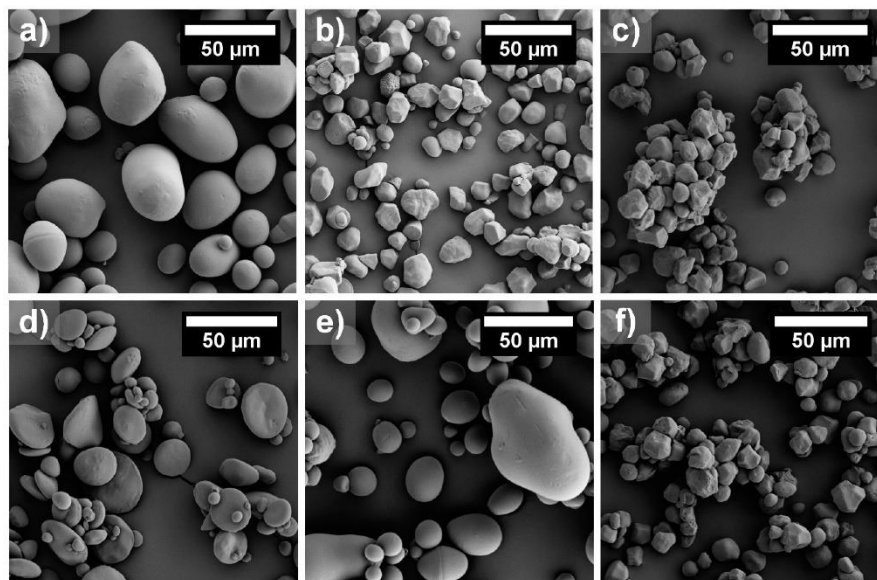
Rysunek 2 Krystaliczne upakowanie podwójnych helis w amylozie typu A i typu B. Rzut konstrukcji na płaszczyznę (a, b) (Buléon et al. 1998)

Część spożywanej skrobi nie jest całkowicie trawiona, pośrednie produkty hydrolizy opuszczają jelito cienkie i trafiają do jelita grubego, gdzie są wykorzystywane przez mikrobiotę gospodarza. Ta część skrobi opisywana jest jako skrobia oporna (resistant starch, RS), czyli suma skrobi i produktów jej degradacji nie zaabsorbowanych w jelicie cienkim. Skrobia oporna występuje w czterech formach (Rys. 3):

- skrobia oporna typu 1, obecna w komórkach roślin z niezniszczonymi ścianami komórkowymi; jest niedostępna dla enzymów amylolitycznych do momentu degradacji ściany komórkowej rośliny, czyli rozłożenia celulozy, hemicelulozy, ligniny i innych jej składników.
- skrobia oporna typu 2, obecna w granulach surowych roślin, np. ziemniaków lub bananów. Jej trawienie wynika ze struktury i dużych rozmiarów granul, co utrudnia dostępność enzymów. Skrobia ziemniaczana posiada stosunkowo dużo amylopektyny typu B i wykazuje relatywnie wysoki poziom krystalizacji.
- skrobia oporna typu 3 wytrąca się z pasty lub żelu skrobiowego w procesie retrogradacji, czyli

przemiany formy spiralnej skrobi w liniową i porządkowaniu wyprostowanych łańcuchów amylozy w zwarte micelle, których strukturę stabilizują wiązania wodorowe, tworzące się między grupami hydroksylowymi cząsteczek skrobi położonych blisko siebie. Odporność produktów tego procesu na degradację przez enzymy amylolityczne jest bardzo duża.

- skrobia oporna typu 4 – to skrobia modyfikowana chemicznie, acetylowana lub hydroksypropylowana.



Rysunek 3 Obrazy SEM (a) natywnej skrobi ziemniaczanej, (b) natywnej skrobi kukurydzianej, (c) natywnej woskowej skrobi kukurydzianej, (d) natywnej skrobi pszennej, (e) utlenionej skrobi ziemniaczanej i (f) utlenionej skrobi kukurydzianej (Borchert et al. 2021).

Ludzki genom koduje ograniczoną liczbę hydrolaz glikozydowych i żądnych liaz polisacharydów (enzymów trawiennych węglowodany, inaczej CAZymów) (Cantarel et al. 2012). Pierwszorzędowa degradacja glikanów uwalnia glukozę i inne drugorzędowe produkty fermentacji, inicjując powstanie sieci połączeń metabolicznych (cross-feeding). Skrobia oporna, inulina, lignina, pektyna, celuloza i fruktooligosachardy znajdują się w jelicie grubym w niestrawionej formie. Dzięki aktywności bakteryjnych CAZymów powstają krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe. CAZymy formują kompleksy w celu przekształcenia złożonych węglowodanów w cukry proste (Kim, 2018; Shoham et al., 1999).

SCFA o różnej długości łańcucha alifatycznego powstają z różnych polisacharydów, np. skrobia oporna dostarcza najwięcej kwasu masłowego (Tan J. et al. 2014), a najbardziej wydajnym źródłem kwasu propionowego jest skrobia oporna (Al-Lahham et al. 2010).

Wykazano, że podawanie prebiotyków, np. inuliny, wpływa na zmianę stężenia SCFA w kale (Macfarlane et al. 2006). Dodatek prebiotyków ma wpływ na zmianę składu mikrobioty jelita u ludzi, a podawanie inuliny stymulowało wzrost bakterii rodzajów *Bacteroides*, *Lactobacillus*,

*Bifidobacteria* oraz niektórych szczepów *Clostridium* w większym stopniu niż celuloza. W badaniach *in vitro* wykazano, że suplementacja celulozą znacząco stymulowała wzrost enterobakterii, w tym *Escherichia coli*, w porównaniu do suplementacji inuliną (Jung et al. 2015).

Bakteryjny rozkład wcześniej niestrawionych produktów białkowych pochodzących z diety prowadzi do powstania toksycznych metabolitów, np. amoniaku, amin biogennych, siarkowodoru, indoli lub związków fenolowych. Niektóre z nich uszkadzają integralność nabłonka jelit i wywołują reakcje zapalne.

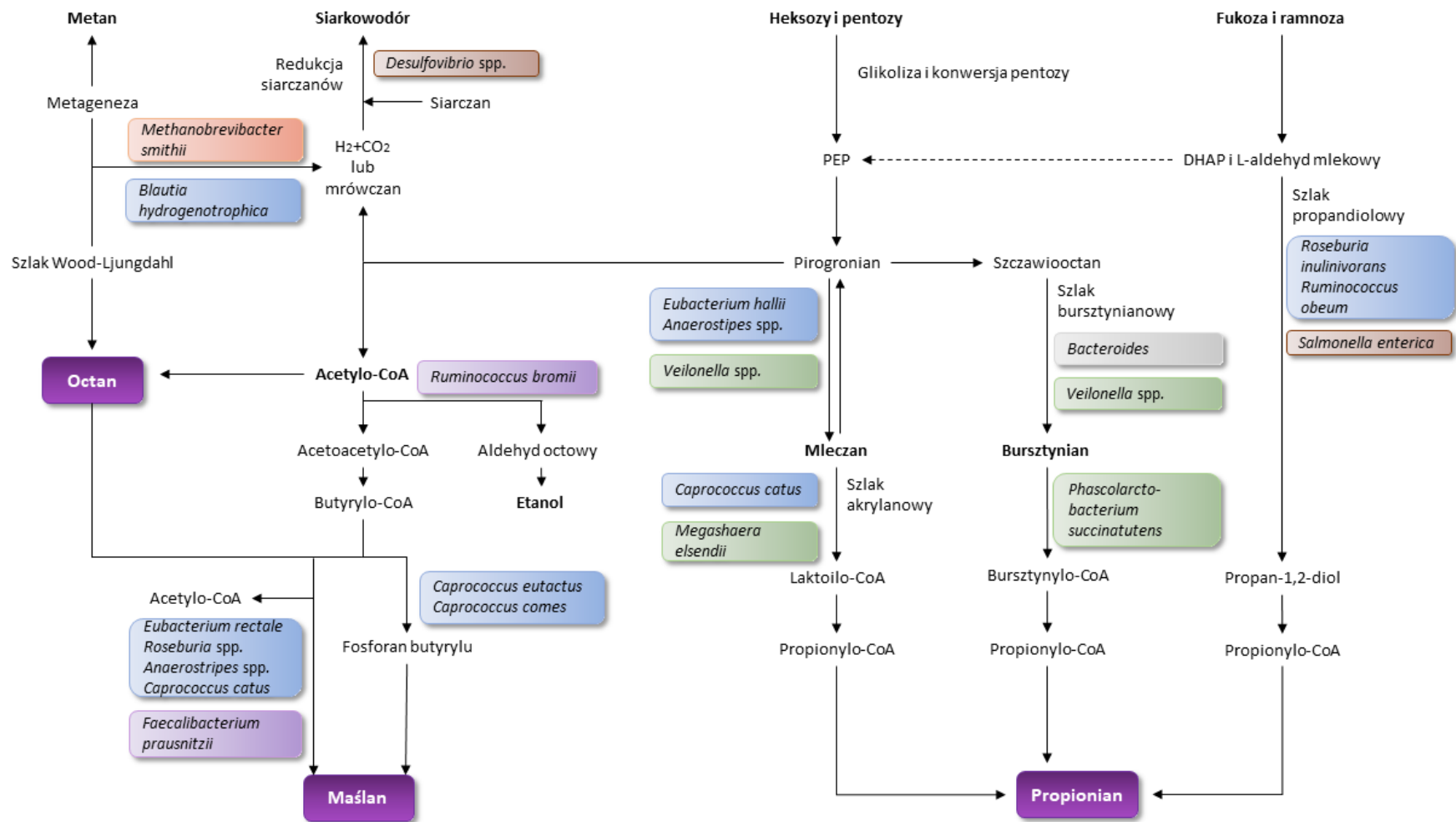
#### 2.2.1.2. Metabolizm SCFA u bakterii konsorcjum jelitowego

W jelicie grubym octan stanowi ponad połowę wszystkich SCFA wykrywanych w kale. Za wytwarzanie octanu przez mikrobiotę jelitową odpowiadają dwie ścieżki metaboliczne: fermentacja węglowodanów przez bakterie jelitowe oraz poprzez szlak Wooda-Ljungdahla - syntezy wodoru i dwutlenku węgla lub kwasu mrówkowego, którą przeprowadzają bakterie octowe (Koh et al., 2016) (Rys. 4, Tab. 1).

Synteza propionianu przez bakterie jelitowe odbywa się na drodze trzech szlaków biochemicznych: bursztynianowego, akrylanowego i propanodiolowego. Dominuje ścieżka bursztynianowa ze względu na obecność *Bacteroidetes*, korelująca ze stężeniem propionianu kałowego (Koh et al., 2016).

Maślan jest syntezowany w szlaku kinazowym, angażującym transbutyrylazę fosforanową i kinazę maślanową w celu przekształcenia butyrylo-CoA do maślanu, lub w wyniku przekształcania butyrylo-CoA do maślanu przez pojedynczą reakcję enzymatyczną (Koh et al., 2016).

W konsorcjum jelitowym często występuje zjawisko „cross-feeding”, w którym produkt metabolizmu jednej grupy bakterii jest substratem do wytwarzania innego metabolitu przez kolejną grupę bakterii. Cross-feeding w przypadku SCFA najczęściej przebiega od octanu do maślanu, w mniejszym stopniu między propionianem i maślanem, i prawie nie istnieje w przypadku propionianu i octanu (Louis et al. 2014) (Tab. 2, Tab. 3).



Rysunek 4 Metabolizm jelitowy węglowodanów (Rowland et al. 2018)



Maślan jest wytwarzany przez bakterie rodzajów *Clostridium*, *Eubacterium* i *Fusobacterium* (np. *Clostridium butyricum*, *Eubacterium limosum*) (Bourriaud et al. 2005). Szczególnie efektywnymi producentami kwasu masłowego są *Clostridium leptum*, *Roseburia* spp., *Faecalibacterium prausnitzii* i *Coprococcus* spp. (Guilloteau et al. 2010).

Szlak biochemiczny prowadzący do powstania SCFA jest procesem dynamicznym, w którym wytworzone wcześniej maślan i propionian mogą być degradowane do octanu przez *Acetobacterium*, *Acetogenium*, *Eubacterium* i *Clostridium*. Proces ten może zostać odwrócony, jeżeli wzrośnie liczba bakterii wytwarzających maślan, jak *Faecalibacterium prausnitzii* czy *Roseburia* spp. (Duncan et al. 2004).

Uważa się, że w konsorcjum bakteryjnym pozostającym w homeostazie kwas octowy wytwarzany przez *Bacteroidetes* może być wykorzystany przez przedstawicieli *Firmicutes* do wytwarzania kwasu masłowego i propionowego (Mahowald et al. 2009).

Degradacja powstałych w procesie fermentacji bakteryjnej krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych odbywa się w trzech lokalizacjach: w komórkach nabłonka okrężnicy, gdzie głównym substratem jest maślan, stanowiący dla kolonocytów podstawowe źródło energii, w komórkach wątroby, które metabolizują większość octanu oraz maślan i propionian (pozostałe po procesie glukoneogenezy), i w mięśniach, które generują energię przez utlenienie pozostałego octanu (Roberfroid 2007).

Absorbcja SCFA przez komórki nabłonka następuje w wyniku dyfuzji uprotonowanych kwasów oraz przez wymianę anionów. Aktywny transport SCFA przez błonę śluzową odbywa się za pośrednictwem izoformy 1 transportera kwasów monokarboksylowych (monocarboxylate transporter 1, MCT-1) oraz izoformy 1 transportera kwasów monokarboksylowych związanego z sodem (sodium-coupled monocarboxylate transporter 1, SMCT-1). Oba transportery są ekspresjonowane na kolonocytach (Iwanaga et al. 2006), a MCT-1 także na limfocytach, co umożliwia transport SCFA do wnętrza tych komórek (Halestrap 2012).

Tabela 1 Biosynteza krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w jelitach (Ratajczak et al. 2019)

SCFA	Biosynteza	Mikroorganizmy	Referencje
<b>Octan</b>	Z pirogronianu w szlaku acetylo-CoA	<i>Akkermansia muciniphila</i> , <i>Bacteroides</i> spp., <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Prevotella</i> spp., <i>Ruminococcus</i> spp.	(Koh et al. 2016)
	Redukcyjny szlak acetylo-CoA (ścieżkę Wood-Ljungdahla)	<i>Blautia hydrogenotrophica</i> , <i>Clostridium</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.	
<b>Propionian</b>	Szlak bursztynianowy	<i>Bacteroidetes</i> spp., <i>Roseburia</i> spp., <i>Firmicutes</i> , <i>Roseburia inulinivorans</i> , <i>Ruminococcus</i> spp., <i>Clostridium</i> spp., <i>Clostridiales bacterium</i> , <i>Eubacterium</i> spp., <i>Coprococcus</i> spp., <i>Dialister succinatiphilus</i> , <i>Phascolarctobacterium succinatutens</i> , <i>Akkermansia muciniphila</i>	(Reichardt et al. 2014)
	Szlak akrylanowy	<i>Clostridium</i> spp., <i>Clostridiales bacterium</i> , <i>Coprococcus catus</i> , <i>Clostridium</i> spp.	
	Szlak propandiolowy	<i>Roseburia insulivorans</i> , <i>Ruminococcus</i> spp., <i>Eubacterium halli</i> , <i>Clostridium</i> spp.	
<b>Maślan</b>	Szlak wykorzystujący transferazę butyrylo-CoA:octanowo-CoA	<i>Roseburia intestinalis</i> , <i>Eubacterium rectale</i> , <i>Roseburia insulivorans</i> , <i>Clostridiales bacterium</i> , <i>Anaerostipes hadrus</i> , <i>Caprococcus</i> spp., <i>Clostridium symbiosum</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	(Reichardt et al. 2014)
	Szlak kinazy maślanowej	<i>Bacteroidetes</i> spp., <i>Caprococcus</i> spp.	

Tabela 2 Stężenie SCFAs w organizmie człowieka (Parada Venegas et al. 2019)

SCFA	stężenie	populacja	referencje
kątnica (mmol/kg)	131±9	Anglia	(Cummings et al. 1987)
okrężnica zstępująca (mmol/kg)	80±11		
jelito kręte (mmol/kg)	13±6		
krew wrotna (mM)	0,375±0,07		
wątroba (mM)	0,148±0,42		
krew obwodowa (mM)	0,079±0,02		

Tabela 3 Stężenie SCFA w różnych lokalizacjach (Parada Venegas et al. 2019)

	octan	propionian	maślan	populacja	referencje
stosunek molowy w okrężnicy	60	20	20	Anglia	(Cummings et al. 1987)
stężenie w kale (μmol/g=mmol/kg)	209,7±14,0	93,3±5,3	176,0±16,0	Malezja	(Huda-Faujan et al. 2010)
stężenie w kale (mM)	87 (58,4-114,9)	21,6 (16,5±27,2)	14,7 (10,3±24,6)	Belgia	(Machiels et al. 2014)
stężenie w kale (mM)	39,9-56,1	12,8-23,6	12,2-19,0	Japonia, Chiny, Australia	(Topping and Clifton 2001)

### 2.2.1.3. *Badania mikrobiomu oraz SCFA na modelach zwierzęcych*

W badaniach mikrobiomu jako modele eksperymentalne wykorzystuje się na ogół gryzonie, w szczególności myszy, należy jednak pamiętać o różnicach w budowie i funkcji poszczególnych elementów układu pokarmowego. Fermentacja niestrawionych składników pożywienia u myszy odbywa się w jelicie ślepym, natomiast u ludzi odcinek ten jest proporcjonalnie znacznie krótszy, a fermentacja przebiega w jelicie grubym (Nguyen et al. 2015). Komórki kubkowe i komórki Panetha, mające udział w utrzymaniu homeostazy jelitowej, są u myszy zlokalizowane w jelicie cienkim, natomiast u człowieka w jelicie ślepym i proksymalnej części jelita grubego. Te różnice wpływają na różnice w strukturze mikrobiomu jelita grubego oraz stężenie SCFA w organizmie myszy i człowieka.

Oszacowanie wielkości produkcji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych może być problematyczne z powodu szybkiego ich wychwytu przez kolonocyty oraz wykorzystywanie przez drobnoustroje jelitowe do własnego metabolizmu jako źródła energii. Najłatwiej dostępnym materiałem do badań jest surowica i kał, z zastrzeżeniem, że w świetle jelita grubego z początkowej ilości SCFA zaledwie około 5% jest wydalanych z kałem, a większość absorbują kolonocyty.

### 2.2.1.4. *SCFA w układzie immunologicznym i procesach przeciwzapalnych*

Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe hamują aktywność deacetylazy histonowej (HDAC) i uczestniczą w przekazywaniu sygnału przez zespół receptorów wolnych kwasów tłuszczowych, czyli receptory sprzężone z białkami G (GPRs, G Protein-Coupled Receptors) (Tab. 4) (Tan J. et al. 2014).

## **HDAC – deacetylaza histonowa**

Ekspresja DNA jest regulowana przez acetylację i deacetylację histonów. Deacetylaza histonowa jest enzymem odpowiedzialnym za usunięcie grupy acetylowej z  $\epsilon$ -N-acetylolizyny, co umożliwia lepsze owinięcie histonów przez DNA. Jest to ważny proces wpływający na ekspresję genów, ponieważ jedynie hiperacetylowana chromatyna jest transkrypcyjnie aktywna.

Inhibicja HDAC przez krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe zależy od typu SCFA oraz od rodzaju komórek i tkanek, w których proces ten zachodzi. Najsilniejszym inhibitorem HDAC jest kwas masłowy, który, mimo że obecny w niewielkich stężeniach, odgrywa najważniejszą rolę w regulacji aktywności deacetylazy histonowej. Mniejszym wpływem na HDAC charakteryzują się kwas propionowy i kwas octowy. Hamowanie deacetylazy histonowej odbywa się bezpośrednio w wyniku wiązania dwóch cząsteczek kwasu masłowego w hydrofobowej kieszeni enzymu (Cousens

et al. 1979) lub pośrednio przez receptory GPR41, GPR43 i GPR109 (Tan J. et al. 2014).

Szczególną właściwością krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych jest indukcja komórek T-regulatorowych (Treg) z naiwnych prekursorów komórek T CD4+ przez inhibicję HDAC (Arpaia et al. 2013). Kwas masłowy hamuje aktywność HDAC9, co wywołuje wzrost ekspresji czynnika transkrypcyjnego FOXP3, proliferację i zwiększenie funkcjonalnych możliwości komórek Treg (Tao et al. 2007).

## **Zespół receptorów wolnych kwasów tłuszczowych (GPRs)**

### *Receptor wolnych kwasów tłuszczowych 2 sprzężony z białkami G - FFAR2/GPR43*

Receptor wolnych kwasów tłuszczowych 2 (FFAR2/GPR43) sprzężony z białkami G jest kodowany przez gen *FFAR2* i odpowiada za wiązanie SCFA, tj. octanu, propionianu, maślanu, kapronianu i walerianianu. Najsilniejszym aktywatorem GPR43 jest propionian, natomiast octan jest aktywatorem najbardziej selektywnym. GPR43 jest ekspresjonowany w całym przewodzie pokarmowym, a także na komórkach układu odpornościowego i układu nerwowego (Tolhurst et al. 2012).

Receptory GPR43 występują na powierzchni komórek immunokompetentnych, są ekspresjonowane na eozynofilach, bazofilach, neutrofilach, monocytach, komórkach dendrytycznych i komórkach tucznych śluzówki (Kasubuchi et al., 2015; Tan et al., 2014). Znaczna ekspresja GPR43 jest obserwowana w tkankach krwiotwórczych, szczególnie komórki nabłonka pośredniczące w tej reakcji intensywnie ekspresjonują GPR43, są więc efektywnie stymulowane przez SCFA (Kim M. H. et al. 2013).

Myszy pozbawione receptorów GPR43 wykazują wadliwą odpowiedź immunologiczną i rozwijają chroniczne zapalenie prowadzące do uszkodzeń nabłonka jelitowego. W komórkach nowotworowych ekspresja GPR43 jest obniżona, a obecność receptorów GPR43 koreluje z supresją rozwoju nowotworu jelita. Wzrost podaży błonnika oraz SCFA w paszy hamuje proces zapalny w jelicie oraz karcynogenezę zarówno za pośrednictwem receptorów GPR, jak i enzymu HDAC (Kim M. et al. 2018).

### *Receptor wolnych kwasów tłuszczowych 3 sprzężony z białkami G - FFAR3/GPR41*

Receptor wolnych kwasów tłuszczowych 3 (FFAR3/GPR41) jest również receptorem sprzężonym z białkami G, kodowanym przez gen *FFAR3*. GPR41 wykazuje szczególne powinowactwo do kwasów octowego i propionowego, mniejsze do kwasu masłowego oraz w niewielkim stopniu do kwasów kapronowego i walerianowego (Tan J. et al. 2014).

Receptory GPR41 są bardzo aktywne podczas reakcji na ostry stan zapalny przebiegający z uszkodzeniem nabłonka jelitowego, biorą udział także w jego odbudowie, a ich obecność

zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia sepsy (Kim M. H. et al. 2013).

Receptor GPR41 jest obecny w tkance tłuszczowej i w obwodowym układzie nerwowym, w komórkach enterocytów i komórkach endokrynych nabłonka okrężnicy zawierających PYY (ale nie serotoninę i GPR43). W mięśniach gładkich okrężnicy obecność SCFA indukuje fazowy skurcz mięśni w sposób zależny od GPR41 (z powinowactwem propionian>maślan>octan) i w ten sposób pośrednio bierze udział w prawidłowym funkcjonowaniu jelita (Tan J. et al. 2014; Tazoe et al. 2009).

Inną funkcją GPR41 jest indukcja glukoneogenezy jelitowej poprzez oś jelito-mózg: następuje aktywacja GPR41 przez SCFA, co poprawia tolerancję glukozy.

#### Receptor niacynowy NIACR1/GPR109A

Receptor GPR109A wykazuje bardzo duże powinowactwo do niacyny, ale także do maślanu w stężeniu milimolarnym (Tan J. et al. 2014). Receptor ten jest ekspresjonowany na adipocytach (Thangaraju et al. 2009) oraz na powierzchni komórek układu odpornościowego: na skórnych komórkach dendrytycznych, na monocytach, makrofagach i neutrofilach (Wanders et al. 2012). Kwas masłowy wiąże się swoiście do GPR109A obecnego na limfocytach śródbłonka jelitowego (IEC) w okrężnicy (Ganapathy et al. 2013). Oddziaływanie między GPR109A a kwasem masłowym promuje wydzielanie IL-10 i dehydrogenazy aldehydowej przez makrofagi i komórki dendrytyczne, istotnie wpływając na proces różnicowania komórek Treg, które mogą regulować homeostazę obwodową oraz homeostazę błon śluzowych (Singh et al. 2014).

U myszy gnotobiotycznych ekspresja genów dla jelitowych komórek Treg i IL-10 jest znacząco zredukowana w porównaniu do myszy konwencjonalnych (Atarashi et al. 2013; Geuking et al. 2011).

Na zasadniczą rolę mikrobiomu w regulacji odpowiedzi immunologicznej wskazuje szereg cech obserwowanych u myszy gnotobiotycznych, np. zredukowana liczba komórek T CD4+ w blaszce właściwej (Macpherson et al. 2002), limfocytach śródbłonkowych (IELs) (Imaoka et al. 1996) i okrężniczych Treg (Galipeau and Verdu 2014; Round and Mazmanian 2010). Potwierdzają to wyniki otrzymane dla szczepów komensalnych, np. *Bifidobacterium infantis* 35624, którego podanie osobom zdrowym powodowało indukcję komórek Treg, a następnie redukcję wytwarzania cytokin prozapalnych i proliferację komórek T, zmniejszoną ekspresję cząsteczek kostymulujących komórki dendrytyczne i obniżenie aktywności NF-κB (Konieczna et al. 2012).

Ekstrakty kałowe z dużą zawartością SCFA i oczyszczone związki octanu, maślanu i propionianu podane *in vitro* do środowiska komórek nabłonkowych jelita na podobnym poziomie indukowały TGF-β1 (Atarashi et al. 2011; 2013; Arpaia and Rudensky 2014).

Poziom SCFA w świetle jelita uzyskany za pomocą analiz metabolomicznych korelował z

liczbą komórek Treg w okrężnicy (Furusawa et al. 2013), co potwierdza znaczący potencjał przeciwzapalny SCFA oraz ich zdolność do zahamowania odpowiedzi prozapalnej, realizowanej przez makrofagi jelitowe (Arpaia and Rudensky 2014). U myszy gnotobiotycznych już po trzech tygodniach podawania wody z dodatkiem SCFA uzyskiwano wzrost liczby komórek Treg w okrężnicy, ale nie w komórkach śledziony, krezki, węzłów chłonnych czy grasicy. Jednocześnie poziom SCFA korelował z liczbą komórek T CD4+, ale nie miał wpływu na poziom komórek Th1 i Th17 w okrężnicy (Smith P. M. et al. 2013).

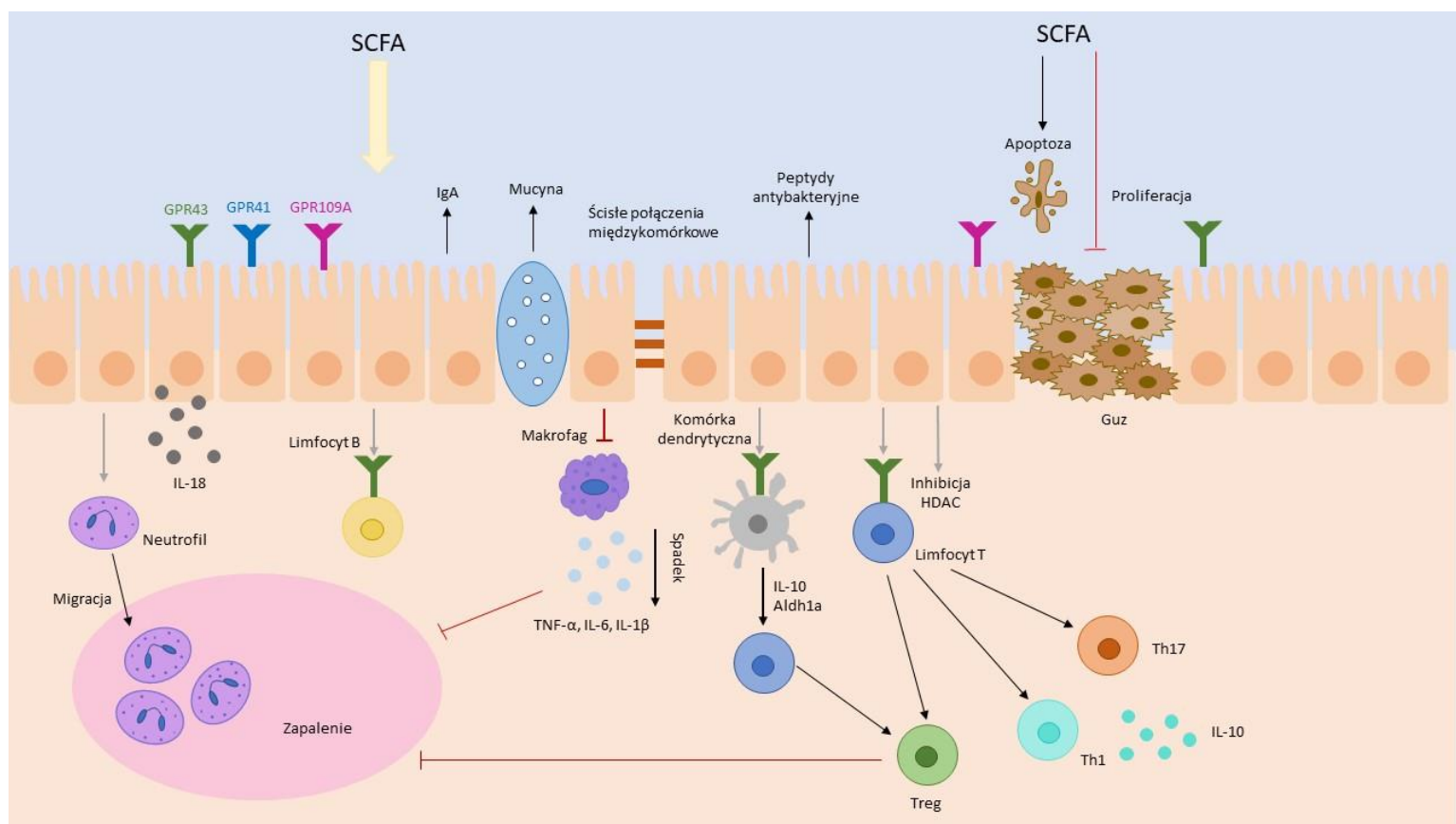
Podsumowując, SCFA pośredniczą między mikrobiotą jelitową a układem odpornościowym gospodarza: w środowisku jelita wpływ krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych na komórki T jest pośrednio zależny od GPR41 i GPR43, ale bezpośrednio zależy od inhibicji deacetylazy histonowej (HDAC) (Rys. 5). W ten sposób SCFA stymulują różnicowanie komórek T zarówno do komórek efektorowych, jak i regulatorowych, promując odpowiedź prozapalną lub przeciwzapalną w zależności od środowiska cytokinowego (Park et al. 2015).

Tabela 4 Transportery i receptory SCFAs (Parada Venegas et al. 2019)

	ligandy	tkanka lub komórki, w których są ekspresjonowane	gatunki	referencje
<b>RECEPTORY GPR</b>				
<b>GPR41</b>	<b>propionian=</b> pentanian= <b>maślan&gt;octan&gt;</b> mrówczan	tkanka tłuszczowa>PBMCs, trzustka wątroba i łożysko	człowiek	(Brown et al. 2003)
		monocyty, neutrofile i komórki dendrytyczne pochodzące z monocytów	człowiek	(Nastasi et al. 2015)
<b>GPR43</b>	<b>octan=propionian=maślan&gt;</b> pentanian>heksanian>mówczan	nabłonek jelitowy	człowiek mysz	(Agus et al. 2016)
		monocyty, neutrofile, PMBCs i limfocyty B/T	człowiek	(Agus et al. 2016)
		Treg (okreźnica>śledziona i MLN) i komórki macierzyste okreźnicy	człowiek	(Smith P. M. et al. 2013)
<b>GPR109A</b>	d-beta-hydroksymaślan, <b>maślan</b> i kwas nikotynowy	tkanka tłuszczowa (>płuca, nadnercza i śledziona)	człowiek mysz	(Tunaru et al. 2003)
		okreźnica (>jelito kręte, jelito czcze i dwunastnica)	człowiek mysz	(Thangaraju et al. 2009)
		monocyty, komórki dendrytyczne pochodzące z monocytów, komórki dendrytyczne (krew, śledziona, okreźnica), makrofagi (śledziona i okreźnica) i BMDM	człowiek mysz	(Nastasi et al. 2015)

PBMCs - komórki jednojądrzaste krwi obwodowej

BMDM - makrofagi pochodzące ze szpiku kostnego



**Rysunek 5 Rola SCFAs w regulacji jelitowego układu odporności**

SCFAs regulują homeostazę jelitową wpływając na komórki układu odpornościowego: *i.* SCFA regulują integralność bariery nabłonka poprzez indukcję wydzielania IL-18, peptydów antybakteryjnych, mucyny oraz zwiększając ekspresję połączeń międzykomórkowych (tight junction); *ii.* SCFA indukują migrację neutrofilów do miejsca zapalenia i zwiększają ich zdolność do fagocytozy; *iii.* SCFA regulują funkcje limfocytów T, na ścieżce pośredniej przez GPR oraz poprzez inhibicję HDAC. Różnicowanie limfocytów T odbywa się przez regulację komórek dendrytycznych przez SCFA oraz przez bezpośredni wpływ SCFA na komórki T; *iv.* SCFA regulują populację komórek Th1, Th17 i Treg w zależności od środowiska cytokinowego; *v.* SCFA hamują jelitową produkcję cytokin prozapalnych przez makrofagi poprzez inhibicję HDAC i prawdopodobnie indukują jelitową produkcję IgA za pośrednictwem limfocytów B; *vi.* SCFA hamują karcynogenezę poprzez promowanie apoptozy oraz supresję proliferacji komórek guza (Sun et al. 2017; Śliżewska, et al. 2020).



## Udział SCFA w utrzymywaniu homeostazy gospodarza

W aspekcie prowadzonych w niniejszej pracy badań szczególne znaczenie miało przeciwzapalne działanie SCFA i ich zdolność do pobudzania układu immunologicznego gospodarza.

Kwas octowy ma kluczowe znaczenie w utrzymywaniu równowagi między konsorcjum jelitowym i układem immunologicznym gospodarza. Jest wiązany przez GPR41 i przez GPR43 i w warunkach zapalenia octan może hamować migrację neutrofilii (Vinolo et al. 2011), promuje wydzielanie wolnych rodników tlenowych poprzez aktywację GPR43 (Maslowski et al. 2009; Tan J. et al. 2014). Octan akumuluje się w podwzgórzku aktywując karboksylazę acetylo-koenzymu A i zmianę profilu ekspresji neuropeptydów regulatorowych w kierunku zmniejszenia apetytu, zatem odpowiednie wykorzystanie tego mechanizmu może być przydatne w leczeniu otyłości (Frost et al. 2014).

Kwas propionowy może być wiązany przez receptory GPR43 i GPR41. Wśród SCFA jedynie propionian wpływa na regulatory ciśnienia krwi dzięki zdolności do silnego wiązania się do receptorów (Pluznick 2014).

Kwas masłowy może działać przez GPR41 i GPR43, ale najczęściej wchodzi w interakcje z receptorem niacynowym GPR109A, wykazuje również silne właściwości inhibicji deacetylazy histonowej (HDAC). W porównaniu z pozostałymi SCFA maślan ma najsilniejszy wpływ immunomodulujący.

W ludzkich monocytach maślan działa przeciwzapalnie przez inhibicję wytwarzania IL-12 i zwiększenie wytwarzania IL-10, represję wytwarzania cząsteczek prozapalnych (tlenki azotu, IL-1b, TNF- $\alpha$ ) oraz redukcję aktywności NF- $\kappa$ B (Ni et al., 2010). Makrofagi w obecności maślanu redukują wydzielanie prozapalnych mediatorów indukowanych przez LPS (IL-6 i IL-12), ale nie mają wpływu na aktywność wydzielniczą TNF- $\alpha$  i MCP-1. Kluczowa jest inhibicja deacetylazy histonowej i nie ma tu znaczenia obecność receptorów Toll-podobnych (TLR) i receptorów GPR (Chang P. V. et al. 2014).

Maślan stymuluje adipogenezę i akumulację lipidów przez zwiększone pobieranie glukozy, lipogenezę *de novo*, może także hamować lipolizę na ścieżce zależnej od receptora GPR41. Adipocyty są zdolne do utylizacji maślanu powodując wzrost ekspresji adiponektyny w celu wychwytu glukozy i poprawy wrażliwości insulinowej, co sugeruje jego potencjalną rolę w zapobieganiu lub odwracaniu hiperglikemii i hiperlipidemi (Yan and Ajuwon 2015).

### 2.2.2. Lipopolisacharyd (endotoksyna, LPS)

Błony komórkowe bakterii Gram-ujemnych składają się z dwóch membran: wewnętrznej i zewnętrznej, oddzielonych periplazmą, czyli hydrofilową przerwą zbudowaną z warstwy peptydoglikanu. Zewnętrzna błona komórkowa bakterii Gram-ujemnych jest asymetryczną dwuwarstwą z cząsteczkami lipopolisacharydu (LPS) po zewnętrznej stronie oraz fosfolipidami po wewnętrznej. LPS zapewnia podstawową funkcję bariery przepuszczalności oraz ochronę przed środowiskowymi czynnikami stresu i stanowi jedną z najbardziej konserwatywnych makrocząstek bakteryjnych, co sprawia, że zalicza się go do grupy wzorców molekularnych związanych z patogenami (PAMP). U kręgowców rozpoznawany jest przez wrodzony układ odpornościowy oparty na receptorach Toll-podobnych (TLR4) i pozwala zainicjować reakcję przeciw patogenom bakteryjnym. Prawidłowa odpowiedź układu odpornościowego zapobiega niekontrolowanemu namnażaniu bakterii i gromadzeniu się wolnych, niezwiązanych z błoną cząsteczek LPSu, potencjalnie grożących rozwinięciem zapalenia i szoku septycznego (Stearns-Kurosawa et al. 2011).

Lipopolisacharydy są to glikokoniugaty zbudowane z domeny lipidowej związanej z rdzeniem oligosacharydowym oraz dystalnego polisacharydu. Podjednostki lipopolisacharydu to:

- lipid A: domena hydrofobowa zbudowana z 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OH FAs), która należy do głównych czynników wirulencji bakterii Gram-ujemnych. Podjednostka ta jest acylowana i fosforylowana w różnych konfiguracjach; jest zakotwiczona w zewnętrznej błonie bakteryjnej;
- rdzeń oligosacharydowy związany za pomocą kwasu 3-deoksy-D-manno-oktulozonowego (Kdo) z lipidem A;
- łańcuch O-swoisty (O-antygen) powtarzający się hydrofilowy oligosacharyd, który skierowany jest do środowiska wodnego, czyli na zewnątrz błony komórkowej.

Cechą charakterystyczną LPS-u jest termostabilność i zdolność do generowania silnej reakcji zapalnej u ssaków.

#### 2.2.2.1. *Lipopolisacharyd a mikrobiom jelitowy*

Całkowity LPS produkowany przez mikrobiom nie jest immunogeny i generalnie hamuje wydzielanie cytokin produkowanych w szlaku zależnym od TLR4, utrzymując wyciszenie immunologiczne organizmu (d'Hennezel et al. 2017).

Jelitowy LPS pochodzący od bakterii rzędu *Bacteroidales* stanowi od 79% do 92,4%, *Proteobacteria* odpowiadają za 5,2% do 14% całkowitego jelitowego LPSu, zatem średnia proporcja LPS *Bacteroidetes* vs. *Proteobacteria* wynosi około 6:1 do 18:1.

LPS u przedstawicieli *Bacteroidales* (*Bacteroides*, *Prevotella*, *Alistipes* spp.) nie stymuluje efektorów wrodzonego układu odpornościowego, tj. receptorów typu TLR4, a co za tym idzie, hamuje produkcję cytokin IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ . Brak zdolności do wywołania reakcji zapalnej wiąże się ze strukturą chemiczną lipidu A i liczbą łańcuchów acylowanych. U *Bacteroidales* lipid A posiada struktury tetra- i penta-acylowane, dodatkowo rozgałęzione, które nie są rozpoznawane jako PAMP przez receptory TLR4. Długo panował pogląd, że potencjał zapalny i immunologiczny mikrobioty jelitowej jest wysoki, jak się jednak okazało, był przeceniany właśnie ze względu na znaczą heterogenność LPSu (d’Hennezel et al. 2017).

Struktura lipidu A ma kluczowe znaczenie dla potencjału zapalnego, czego przykładem są szczepy *Pseudomonas aeruginosa* posiadające penta-acylowany LPS. Nie kolonizują one błon śluzowych gospodarza, ale w środowisku wodnym adaptują się do wytwarzania heksa-acylowanego LPSu zyskując w ten sposób zdolność do kolonizacji płuc u chorych na mukowiscydozę (Huszczynski et al. 2019; Pier 2007). W warunkach homeostazy mechanizm dopasowania heksa-acylowanych łańcuchów lipidu A do kompleksu TLR4-MD2-CD14 jest kluczowy dla szlaku sygnałowego inicjującego reakcję zapalną gospodarza. Z uwagi na brak ekspresji TLR4 w komórkach nabłonka jelitowego od strony światła jelita, nie następuje reakcja na LPS znajdujący się w masie kałowej (Rakoff-Nahoum et al. 2004), z kolei śródbłonkowe receptory TLR4 chronią uszkodzone jelito i reagują na bakterie, które pokonały barierę nabłonka, i uruchamiając lokalny system odpowiedzi zapalnej chronią gospodarza (Collier-Hyams and Neish 2005).

Ta właściwość LPSu jest wykorzystywana do oceny potencjału zapalnego mikrobioty, zależnego od obecności prozapalnych struktur będących agonistami receptorów TLR4, najsilniej mediujących cytokinową reakcję zapalną.

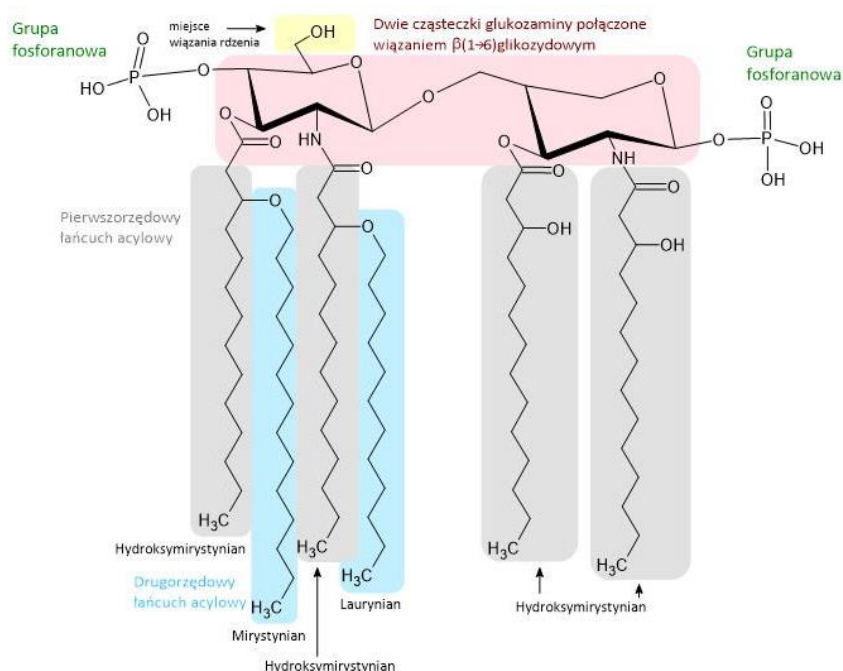
#### 2.2.2.2. Budowa lipopolisacharydu

Lipid A jest najbardziej aktywną biologicznie częścią lipopolisacharydu, dlatego znajduje zastosowanie we wczesnej detekcji zapalenia bądź nowotworzenia ze względu na indukcję wrodzonej odpowiedzi immunologicznej poprzez receptory Toll-podobne (TLR). Mimo lizy komórki bakteryjnej, lipid A w krwioobiegu zachowuje właściwości toksyczne i może prowadzić do gorączki, biegunki, a w szczególnie w niekorzystnych okolicznościach do sepsy.

Struktura lipidu A obejmuje rdzeń - dwie cząsteczki glukozyminy połączone wiązaniem  $\beta(1\rightarrow6)$  glikozydowym, fosforylowane w pozycji 1 i 4' oraz acylowane w pozycji 2 i 3 obu cząsteczek (Steimle et al. 2016).

Ze względu na właściwości patogene istotny jest sposób acylacji lipidu A. Heksa-acylowany LPS, zawiera sześć łańcuchów acylowych (o zmiennej długości), połączonych z rdzeniem

disacharydowym wiązaniem estrowym (Rys. 6). Pierwszorzędowe łańcuchy acylowe są bezpośrednio połączone z resztą cukrową, natomiast drugorzędowe łańcuchy cukrowe tworzą wiązania z grupą hydroksylową pierwszorzędowych łańcuchów acylowych. Symetrycznie acylowany lipid A to taki, w którym każda podjednostka glukozaminy związana jest z taką samą ilością łańcuchów acylowych. Model takiego typu występuje u *Escherichia coli*, gdzie niesymetrycznie acetylowany lipid A posiada 4 łańcuchy acylowe związane z pierwszą glukozaminą, a pozostałe dwa - z drugą. Grupy hydroksylowe w pozycji 2 i 3 każdego monosacharydu są zestyfikowane hydroksymirystynianem (C14) pierwszorzędowym łańcuchem acylowym, natomiast dwa drugorzędowe łańcuchy acylowe: laurowy (C12) i mirystynowy (C14) są związane do hydroksymirystynianów w pozycji 2' i 3' (Steimle et al. 2016).



Rysunek 6 Struktura lipidu A z *E. coli* (Steimle et al. 2016)

Struktura lipidu A jest specyficzna dla różnych bakterii, ale ogólny schemat budowy jest konserwatywny. Najważniejsze różnice dotyczą liczby, pozycji i długości łańcuchów acylowych (Raetz et al. 2007). Prototyp lipidu A pochodzący z *E. coli* zawiera 6 takich łańcuchów, ale lipid A u *Helicobacter pylori* jest tetra-acylowany (Mattsby-Baltzer et al. 1992; Moran et al. 1997), zaś u *Acinetobacter* spp. hepta-acylowany (Leone S. et al. 2006).

Rdzeń i O-antygen stanowią hydrofilowy fragment lipopolisacharydu. Podjednostka rdzenia oligosacharydowego zawiera przynajmniej jedną resztę kwasu 3-deoksy-D-manno-oktulozonowego (Kdo), który jest związany z częścią cukrową lipidu A. Rdzeń zapewnia właściwości antygenowe w przypadku braku O-antygeny (w LPS-ach typu R) (Caroff and Karibian 2003). O-

antygen (polisacharyd O-swoisty) zbudowany jest z powtarzających się podjednostek cukrowych i stanowi o zmienności antygenowej lipopolisacharydów typu S-LPS (Raetz and Whitfield 2002).

#### *2.2.2.3. Zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe wykrywanie LPS-u*

Zewnątrzkomórkowe wykrywanie LPS-u opiera się na kompleksie MD-2/TLR4, przy czym aby LPS mógł być rozpoznany przez układ immunologiczny gospodarza musi być uwolniony z błony komórkowej, co następuje pośrednio przez śmierć i dezintegrację komórki bakteryjnej i bezpośrednio przez działanie białka wiążącego LPS (LBP, lipid A-binding protein). W zachowaniu równowagi pomiędzy mikroorganizmami symbiotycznymi a patobiontami bytującymi w jelitach kluczową rolę odgrywają białka LBP, ponieważ transportują cząsteczkę LPSu do receptora CD14, który jest zakotwiczony w błonie bądź występuje w stanie wolnym jako białko rozpuszczalne. Kompleks LPS-CD14 jest następnie przekazywany do MD-2 (Kim H. M. et al. 2007), w formie wolnej lub jako białko związane z monomerem TLR4 za pomocą wiązań wodorowych. Konsekwencją jest powstanie hetero-oligomerycznego kompleksu białkowego złożonego z dwóch cząsteczek MD-2 oraz dwóch TLR4. Te zewnątrzkomórkowe interakcje białko-białko powodują dimeryzację domen TIR zawierających wewnątrzkomórkowe, cytozolowe części receptorów TLR4 prowadząc do pierwotnej odpowiedzi różnicowania mieloidalnego 88 (MyD88) lub aktywując alternatywną ścieżkę TRIF-zależną (od ang. TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ) (Molinaro et al. 2015). Połączenie lipidu A do MD-2 jest kluczowe, ponieważ powoduje zmianę konformacji MD-2, a w konsekwencji powstanie kompleksu z receptorami TLR4, co prowadzi do aktywacji ponad tysiąca genów i promuje wydzielanie cytokin prozapalnych TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  (Ohto et al. 2007).

#### *2.2.2.4. Immunogenność lipopolisacharydów*

Liczba acylowanych łańcuchów w lipidzie A bezpośrednio koreluje ze zdolnością indukcji produkcji cytokin. Heksa-acylowany lipid A promuje najsilniejszą reakcję immunologiczną po związaniu z TLR4 (Munford and Varley 2006), ponieważ pierwsze pięć łańcuchów chowa się w kieszeni cząsteczki adaptorowej dla TLR4-MD-2, natomiast szósty łańcuch pośredniczy w wiązaniu TLR4, co jest warunkiem wstępnym w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej za pośrednictwem TLR4 (Maeshima and Fernandez 2013).

#### *2.2.2.5. Zastosowanie 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych, składników lipidu A, jako markerów chemicznych lipopolisacharydu i bakterii Gram-ujemnych*

Struktura lipidu A, a w szczególności zawartość pierwszo- i drugorzędowych łańcuchów acylowych, czyli 2- i 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (2-OHFAs, 3-OHFAs) jest

charakterystyczna dla bakterii Gram-ujemnych na poziomie rodzin, rodzajów, a nawet gatunków. Techniki GC-MS i UHPLC-MS pozwalają na oznaczenie i kwalifikację hydroksylowych kwasów tłuszczowych pochodzących z LPSu znajdującego się w próbkach środowiskowych i biologicznych (Giannakou et al., 2019; Szponar et al., 2002).

Technika wykorzystująca spektrometrię mas sprzężoną z chromatografią gazową lub cieczą do pomiaru zawartości hydroksylowych kwasów tłuszczowych stosuje 3-OH-C14:0, jako standard głównego hydroksylowanego kwasu tłuszczowego tworzącego LPS *Enterobacteriaceae* (Giannakou et al. 2019; Szponar et al. 2002). Porównanie wykrywalności LPSu za pomocą dwóch technik: testu LAL (ang. Limulus Amebocyte Lysate Test) oraz GC-MS wykazało pozytywnie skorelowane wyniki (Pais de Barros et al. 2015). Zastosowanie techniki GC-MS dostarcza informacji o budowie lipidowej LPSu obecnego w próbkach kału, a ocena markerów LPS-u odzwierciedla jego cechy zarówno w zakresie bakterii Gram-ujemnych i potencjalnego czynnika zapalenia (Tab. 5).

Tabela 5 Rodzaje i skład procentowy 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych w lipopolisacharydach (Ratledge and Wilkinson, 1988)

Rząd	Rodzina	Kwasy 3-hydroksylowe
<b><i>Enterobacteriales</i></b>	<i>Enterobacteriaceae</i>	3-OH nC14:0 (~60%)
	<i>Yersiniaceae</i>	3-OH nC14:0 (~58%)
<b><i>Aeromonadales</i></b>	<i>Aeromonadaceae</i>	3-OH nC14:0 (~50%)
<b><i>Pasteurellales</i></b>	<i>Pasteurellaceae</i>	3-OH nC14:0 (~70%)
<b><i>Neisseriales</i></b>	<i>Neisseriaceae</i>	3-OH nC12:0 (~30%), 3-OH nC10:0 (~30%)
<b><i>Pseudomonadales</i></b>	<i>Pseudomonadaceae</i>	3-OH nC12:0 (~30%), 3-OH nC13:0 (~20%), 3-OH nC14:0 (~25%)
	<i>Moraxellaceae</i>	3-OH nC12:0 (~40%), 3-OH nC14:0 (~30%)
<b><i>Xanthomonadales</i></b>	<i>Xanthomonadaceae</i>	3-OH iC13:0 (~17%), 3-OH nC12:0 (~33%), 3-OH iC11:0 (~13%), 3-OH nC10:0 (~3%)
<b><i>Hyphomicrobiales</i></b>	<i>Rhizobiaceae</i>	3-OH nC18:0 (~10%), 3-OH nC16:0 (~20%), 3-OH nC14:0 (~60%)
	<i>Methylocystaceae</i>	3-OH nC18:0, 3-OH nC16:0
	<i>Methylobacteriaceae</i>	3-OH nC18:0, 3-OH nC14:0
	<i>Brucellaceae</i>	3-OH nC16:0 (~4%), 3-OH nC14:0 (~27%)
<b><i>Methylococcales</i></b>	<i>Methylococcaceae</i>	3-OH nC16:0
<b><i>Rhodospirillales</i></b>	<i>Acetobacteraceae</i>	3-OH nC14:0 (~12%)
	<i>Azospirillaceae</i>	3-OH nC16:0 (~40%),

		3-OH nC14:0 (~40%)
<b>Rhodobacterales</b>	<i>Rhodobacteriaceae</i>	3-OH nC14:0 (~60%), 3-OH nC10:0 (~20%)
<b>Neisseriales</b>	<i>Neisseriaceae</i>	3-OH nC12:0 (~40%), 3-OH nC14:0 (~20%)
<b>Burkholderiales</b>	<i>Alcaligenaceae</i>	3-OH nC14:0 (~35%), 3-OH nC10:0 (~10%)
<b>Actinomycetales</b>	<i>Micrococcaceae</i>	3-OH nC12:0 (~60%), 3-OH nC14:0 (~26%)
<b>Campylobacterales</b>	<i>Campylobacteraceae</i>	3-OH nC14:0 (~50%)
<b>Bdellovibrionales</b>	<i>Bdellovibrionaceae</i>	3-OH nC14:0 (~2%)
<b>Bacteroidales</b>	<i>Bacteroidaceae</i>	3-OH iC15:0 (?), 3-OH nC15:0 (~15%), 3-OH nC16:0 (~15%), 3-OH iC17:0 (~20%), 3-OH nC17:0 (~10%)
<b>Fusobacterales</b>	<i>Fusobacteriaceae</i>	3-OH nC14:0 (~65%), 3-OH nC16:0 (~20%)
<b>Selenomonadales</b>	<i>Selenomonadaceae</i>	3-OH nC13:0 (~30%)
<b>Veillonellales</b>	<i>Veillonellaceae</i>	3-OH nC13:0 (~50%), 3-OH nC15:0 (~5%)
<b>Cytophagales</b>	<i>Cytophagaceae</i>	3-OH iC17:0 (~20%), 3-OH nC16:0 (~15%), 3-OH iC15:0 (~20%)
	<i>Flexibacteraceae</i>	3-OH iC17:0 (~35%), 3-OH nC16:0 (~5%), 3-OH iC15:0 (~15%)
<b>Myxococcales</b>	<i>Myxococcaceae</i>	3-OH iC17:0 (~40%), 3-OH nC16:0 (~5%), 3-OH iC15:0 (~15%)
	<i>Cystobacterineae</i>	3-OH iC17:0 (~30%), 3-OH nC16:0 (~10%), 3-OH iC15:0 (~15%)

### **Oznaczanie stężenia lipopolisacharydu (LPS)**

Stężenie lipopolisacharydu (LPS) za pomocą jego markerów oznaczane jest przez pomiar ilościowy 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OHFAs), które są zakotwiczone w fosforylowanym disacharydzie glukozaminy. Stosowaną techniką jest spektrometria mas sprzężona z ciekłą lub gazowa chromatografią (np. UHPLC-MS, LC-MS) (Giannakou et al. 2019).

W naszych doświadczeniach oznaczaliśmy kwasy 3-hydroksylowe o długości łańcucha 10-18 atomów węgla; całkowitą zawartość LPS w próbce obliczano jako sumę liczby nanomoli poszczególnych 3-OHFAs podzieloną przez 4, co uwzględnia cztery miejsca podstawienia lipidu A przez 3-OHFA, które są obecne w cząsteczce LPS (Rys. 6).

### **2.3. Zaburzenia homeostazy mikrobiomu jelitowego gospodarza i produktów metabolizmu bakterii jelitowych w patomechanizmie wybranych chorób**

Rola mikrobiomu jelitowego jest krytyczna dla utrzymania homeostazy układu immunologicznego u ssaków. Ekosystem jelitowy zmienia się w zależności od czynników środowiskowych, takich jak dieta lub styl życia, a zakłócenia w jego funkcjonowaniu mogą wpływać na ryzyko powstania nowotworu (Akaza 2012). Koncepcja, w której koreluje się występowanie nowotworu ze składem mikrobiomu jest znana i stosowana (Peek and Blaser 2002; Moore and Chang 2010), w związku z tym postuluje się, aby proces karcynogenenny rozpatrywać jako kompleks mikrobiom-(epi)genom-środowisko (Genua et al. 2021). Uważa się, że mikrobiota zasiedlająca ludzki organizm odgrywa kluczową rolę w powstawaniu i progresji nowotworów, może również być użytecznym biomarkerem w ocenie ryzyka powstania nowotworu, w diagnostyce oraz ocenie rokowań (Poore et al. 2020). Jako możliwe podłoże tych interakcji wymienia się dysbiozę inicjującą przewlekłe zapalenie, zahamowanie apoptozy komórek i modulację miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej i środowiska nowotworu (Oliva et al. 2021).

Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, które biorą udział w mechanizmach regulatorowych gospodarza, są swego rodzaju pośrednikami pomiędzy mikrobiomem jelitowym a układem odpornościowym (Geuking et al. 2011). Ważnym zadaniem SCFAs jest utrzymanie równowagi pomiędzy reakcją pro- i przeciwzapalną w jelicie (Maslowski et al. 2009; Hu Zeng and Chi 2015). W rzeczywistości SCFA mają dwa oblicza w zapaleniu i w karcynogenezie, ponieważ z jednej strony działają przeciwzapalnie, lecz w pewnych przypadkach mogą promować rozwój nowotworu (Liu P. et al. 2021). SCFA przekazują sygnał za pomocą receptorów GPR lub poprzez inhibicję deacetylazy histonowej (HDAC); w wielu nowotworach zauważono nieodpowiednią (zwiększoną) ekspresję HDAC m.in. w nowotworach prostaty, jelita grubego i nowotworach piersi (Fraga et al. 2005).

#### **2.3.1. Nowotwór prostaty**

Nowotwór prostaty należy do najczęściej występujących nowotworów u mężczyzn na świecie. Amerykańskie Towarzystwo Onkologiczne odnotowało ok. 250 tysięcy nowych przypadków nowotworu prostaty oraz ponad 34 tysiące zgonów w Stanach Zjednoczonych w 2021 rok. Podaje się, że na świecie w 2018 roku zostało zdiagnozowanych prawie 1,2 miliona nowych przypadków, a niemal 360 tysięcy mężczyzn zmarło z powodu tego nowotworu (Ferlay et al. 2019).

Ryzyko nowotworu prostaty wiąże się z czynnikami genetycznymi oraz środowiskowymi. Istnieją produkty, których spożywanie w istotny sposób zmienia (zmniejsza bądź zwiększa)



prawdopodobieństwo wystąpienia nowotworu prostaty, np. czerwone mięso (Major et al., 2011), produkty mleczne (Aune et al., 2015), jajka (Richman et al. 2012), zielona herbata (Kumar et al., 2015), likopen (Graff et al., 2016), selen (Chan et al., 2016), wapń (Brändstedt et al., 2016) czy olej rybi (Li et al., 2014).

Zapalenie jest niezwykle ważnym elementem w procesie karcynogenezy, szczególnie chroniczne zapalenie uważane jest za wyzwalacz procesu chorobowego, o czym świadczy obecność komórek zapalnych w środowisku prostaty (Strasner and Karin 2015); gruczoł krokowy i drogi moczowe są dogodną niszą dla bakterii odpowiedzialnych za nawracające stany zapalne prowadzące do atrofii zapalnej - zmian znanych jako prekursorowe dla nowotworu prostaty (Cai et al. 2019).

Autorzy badania prowadzonego na mysim modelu nowotworu prostaty skupili się na wyjaśnieniu roli LPSu w patogenezie tej choroby (Jain et al. 2019). Jak wiadomo, LPS promuje niespecyficzny stan prozapalny poprzez wiązanie TLR4, co skutkuje uwalnianiem NF-κB i produkcją cytokin prozapalnych. Zwiększona aktywność ścieżki sygnałowej NF-κB została zaobserwowana w badaniach nad nowotworem prostaty, a LPS i/lub zapalenie indukowane przez LPS mogą prowadzić do częstszych przerzutów w nowotworze prostaty (Javier-DesLoges et al. 2021).

### 2.3.2. Nowotwór jelita grubego

#### 2.3.2.1. *Mikrobiota jelitowa w przebiegu nowotworu jelita grubego*

Przyjęto dwa modele udziału mikrobiomu jelitowego w patogenezie nowotworu jelita grubego: w pierwszym mikrobiota jelitowa jest swego rodzaju „kierowcą” o prokarcynogennych cechach, który może inicjować rozwój nowotworu jelita grubego poprzez indukcję uszkodzeń DNA nabłonka. Mikrobiota „kierowca” może być następnie zastąpiony „pasażerem”, czyli bakteriami, które mogą promować bądź utrudniać karcynogenezę mając przewagę rozwojową w środowisku nowotworu (Tjalsma et al. 2012). Drugi model zakłada, że dysbioza mikrobiomu jelitowego w całości skutkuje odpowiedzią prozapalną i transformacją komórek nabłonka, co może doprowadzić do nowotworu (Gagnière et al. 2016). Najbardziej rozpowszechnionym mikroorganizmem w przebiegu nowotworu jelita grubego jest *Fusobacterium nucleatum*, Gram-ujemna bakteria beztlenowa (Castellarin et al. 2012; Kostic et al. 2012). Podanie antybiotyku myszom z nowotworem jelita grubego skutkowało zmniejszeniem populacji *Fusobacterium*, ale również redukcją proliferacji komórek nowotworowych i mniejszym rozmiarem guza (Bullman et al. 2017). *Fusobacterium nucleatum* został zaproponowany jako biomarker prognostyczny w przypadku nowotworu jelita grubego, ponieważ jego wysoki poziom w tkankach zajętych tym nowotworem koreluje z krótszym czasem przeżycia pacjenta (Oh et al. 2019). Obecność enterotoksycznego LPS u *Bacteroides fragilis* (ETBF), także upatrywanego na marker nowotworu

jelita grubego, jest skorelowana z występowaniem tego nowotworu u pacjentów (Purcell et al. 2017; Dejea et al. 2018).

Oprócz *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis* oraz (niekiedy) *Escherichia coli*, uwagę skupiają *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus* oraz *Parvimonas micra*, występujące w chorobach przyzębia. Wykazano, że bakterie te licznie pojawiają się w środowisku guzów jelita grubego oraz w kale pacjentów, co sugeruje korelację pomiędzy schorzeniami przyzębia a ryzykiem nowotworu jelita grubego (Momen-Heravi et al., 2017; Shah et al., 2018).

Charakterystycznym objawem towarzyszącym nowotworom jelita grubego jest dysfunkcja nabłonka i zwiększona przepuszczalność połączeń zamykających (tight junction), co prowadzi do translokacji bakteryjnej do krwioobiegu i w konsekwencji do bakteriemii, a w skrajnych przypadkach do sepsy. W przebiegu nowotworu jelita grubego utrata białek tworzących połączenia zamykające związana jest również z indukcją procesu nazywanego przejściem nabłonkowo-mezynchemalnym (EMT), w wyniku którego komórki nabłonkowe tracą polarność i adhezję międzykomórkową, a zyskują właściwości migracyjne i inwazyjne (Ahmad et al. 2017). Niektóre bakterie probiotyczne (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Escherichia coli Nissle 1917*) wpływają na integralność jelita poprzez ekspresję białek tworzących połączenia zamykające oraz stymulację produkcji mucyny. W ten sposób proces zapalny jest zahamowany, co pozwala na odbudowę bariery nabłonka (Martín et al., 2019).

U pacjentów z nowotworem jelita grubego odnotowano trzykrotny wzrost liczby bakterii typu *Proteobacteria*, 60-krotny wzrost *Fusobacteria* oraz niewielki (0,5) spadek w ilości *Firmicutes* w porównaniu do osób zdrowych (Yang et al. 2019).

#### 2.3.2.2. Relacja dieta-nowotwór-mikrobiota

W oparciu o dane o niskiej zachorowalności na nowotwór jelita grubego u ludności afrykańskiej, u której wysokobłonnikowa dieta jest standardem, w latach 70-tych XX. wieku powstała hipoteza zakładająca, że wyższe spożycie błonnika pokarmowego chroni przed zachorowaniem na ten typ nowotworu (Song M. et al. 2020). Przez kolejne lata prowadzono wiele badań epidemiologicznych w celu udowodnienia tej tezy, ostatnio jednak na podstawie metaanalizy wyników uzyskanych z 21 eksperymentów stwierdzono, że nie istnieje liniowy związek pomiędzy spożyciem błonnika a ryzykiem zachorowalności na ten typ nowotworu (Clinton et al. 2020). Dyskusja jednak trwa nadal: większość amerykańskich doświadczeń potwierdza brak związku między wspomnianymi wyżej czynnikami (He et al. 2019), natomiast grupa prowadząca „Europejski plan walki z rakiem” (Murphy et al. 2012) potwierdziła związek pomiędzy przyjmowaniem błonnika a zredukowanym ryzykiem zachorowalności na nowotwór jelita

grubego, podkreślając przy tym różnice w źródłach błonnika (zboża *versus* owoce i warzywa).

#### 2.3.2.3. Suplementacja

Znaczne zainteresowanie zdobyła też koncepcja suplementacji błonnikiem, która pozwala zwiększyć poziom *Bifidobacterium* spp. i *Lactobacillus* spp., nie stwierdzono jednak podobnej zależności dla głównych producentów SCFA za wyjątkiem *Roseburia* spp. i *F. prausnitzii* (So et al. 2018). Wydaje się, że suplementacja błonnikiem może być zasadna, tym bardziej, że w wielu badaniach dotyczących nowotworu jelita grubego zauważono niską liczebność bakterii *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* spp. Ponadto wysoki poziom błonnika reguluje odpowiedź immunologiczną (poprzez maślan) oraz występowanie *F. nucleatum*, cenne z punktu widzenia możliwości redukcji efektu karcynogennego poprzez ponowne uzyskanie odpowiedniego „nadzoru immunologicznego” (Mehta et al. 2018). Spożycie zwiększonej ilości węglowodanów złożonych prowadzi do wzrostu ilości bakterii produkujących SCFA, takich jak *Clostridium* i *Roseburia*, rodzina *Lachnospiraceae* czy *F. prausnitzii* (Shah et al. 2018).

#### 2.3.2.4. Rola maślanu w przebiegu nowotworu jelita grubego

Właściwości proapoptotyczne maślanu wykazane w analizach proteomicznych i transkryptomicznych są interesującą obserwacją, szczególnie w aspekcie obniżenia proliferacji i promocji bardziej zróżnicowanego fenotypu w transformowanych komórkach nabłonka jelita grubego (Tan et al., 2008; Xiao et al., 2014).

Komórki nowotworu jelita grubego są silnie glikolityczne (efekt Warburga) i posiadają zdolność adaptacji do wykorzystania maślanu jako źródła energii (Donohoe et al. 2012). Zdolność do metabolizowania zarówno glukozy, jak i maślanu przez komórki nowotworowe jelita grubego jest wspierana poprzez wzrost ekspresji rozpuszczalnych transporterów posiadających wysokie powinowactwo do obu substratów. Są to MCT1, SLC16A1 i GLT typu 1, których stężenie wzrasta w tkankach nowotworu jelita grubego (Koukourakis et al. 2006; Pinheiro et al. 2008). Komórki nowotworowe odporne na proapoptotyczne działanie maślanu, ale posiadające zdolność jego metabolizowania są fenotypowo bardziej agresywne (Serpa et al. 2010).

Mechanizmy działania maślanu na komórki nowotworowe oraz sposób, w jaki następuje indukcja apoptozy przy jego udziale, wykazały niewłaściwą ekspresję HDAC w przypadku wielu nowotworów, m.in. jelita grubego, żołądka, prostaty oraz gruczołu sutkowego (Zhang et al. 2005; Fraga et al. 2005). Wydaje się zatem, że pierwszorzędowym mechanizmem odpowiedzialnym za obniżenie proliferacji komórek nowotworowych w obecności maślanu jest regulacja ekspresji genów poprzez inhibicję aktywności HDAC, w którym maślan za pomocą transportera SCL5A8

sprężonego z Na<sup>+</sup> jest przenoszony do komórek, gdzie następuje inhibicja HDAC, a następnie supresja nowotworu (Ganapathy et al. 2008; Gopal et al. 2007). Warto jednak pamiętać, że SCL5A8 został zidentyfikowany jako supresor nowotworowy w okrężnicy, a jego ekspresja jest wyraźnie wyciszana w nowotworze jelita grubego (Thangaraju et al. 2008). Niższy poziom ekspresji SLC5A8 w komórkach nowotworowych jelita grubego był powiązany ze spadkiem apoptozy tych komórek, ponieważ wymagała ona inhibicji HDAC oraz aktywacji kaskady kaspazowej poprzez maślan (Thangaraju et al. 2008).

Istnieje drugi mechanizm, niezależny od inhibicji HDAC, angażujący receptory GPR. Polega on na regulacji poprzez receptory GPR, w tym GPR43 i GPR109A. Spadek ekspresji GPR43 występuje w nowotworach okrężnicy oraz w przeroście jelita grubego, jak również w początkowych fazach chorób jelita grubego. Na dziewięć badanych linii komórkowych nowotworów jelita grubego tylko w linii HT29 zaobserwowano ekspresję receptora GPR43 (Tang et al. 2011).

Taka dysregulacja dotyczy także ekspresji receptora GPR109A w komórkach nowotworowych jelita grubego (Thangaraju et al. 2009). Wiadomo, że receptor GPR109A jest ekspresjonowany na komórkach epitelialnych jelita i ligandem dla niego jest maślan, tymczasem zarówno u ludzi, jak u myszy z nowotworem jelita grubego, a także w linii komórkowej nowotworu jelita grubego ekspresja GPR109A jest wyciszona. (Greten et al. 2004). Zasadniczo poprzez receptor GPR109A maślan hamuje aktywację NF-κB, przy czym aktywacja tego receptora w komórkach zdrowych nie prowadzi do ich śmierci, kiedy jednak w komórkach nowotworowych jelita grubego GPR109A jest ektopowo ekspresjonowany, prowadzi do ich apoptozy. Taki proces wiąże się z zahamowaniem metylacji DNA, która w komórkach nowotworowych jelita grubego indukuje ekspresję receptorów GPR109A i w konsekwencji apoptozę nowotworowo-specyficzną, stąd zastosowanie w leczeniu maślanu jako ligandu może być skutecznym narzędziem w hamowaniu metylacji DNA i skutecznej walce z nowotworem jelita grubego.

Receptor GPR109A uczestniczy nie tylko w supresji nowotworu, ale również w hamowaniu aktywacji NF-κB w odpowiedzi indukowanej LPSEM (Thangaraju et al. 2009), zatem maślan w komórkach nabłonka jelitowego moduluje zapalenie na drodze redukcji ekspresji IL-8 i zahamowania ekspresji indukowanej syntazy tlenu azotu (Stempelj et al. 2007).

Interwencja prebiotyczna i suplementacja SCFA może być przydatnym narzędziem w zapobieganiu i wspomaganiu leczenia nowotworu jelita grubego, jednak mechanizm działania SCFA wydaje się dwutorowy: w randomizowanych badaniach prowadzonych w celu określenia poziomu produkcji maślanu ze skrobi odpornej u osób zdrowych zauważono interesującą zależność: u większości uczestników badania zanotowano wzrost stężenia maślanu w kale, ale w przypadkach

bardzo wysokiego spożycia skrobi odpornej następował spadek stężenia. Odpowiedź na pytanie o znaczenie maślanu w nowotworze jelita grubego pozostaje zatem otwarta (McOrist et al. 2011).

Nietrawione węglowodany o właściwościach prebiotycznych mogą być elementem strategii modulacji jelitowej flory bakteryjnej w zapobieganiu rozwojowi nowotworu i walce z jego objawami. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe w surowicy mogłyby także spełniać rolę mediatorów w kontroli proliferacji linii nowotworowej (Bindels et al. 2015).

## **2.4. Metody badania mikrobiomu**

Kompleksowe informacje o środowisku mikrobiologicznym jelita dostarczają metody wykorzystujące sekwencjonowanie RNA małej podjednostki rybosomlanej (16S rRNA). Identyfikacja mikroorganizmów pozwala na zastosowanie danych taksonomicznych do oceny zarówno jakościowej, jak i ilościowej różnorodności mikrobioty (Rezasoltani et al. 2020). Do technik, których burzliwy rozwój otworzył nowe możliwości badań należą sekwencjonowanie nowej generacji (NGS), techniki oparte na wykorzystaniu elektroforezy, PCR, hybrydyzacja fluorescencyjnej *in situ* oraz techniki wykorzystujące spektrometrię mas. Wyzwaniem jest ograniczona powtarzalność tych metod, w szczególności technik sekwencjonowania, i nierutynowe opracowywanie bioinformatyczne wyników. Wśród badaczy mikrobiomu istnieje potrzeba stworzenia „złotego standardu” obejmującego kolejne etapy: pobieranie próbek, transport i przechowywanie, następnie protokół oczyszczania bakteryjnego DNA, sekwencjonowanie ampikonu rybosomalnego 16S DNA, amplifikacja regionu zmiennego 16S, rodzaj polimerazy i warunki reakcji PCR oraz poszczególnych wzorców przetwarzania sekwencji *in silico* i eksploracji danych (Zmora et al., 2019).

Bez wątplenia najlepszym materiałem do badań mikrobiomu jelitowego, jego markerów i metabolitów jest kał, ponieważ próbki są łatwe do pobrania, charakteryzują się dużym zagęszczeniem mikrobiologicznym i mogą być analizowane z zastosowaniem różnych technik analitycznych i molekularnych.

### **2.4.1. Metody hodowli bakterii**

Hodowla mikrobiologiczna, najstarsza technika stosowana do oceny mikrobiomu jelitowego, jest stale udoskonalona. Przy zachowaniu odpowiednich warunków możliwe jest uzyskanie wielu taksonów, w tym izolatów o dużych wymaganiach środowiskowych. Metoda posiada jednak wiele ograniczeń, a ogromna grupa mikroorganizmów, o których obecności świadczy baza metagenomowa, nie jest możliwa do wyhodowania w warunkach laboratoryjnych. Badanie złożonych konsorcjów bakteryjnych tą metodą stanowi kolejny problem. Skomplikowane

jest analizowanie biofilmu - mikrobiomu śluzówki, a pomocnym narzędziem są bioreaktory i symulatory, które pozwalają na badanie zarówno konkretnych drobnoustrojów, jak i całej mikrobioty.

Obiecującym podejściem badawczym jest stosowanie urządzeń symulujących pracę jelita - symulatora ludzkiego jelitowego ekosystemu mikrobiologicznego (SHIME), modelu jelita cienkiego i grubego, który zawiera stabilną i funkcjonalną mikrobiotę, np. do badań oddziaływania bakterii z błoną śluzową stosuje się symulator M-SHIME (mucosal SHIME) (Joly et al., 2012).

Zaawansowane metody hodowli posiadają wiele zalet, do których należy obserwacja bezpośrednia drobnoustrojów, ich metabolitów, chemicznych transformacji, i kinetyki, chociaż założone oddziaływania syntroficzne są trudne do odtworzenia, a szczepy w bioreaktorach rzadko przyjmują fizyczną postać biofilmu lub innych struktur mikrobiologicznych, w obecnych warunkach naturalnych.

#### 2.4.2. Metody detekcji i ocenie ilościowej metabolitów niskocząsteczkowych

Analiza metabolitów w próbkach kału dostarcza wielu informacji dotyczących zaburzeń homeostazy mikrobioty jelitowej. Istnieje wiele markerów wskazujących na kondycję mikrobiomu jelitowego np. pH kału, pozwalających ocenić zawartość kwasów tłuszczowych, zaburzone trawienie i wchłanianie węglowodanów oraz wykryć nietolerancję laktozy; obecność toksyn bakteryjnych (np. *Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori*), pozwalających określić przyczynę uciążliwych schorzeń, np. długotrwałych biegunek (Vaira et al. 1999; Bartlett and Gerding 2008) oraz wykrywanie niektórych białek, np. kalprotektyny, w celu monitorowania choroby zapalnej jelit (IBD) (Langhorst et al. 2008).

Ze względu na chemiczną różnorodność niskocząsteczkowych metabolitów bakteryjnych niezbędne jest zastosowanie wszechstronnych technik, w tym chromatografii, spektrometrii mas i NMR. Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS) znakomicie sprawdza się w wykrywaniu lotnych związków organicznych, natomiast NMR i chromatografia ciekła sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS) są odpowiednie dla związków bardzo polarnych i hydrofilowych.

##### 2.4.2.1. *Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)*

NMR charakteryzuje wysoka powtarzalność, niezawodna identyfikacja związku, krótki protokół przygotowywania próbki (bez derywatywacji chemicznej) i możliwość wykrycia związków niejonowych (jak cukry i alkohole) bez niszczenia ich struktury. Wadą tej techniki jest stosunkowo niska czułość w porównaniu do spektrometrii mas (do 1000 razy na poziomie molarnym) (Deda et al. 2015; Cajka and Fiehn 2016).

NMR jest stosowany do detekcji aminokwasów, kwasów karboksylowych, w tym krótko- i średnio-łańcuchowych kwasów tłuszczowych i ich pochodnych, a także do wykrywania cukrów i kwasów żółciowych.

#### 2.4.2.2. *Techniki wykorzystujące spektrometrię mas*

Spektrometria mas ma na celu oznaczenie konkretnych klas metabolitów, np. aminokwasów, lipidów, węglowodanów lub kwasów żółciowych, i służy uzyskaniu profilu metabolicznego, czyli zebraniu informacji o metabolicznym zróżnicowaniu próbki (Melnik et al. 2017). Ukierunkowana analiza pozwala na uzyskanie wyników ilościowych i umożliwia korelację z danymi metagenomowymi z sekwencjonowania NGS, pokazując relację pomiędzy bakteriami i ich metabolitami.

Chromatografia gazowa lub cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas jest powszechnie stosowaną metodą analizy metabolitów bakteryjnych. GC-MS jest metodą z wyboru dla detekcji szerokiego zakresu związków, jak też z powodu wysokiej czułości i relatywnie prostej identyfikacji. Analiza przy użyciu technik chromatograficznych wymaga etapu przygotowania próbki kału poprzez filtrację, wirowanie, destylację próżniową lub rozcieńczenie badanych materiałów i przeprowadzenia w pochodne w zależności od stosowanej detekcji.

Złotym standardem do analizy szczególnie ważnych metabolitów: krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) jest chromatografia gazowa, będąca w zastosowaniu od 1952 roku (Primec et al. 2017).

#### 2.4.3. Metody biologii molekularnej w badaniu mikrobiomu

W ostatnich dwudziestu latach analiza bakteryjnego materiału genetycznego zdominowała badania nad mikrobiomem, a ograniczenia typowe dla metod hodowli bakteryjnych spowodowały radykalne obniżenie kosztów oraz wzrost dostępności technik wykorzystujących sekwencjonowanie nukleotydów na podstawie sekwencji genów 16S rRNA (Tab. 6, Tab. 7).

##### 2.4.3.1. *Seqwencjonowanie typu shotgun i metagenomika (seqwencjonowanie DNA pierwszej generacji)*

Metagenomika stanowi metodę analizy genomu złożonego z ogółu mikroorganizmów zasiedlających dany mikrobiom. Metoda polega na sekwencjonowaniu wszystkich fragmentów DNA w próbce, co obrazuje skład i zróżnicowanie mikrobiomu jelitowego (Sekirov et al. 2010; Wang W-L. et al. 2015). Zaletą tej techniki jest możliwość identyfikacji nowych (funkcjonalnych) genów, z drugiej strony jednak nie pozwala uzyskać profilu ich ekspresji ani badać warunków

regulacji procesów zachodzących w mikrobiomie (Teeling and Glockner 2012).

Sekwencjonowanie całego genomu metodą shotgun jest narzędziem często stosowanym dla charakterystyki metagenomicznej mikrobiomu jelitowego. Dane uzyskane przy użyciu tej techniki zawierają informacje na poziomie genów, które mogą być zachętą do analizy milionów bakteryjnych mikrobiomów. Technika ta polega na losowej fragmentacji DNA, sekwencjonowaniu uzyskanych fragmentów DNA i rekonstrukcji nakładających się fragmentów w celu uzyskania ciągłej sekwencji. Metoda jest nastawiona na zobrazowanie genetycznej różnorodności mikrobioty jelitowej oraz jej składu taksonomicznego i pozwala na analizę mikrobiomu z chorobami w odniesieniu do innych czynników np. zmienne środowisko, choroby itp. (De Vos 2009; Ranjan et al. 2016).

#### 2.4.3.2. *Sekwencjonowanie Następnej Generacji (NGS)*

Podstawową zasadą techniki NGS jest prowadzenie reakcji sekwencjonowania w jednym czasie na wielu fragmentach, uzyskując nakładające i pokrywające się odcinki nukleotydowe, które w procesie analizy bioinformatycznej składają się do jednej, wypadkowej sekwencji. Bakteryjne 16S rRNA stanowi na ogół wystarczający marker taksonomiczny, ponieważ zawiera regiony konserwatywne oraz zmienne, charakterystyczne dla danych mikroorganizmów. Pierwszym etapem jest uzyskanie profilu amplikonów, które następnie są sekwencjonowane i analizowane bioinformatycznie w celu uzyskania danych o relatywnym zróżnicowaniu taksonomicznym mikrobioty znajdującej się w badanej próbce. W oparciu o podobieństwo sekwencji nukleotydowych, dane są grupowane w odpowiednich operacyjnych jednostkach taksonomicznych (ang. OTU - operational taxonomic unit). OTU są porównywane do sekwencji zdeponowanych w bazach danych, co pozwala identyfikować mikroorganizmy obecne w mikrobiomie.

Wykorzystanie platformy NGS w sekwencjonowaniu 16S rRNA zwiększyło możliwości identyfikacji członków bakteryjnej społeczności o kilka rzędów w stosunku do metody Sangera. Poprzez sekwencjonowanie krótszego amplikonu uzyskuje się znacznie większe pokrycie próbki, a także znacznie obniża koszty analizy.

Do największych zalet sekwencjonowania 16S rRNA należy dostępność wielu narzędzi bioinformatycznych, pozwalających na opracowanie uzyskanych danych. Programy te są bezpłatne i stosunkowo łatwe w obsłudze, m.in. QIIME (Quantitative Insights into Microbial Ecology), mothur i USEARCH (ultra-fast sequence analysis).

Z powodu krótszych odczytów uzyskanych z protokołów NGS, (a szczególnie na platformie Illumina), bakteryjna klasyfikacja wykorzystująca sekwencjonowanie 16S rRNA niekiedy nie pozwala na identyfikację taksonomiczną ponad poziom rodzaju, pewnym dylematem jest także



wybór regionów hiperzmiennych V1-V9, składających się na gen 16S rRNA, które mają być brane pod uwagę w analizie NGS. Preferowanymi zestawami regionów do analizy NGS są: V1/V2/V4, V2/V3/V4, V2/V4 i V2/V3, ale systematyczne badanie efektywności pozwoliło ustalić, że region V4/V5 generuje najmniejszą ilość błędów wynikających ze złej amplifikacji w porównaniu do standardowo wykorzystywanych regionów V3/V4. Okazało się, że fragmenty ampliconu PCR tak krótkie jak 82 pz, skierowane na region zmienny 16S rDNA V5, mają wystarczającą długość do klasyfikacji bakterii na poziomie typu, a dłuższy fragment ampliconu o wielkości 100 pz w połączeniu z odpowiednio zaprojektowanym starterem i dalszą analizą dawał w rezultacie te same informacje o klastrach, co krótsza sekwencja 16S rRNA.

Obniżające się koszty tej techniki, jej duża czułość i przepustowość powodują, że jest obecnie najczęściej stosowaną metodą badania mikrobiomu jelitowego.

Tabela 6 Techniki konwencjonalnej analizy mikrobiomu (Rezasoltani et al. 2020)

technika	opis	zalety	wady
<b>hodowla bakteryjna</b>	hodowla wybranych bakterii na podłożach selektywnych	niedroga metoda półilościowa	wyhodowana została niewielka część mikrobiomu jelitowego, metoda pracochłonna
<b>ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (qPCR)</b>	kwantyfikacja 16S rRNA. mieszanina reakcyjna zawiera związek, który fluoryzuje, gdy wiąże się z dwuniciowym DNA	szybka charakterystyka filogenetyczna, metoda ilościowa	zafałszowania PCR (PCR bias), nie charakteryzuje nieznanymi gatunków
<b>elektroforeza w gradience czynnika denaturującego (DGGE)</b>	żelowa separacja amlikonów 16S rRNA przy zastosowaniu czynnika denaturującego/temperatury	półilościowa, można zastosować prądkę/pasma do dalszej analizy, szybka	zafałszowania PCR (PCR bias), brak charakterystyki filogenetycznej
<b>polimorfizm długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych (t-RFLP)</b>	startery znakowane fluorescencyjnie oznacza się ilościowo, następnie stosuje się enzymy restrykcyjne w celu strawienia amplikonu 16S rRNA. Strawione fragmenty rozdzielane są przez elektroforezę żelową	niedroga, szybka, metoda półilościowa	zafałszowania PCR (PCR bias), brak charakterystyki filogenetycznej, niska rozdzielczość
<b>fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH)</b>	znakowane fluorescencyjnie sondy oligonukleotydowe hybrydują komplementarnie z docelowymi sekwencjami 16S rRNA. Gdy zachodzi hybrydyzacja, fluorescencję można oznaczyć za pomocą cytometrii przepływowej.	brak zafałszowań PCR (PCR bias), charakterystyka filogenetyczna, metoda półilościowa	związana z sekwencjami sond – nie charakteryzuje nieznanymi gatunków
<b>sekwencjonowanie genu 16S rRNA oparte na klonowaniu</b>	sekwencjonowanie metodą Sangera, elektroforeza kapilarna, klonowanie pełnej długości amplikonu 16S rRNA	charakterystyka filogenetyczna, metoda ilościowa	droga, zafałszowania PCR (PCR bias), pracochłonna, zafałszowania klonowania (cloning bias)
<b>bezpośrednie sekwencjonowanie amplikonów 16S rRNA</b>	duże równoległe sekwencjonowanie frgmentów amplikonów 16S rRNA	szybka, charakterystyka filogenetyczna, możliwość identyfikacji nieznanymi bakterii	zafałszowania PCR (PCR bias), droga, pracochłonna
<b>sekwencjonowanie shotgun</b>	masowe sekwencjonowanie równoległe całego genomu		droga, analiza danych jest bardzo złożona

Tabela 7 Techniki "omiczne" stosowane w analizie mikrobiomu (Rezasoltani et al. 2020)

	opis	zalety	wady
<b>meta-genomika</b>	badanie genomów mikroflory jelitowej profilowane w wysokiej rozdzielczości, charakterystyka struktur genów mikroorganizmów nie poddających się hodowli	obszerne dane sekwencyjne, dane dotyczące funkcjonalnego wkładu mikrobioty, niepotrzebne do klonowania określonych genów	nie jest generowana funkcja mikroflory jelitowej
<b>meta-transkryptomika</b>	sekwencjonowanie mRNA/cDNA w celu profilowania ekspresji genów w wysokiej rozdzielczości, różnicowanie ekspresji genów drobnoustrojów w różnych sytuacjach fizjologicznych/środowiskowych	wysoka przepustowość, wysoka czułość, metoda kwantyfikacji, charakterystyka znanej i nieznanej mikroflory jelitowej, ocena interakcji drobnoustrojów	brak unikalnego protokołu, niska stabilność drobnoustrojowego mRNA, reprezentatywnie nieznanie/potrzebne wielokrotne etapy oczyszczania
<b>meta-proteomika</b>	białka/peptydy są identyfikowane w celu monitorowania i profilowania białek w wysokiej rozdzielczości, zróżnicowanej produkcji białek drobnoustrojowych w różnych warunkach fizjologicznych i środowiskowych	zlokalizowanie i monitorowanie nowych funkcjonalnych genów	brak unikalnego protokołu, nieznanie białka w bazach danych, heterogeniczna stabilność
<b>metabolomika</b>	metabolomy są analizowane pod kątem profilowania metabolicznego drobnoustrojów gospodarza	szybka i łatwa analiza małej ilości próbki, w tym kału/surowicy/moczu, efektywna czasowo, informacja o wpływie mikroflory jelitowej na zdrowie i choroby	brak uniwersalnego protokołu, metabolity nieznanie w bazach danych, szczegółowa charakterystyka związku jest pracochłonna, występuje kombinacja cząsteczek gospodarza i bakterii

### **3. Cel pracy**

Celem pracy doktorskiej było wykazanie interakcji kluczowych metabolitów bakterii jelitowych – krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) i lipopolisacharydu - stymulatora procesów zapalnych oraz znaczenia diety wysokobłonnikowej dla tych interakcji w odniesieniu do zmian zachodzących w mikrobiocie jelitowej w przebiegu procesu nowotworowego u myszy.

Cel pracy realizowany był z wykorzystaniem chemicznych markerów endotoksyny i bakterii Gram-ujemnych jako ważnego wyznacznika destabilizacji homeostazy mikrobiomu jelitowego, które wspólnie z markerami metabolizmu bakteryjnego – krótkołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi oraz sekwencjonowaniem DNA stanowić mogą uniwersalną platformę laboratoryjną do badań translacyjnych mikrobiomu jelitowego na różnych modelach doświadczalnych.

## **4. Materiały i metody**

### **4.1. Zwierzęta doświadczalne**

W modelu nowotworu prostaty wykorzystano samce myszy C57BL6/J/cmdb (8-12 tygodni); do modelu nowotworu jelita grubego użyte zostały samice myszy C57BL6/J/cmdb (6-9 tygodni). Zwierzęta pozyskano z Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Uzyskano zgody Komisji Etycznej: 14/2014 oraz 04/2016 i 02/2018 (Lokalna Komisja Etyczna do spraw doświadczeń na zwierzętach we Wrocławiu).

### **4.2. Linie komórkowe**

W mysim modelu prostaty wykorzystano linie nowotworowe pochodzące z kolekcji ATCC: TRAMP-C1 (CRL-2730) oraz TRAMP-C2 (CRL-2731). Hodowle prowadzono na podłożu Dulbecco (Corning) z dodatkiem 5% FBS, L-glutaminy, surowicy, insuliny, trans-dehydroandrosteronu i antybiotyków (Foster et al. 1997).

W mysim modelu nowotworu jelita grubego wykorzystano dwie linie nowotworowe: podstawową MC38/0 oraz znakowaną MC38/EGFP (Green Fluorescent Protein). Linie komórkowe pochodziły z kolekcji IITD PAN, hodowle prowadzono na podłożu RPMI 1640 (Gibco) z dodatkiem 5% FBS (Sigma). Linie nowotworowe MC38 otrzymano w wyniku naprzemiennych pasażów *in vivo/in vitro*. Wyprowadzony nowotwór okrężnicy mysiej MC38 jest gruczolakorakiem stopnia III, który został chemicznie wywołany u samicy myszy C57BL/6 w 1975 r. przez Corbett i wsp. i od tego czasu stosowany jest jako przeszczepialny model mysiego nowotworu (Corbett et al. 1975; Pajtasz-Piasecka et al. 2004).

### **4.3. Pasza**

Zwierzęta otrzymywały paszę AIN-93G dla gryzoni (ZooLab) o składzie zamieszczonym w tabeli 8 (skład rekomendowany dla gryzoni przez Amerykański Instytut Żywienia). Paszę standardową lub wysokobłonnikową wprowadzono 30 dni przed rozpoczęciem właściwego eksperymentu. Profil żywieniowy obejmował różne składniki, w tym białka, tłuszcze, węglowodany, minerały i witaminy w stężeniach odpowiednio dobranych dla prawidłowego funkcjonowania gryzoni. Jako źródło błonnika w eksperymentach zastosowano  $\alpha$ -celulozę i skrobię ziemniaczaną.

Tabela 8 Składniki żywieniowe w paszy standardowej i ze zwiększoną zawartością błonnika (ZooLab)

	AIN-93G [%]	AIN-93G+błonnik [%]
skrobia kukurydziana	39,7486	24,7486
kazeina (>85% białka)	20,0	20,0
maltodekstryna	13,2	13,2
sacharoza	10,0	10,0
olej sojowy	7,0	7,0
mieszanka mineralna (AIN-93g-MX)	3,5	3,5
witamina mix (AIN-93-VX)	1,0	1,0
L-cystyna	0,3	0,3
wodorowinian cholinyl	0,25	0,25
<i>tert</i> -butylohydrochinon (TBHQ)	0,0014	0,0014
<b>α-celuloza / skrobia ziemniaczana (BŁONNIK)</b>	<b>5,0</b>	<b>20,0</b>
<b>zawartość węglowodanów złożonych</b>	<b>44,7486</b>	<b>44,7486</b>

#### 4.4. Modele doświadczalne

##### 4.4.1. Model nowotworu prostaty myszy

Do przeszczepiania komórek nowotworowych zastosowano zawiesinę komórek pochodzących z hodowli *in vitro*. Komórki w objętości 0,05 ml zawieszono w soli fizjologicznej wszczepiano ortotopowo myszom szczepu C57BL/6 w ilości  $2 \times 10^6$  komórek/mysz. Przed zabiegiem myszy znieczulono przy użyciu buprenorfiny oraz izofuranu. Miejsce nacięcia dezynfekowano jodyną, nacinano skalpelem, a komórki wszczepiano w gruczoł krokowy przy użyciu igły 0,3 x 1,3 mm, po czym zakładano szwy. Stan zdrowia myszy kontrolowano codziennie, pomiary wielkości guza dokonywano przy użyciu USG raz w tygodniu. Myszy z grupy kontrolnej poddano identycznemu zabiegowi operacyjnemu, jednak zamiast komórek myszom do prostaty podano roztwór soli fizjologicznej (Rys. 7).

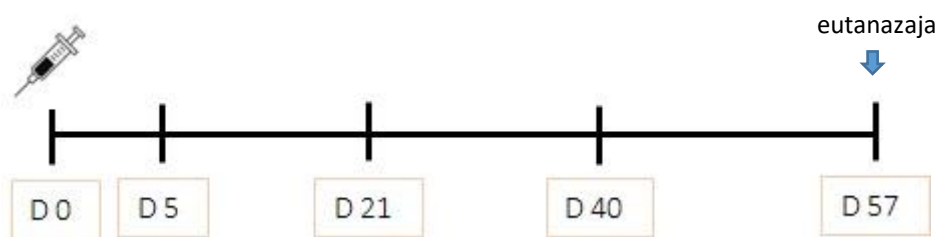
Eksperymenty były prowadzone w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej IITD PAN.

W eksperymencie badano trzy grupy myszy:

- grupa kontrolna – **KONTROLA**
- grupa z wszczepionymi komórkami TRAMP-C1 – **TRAMP-C1**
- grupa z wszczepionymi komórkami TRAMP-C2 – **TRAMP-C2**

Grupa kontrolna składała się z 5 osobników, natomiast grupy badane z 7-10 osobników. Próbkę kału analizowano za pomocą: a. hodowli bezpośredniej z identyfikacją z zastosowaniem spektrometrii MALDI-TOF, b. analizy SCFAs z zastosowaniem HPLC z detekcją UV/Vis oraz c. analizy 3-OH FAs z zastosowaniem GC-MS. Materiał pobierano kolejno od podania komórek hodowlanych

0., 5., 21., 40. i 57. dniu.



Rysunek 7 Schemat eksperymentu dla modelu nowotworu prostaty

#### 4.4.2. Model nowotworów jelita grubego myszy MC38

##### 4.4.2.1. Model podskórny MC38/EGFP

Do przeszczepiania komórek nowotworowych MC38/EGFP drogą podskórną zastosowano zawiesinę pochodzącą z hodowli *in vitro*. Komórki w objętości 0,2 ml były wstrzyknięte pod skórę prawego boku ( $5 \times 10^6$  komórek MC38/EGFP/200  $\mu$ l soli fizjologicznej strzykawką z igłą 0,5x25 mm).

W doświadczeniu wykorzystano dwie grupy myszy otrzymujących paszę AIN-93G:

- grupa I utrzymywana na diecie standardowej, z 5%-zawartością  $\alpha$ -celulozy
- grupa II na diecie wysokobłonnikowej, z 20%-zawartością  $\alpha$ -celulozy.

Modyfikację wprowadzono w podstawowej paszy dla myszy AIN-93G (ZooLab) o składzie zamieszczonym w tabeli 8. Pasza została wprowadzona jako jedyna karma 30 dni przed rozpoczęciem właściwego eksperymentu (Rys. 8).

64 osobniki (16 osobników w grupie) myszy szczepu C57BL6/J/cmdb (samice 6-9 tygodniowe, masa ciała 20-25g, pozyskane z Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku) podzielono na grupy:

- grupa kontrolna (**K**) na diecie standardowej (**DS**) (5%  $\alpha$ -celulozy) – **K-DS**
- grupa kontrolna (**K**) na diecie wysokobłonnikowej (**DW**) (20%  $\alpha$ -celulozy) – **K-DW**
- grupa z podanymi podskórnie (**P**) komórkami MC38/EGFP na diecie standardowej (**DS**) (5%  $\alpha$ -celulozy) – **MC38/P-DS**
- grupa z podanymi podskórnie (**P**) komórkami MC38/EGFP na diecie wysokobłonnikowej (**DW**) (20%  $\alpha$ -celulozy) – **MC38/P-DW**

Próbki kału oraz surowicy poddano testom: i. bakteryjnej hodowli bezpośredniej z identyfikacją proteomiczną (spektrometria MALDI-TOF), ii. analizie SCFA (HPLC z detekcją UV/Vis), iii. analizie markerów 3-OHFAs (GC-MS) oraz iv. sekwencjonowaniu NGS.

Materiał pobierano kolejno: w dniu podania komórek nowotworowych (dzień 0.) oraz w 15.,

30. i 45. dniu eksperymentu.



Rysunek 8 Schemat eksperymentu dla modelu podskórnego nowotworu jelita grubego MC38/EGFP

#### 4.4.2.2. Modele podskórny (P) i dojelitowy (DJ) MC38/0

Do przeszczepienia komórek nowotworowych drogą podskórną zastosowano zawiesinę pochodzącą z hodowli *in vitro*. Komórki zawieszono w soli fizjologicznej podawane były pod skórę prawego boku ( $1 \times 10^6$  komórek MC38/0 w 200  $\mu$ l soli fizjologicznej, strzykawką z igłą 0,5x25 mm).

W celu przeprowadzenia przeszczepu ortotopowego (dojelitowego) podskórny guz MC38/0 o objętości ok. 200 mm<sup>3</sup> został wypreparowany z myszy (wcześniej poddanej eutanazji). Guz został umieszczony na szklanej szalce w płynie Hanksa (PChO, IITD PAN) i za pomocą sterylnej skalpela podzielony na fragmenty wielkości 2-3 mm. Przygotowane skrawki zostały wszyte w ściany jelita ślepego.

W badaniu myszy które otrzymywały paszę o różnej zawartości błonnika; w badaniach wykorzystaliśmy skrobię oporną typu 2, czyli surową skrobię ziemniaczaną, w znacznym stopniu odporną na trawienie przez amylazy ssaków. Jedna grupa otrzymywała paszę standardową z 5% zawartością skrobi ziemniaczanej, druga grupę paszę wysokobłonnikową z 20% zawartością skrobi ziemniaczanej. Modyfikację wprowadzono w paszy dla gryzoni AIN-93G (ZooLab) o składzie zamieszczonym w tabeli 8. Odpowiednie żywienie wprowadzono 30 dni przed rozpoczęciem właściwego eksperymentu (Rys. 9, Rys. 10).

95 osobników (15 osobników w grupie) myszy C57BL6/J/cmdb samice (6-9 tygodni, masa ciała 20-25 g, Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku) podzielono na grupy:

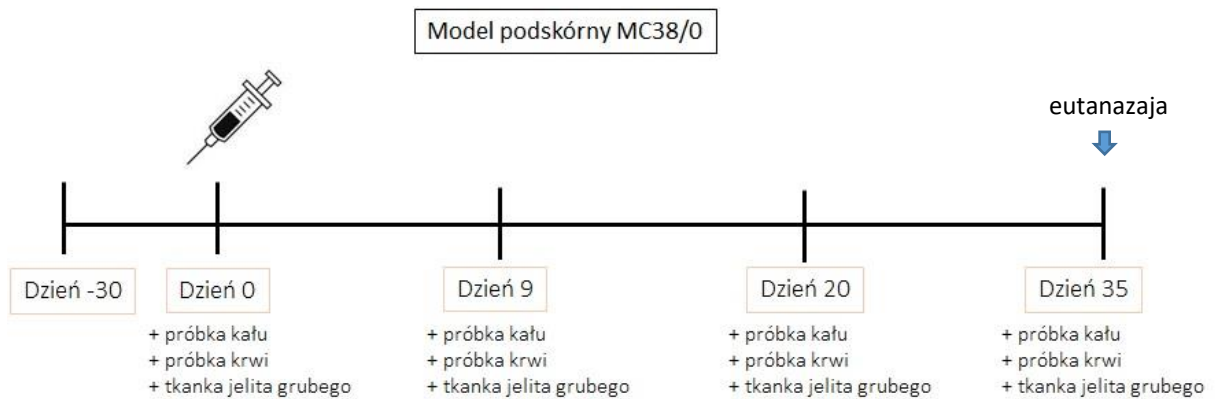
- grupa kontrola (K) na diecie standardowej (DS) (5% skrobi ziemniaczanej) – **K-DS**
- grupa kontrola (K) na diecie wysokobłonnikowej (DW) (20% skrobi ziemniaczanej) – **K-DW**
- grupa z podanymi podskórnie (P) komórkami MC38/0 na diecie standardowej (DS) (5% skrobi ziemniaczanej) – **MC38/P-DS**
- grupa z podanymi podskórnie (P) komórkami MC38/0 na diecie wysokobłonnikowej



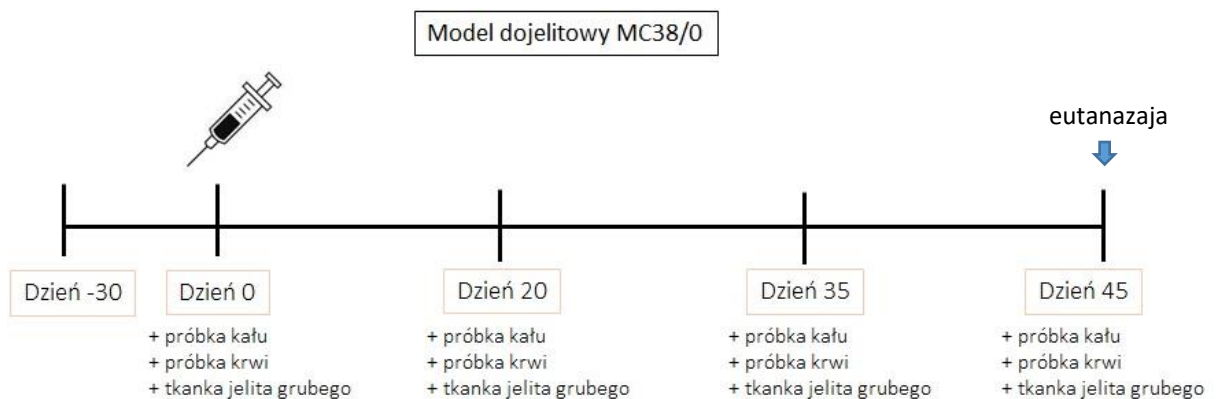
(DW) (20% skrobi ziemniaczanej) – **MC38/P-DW**

- grupa z wszczytymi dojelitowo (DJ) guzami nowotworowymi MC38/0 na diecie standardowej (DS) (5% skrobi ziemniaczanej) – **MC38/DJ-DS**
- grupa z wszczytymi dojelitowo (DJ) guzami nowotworowymi MC38/0 na diecie wysokobłonnikowej (DW) (20% skrobi ziemniaczanej) – **MC38/DJ-DW**.

Próbki kału oraz surowicy poddano testom: i. analizie SCFA (HPLC z detekcją UV/Vis), ii. analizie markerów 3-OHFAs (GC-MS) oraz iii. sekwencjonowaniu NGS. W próbkach tkanek jelita grubego oznaczano poziom receptorów wiążących krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe: GRP43 oraz GPR109A, oraz deacetylowanych produktów. W modelu podskórnym materiał pobierano w dniu podania komórek nowotworowych (dzień 0.) oraz w 9., 20. i 35. dniu eksperymentu. W modelu dojelitowym materiał pobierano w dniu podania tkanki nowotworowej (dzień 0.) oraz w 20., 35. i 45. dniu eksperymentu.



Rysunek 9 Schemat eksperymentu dla modelu podskórnego nowotworu jelita grubego MC38/0



Rysunek 10 Schemat eksperymentu dla modelu dojelitowego nowotworu jelita grubego MC38/0

#### 4.5. Izolacja i hodowla bakterii z kału myszy

Próbki kału sterylnie umieszczono w 5 ml bulionie cukrowym (PChO, IITD) były

transportowane w warunkach tlenowych i beztlenowych. Hodowlę i izolację prowadzono pod komorą laminarną II klasy bezpieczeństwa do hodowli bakteryjnych (Safeflow 1.2, Bioair). Po rozdrobnieniu materiał zawieszono w płynie hodowlanym za pomocą ezy i wortexu (Vortex-Genie™ 2, Scientific Industries SI™), po czym wykonano posiewy redukcyjne na różnych podłożach mikrobiologicznych (Tab. 9).

Bakterie poddano inkubacji w warunkach tlenowych, beztlenowych i mikroaerofilnych. Hodowle beztlenowe przeprowadzono w pojemnikach GasPak Jars (BD BBL) z szaszkami GasPak EZ (Anaerobic Container System). Hodowle mikroaerofilne prowadzono w inkubatorze O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, MCO-19M (Panasonic).

*Tabela 9 Warunki inkubacji podłoży mikrobiologicznych*

Warunki tlenowe O <sub>2</sub> 48 godz., 37°C	Warunki mikroaerofilne 5% O <sub>2</sub> , 10% CO <sub>2</sub> , 85% N <sub>2</sub> 48 godz., 37°C	Warunki beztlenowe < 1-0.5% O <sub>2</sub> 7 dni, 37°C
agar z krwią	agar z krwią	agar z krwią
agar macconkeya	agar macconkeya	x
agar SS	agar ss	x
x	agar MRS	agar MRS
x	agar tioglikolanowy z soją (TG+S)	agar tioglikolanowy z soją (TG+S)
x	x	agar Wilson-Blaira

Bakterie identyfikowano za pomocą analizy widm proteomicznych w aparacie MALDI-TOF MS, z identyfikatorem bakterii MALDI Biotyper (Bruker).

#### **4.6. Identyfikacja bakterii z zastosowaniem spektrometrii mas MALDI-TOF MS**

Identyfikację mikroorganizmów przeprowadzono za pomocą identyfikacji widma proteomicznego MS (MALDI-TOF MS):

Metoda bezpośrednia - przygotowanie próbki polegało na bezpośrednim przeniesieniu z podłoża agarowego pojedynczej kolonii bakteryjnej na płytkę do analizy MALDI (384-punktowa płytką MTP 384 target plate polished steel TF Bruker). Próbę przykryto matrycą (1µl) do pomiarów na MALDI Biotyper (kwas α-cyjano-4-hydroksycynamonowy (HCCA), 476870-2G, Sigma-Aldrich).

W metodzie pośredniej pierwszym etapem było przygotowanie roztworu matrycy kwasu α-cyjano-4-hydroksycynamonowego (HCCA, 10 mg/ml mieszaniny (475 µl wody klasy MiliQ, 500 µl acetonitrylu (HPLC grade)) i kwasu trifluoroctowego (25 µl) (Sigma-Aldrich), który wymieszano

przy użyciu wortexu (Vortex-Genie™ 2, Scientific Industries SI™). Materiał był ekstrahowany przy użyciu kwasu mrówkowego (Sigma-Aldrich): porcję komórek- pojedynczą kolonię przeniesiono za pomocą ezy do 300 µl wody klasy MiliQ i wytrząsano na wortexie przez około 1 min., po czym dodano 900 µl etanolu (bezwodny do HPLC, WITKO) i ponownie wymieszano około 1 min. Komórki wirowano (Centrifuge MiniSpin®, Eppendorf) w 13 000 rpm przez 2min., supernatant usunięto, dodano 1 ml etanolu i powtórzono ekstrakcję. Po usunięciu supernatantu osad komórek zawieszono w 50µl 70% kwasu mrówkowego i dodano 50µl acetonitrylu, wymieszano za pomocą pipety. Materiał wirowano w 13000 rpm przez 2 min. Przeniesiono 1µl supernatantu na płytkę do MALDI (MTP 384 target plate polished steel TF, Bruker) i pozostawiono do wyschnięcia, po czym naniesiono 1µl matrycy.

#### Analiza MALDI-TOF MS

Analizy proteomiczne bakterii przeprowadzono z zastosowaniem aparatu oraz oprogramowania i baz danych Biotyper 3.0 (Bruker). Przed pomiarem przeprowadzono kalibrację aparatu rekomendowaną przez producenta.

Widma proteomiczne rejestrowano w liniowym trybie dodatnim przy częstotliwości lasera 200 Hz, w zakresie mas od 2000 do 20 000 Da.

Sumaryczne widma z około tysiąca uderzeń laserowych uzyskano w seriach po dwieście z pięciu pozycji punktowych, przy 40% intensywności lasera. W analizie zastosowano kryteria identyfikacji sformułowane przez producenta. Wartości punktowe:

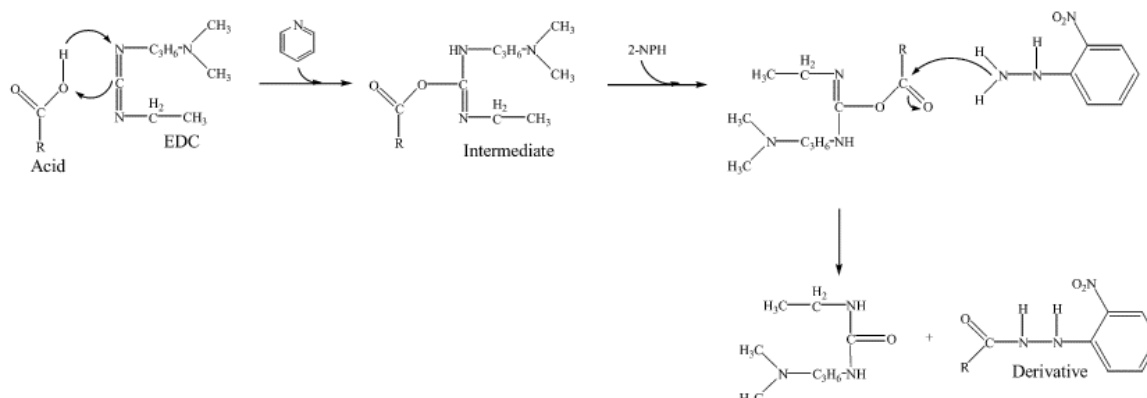
- poniżej 1,699 - identyfikacja niewiarygodna;
- od 1,700 do 1,999; prawdopodobna identyfikacja rodzaju;
- od 2,000 do 2,299; wiarygodna identyfikacja rodzaju, prawdopodobna identyfikacja gatunku;
- od 2,300 do 3,000; wysoce prawdopodobna identyfikacja gatunków.

#### **4.7. Oznaczanie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej z detektorem UV/Vis (HPLC UV/Vis)**

Świeżo pobrane, zważone próbki kału (0,2-0,5 g), zawieszono w 70% etanolu (HPLC) rozdrobniono szklaną bagietką i wytrząsano przez minutę. następnie wirowano w 4000 obr/min przez 5 minut (Heraeus Biofuge Stratos). Wolne kwasy tłuszczowe obecne w próbce przeprowadzono w pochodne hydrazynowe (Rys. 11).

Do 200-500 µl supernatantu dodawano 50 µl 200 mM standardu wewnętrznego (kwas 2-etylomastowy, Sigma-Aldrich) w 50% metanolu (metanol do HPLC, POCH), 300 µl 3% v/v pirydyny (SeccoSolv, Supelco, Merck) w etanolu (etanol bezwodny do HPLC, WITKO) oraz 300 µl 250 mM

chlorowodorku N-(3-dimetyloaminopropylo)-N'-etylokarbodiimidu w etanolu (1-EDC, Sigma-Aldrich) i 300  $\mu$ l 20 mM chlorowodorku 2-nitrofenylohydrazyny w etanolu (2-NPH, Sigma-Aldrich).



*Rysunek 11 Schemat reakcji derywatywacji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych do pochodnych hydrazynowych*

Próbki inkubowano w 60°C przez 20 minut (AccuBlock DigitalDry Bath, Labnet) po czym zatrzymano reakcję poprzez dodanie 200  $\mu$ l 15% NaOH (POCH) w metanolu (80:20 v/v). Próbki inkubowano ponownie w 60°C przez 20 minut, po czym schłodzono do temperatury pokojowej.

Kolejnym etapem była ekstrakcja w 2 ml 0,5 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) i z 2 ml eteru dietylowego (Sigma-Aldrich) przez 3 minuty. Próbki wirowano w 4000 obr/min przez 5 minut (Heraeus Biofuge Stratos), warstwę organiczną (górną warstwę eterową) przeniesiono do nowych próbek i ekstrakcję powtórzono.

Do połączonych supernatantów dodano 2 ml wody MilliQ, wytrząsano przez 3 minuty, po czym odwirowano w 4000 obr/min przez 5 minut. Warstwę organiczną (górną warstwę eterową) przeniesiono do nowych próbek i wysuszono pod azotem. Uzyskane pochodne po rozpuszczeniu w 100  $\mu$ l metanolu nanoszono na kolumnę (20  $\mu$ l).

Analiza pochodnych hydrazynowych SCFA za pomocą aparatu HPLC Waters 1525 z detektorem Waters 2489 UV/Vis:

*Kolumna C18:* Kolumna Gemini-NX 5U C18 110A dł: 250, średnica wew.:4,6 mm (Phenomenex)

*Aparat HPLC Waters HPLC system (Waters 1525)*

*Temperatura kolumny:* 50°C

*Eluent:* acetonitryl – metanol – woda (30: 16 : 54 v/v/v), pH=4,5, 1ml/min

*Detektor:* UV/Vis ( $\lambda$ =400 nm) (Waters 2489)

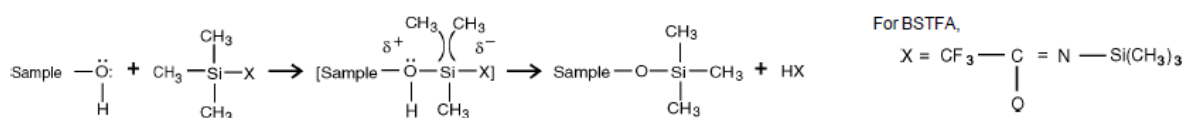
#### 4.8. Oznaczanie 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OHFAs), markerów lipopolisacharydu (LPS) z zastosowaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS)

Badany materiał: surowicę (100-200  $\mu$ l) lub kał (0,2-0,5 g) poddano metanolizie w celu uzyskania estrów metylowych kwasów tłuszczowych. Do badanego materiału dodawano 2 ml 2M metanolowego roztworu HCl (22 ml metanolu na lodzie + kroplami 5 ml chlorku acetylu (Sigma-Aldrich) i poddawano metanolizie w 85°C przez 18 godzin (AccuBlock DigitalDry Bath, Labnet), a następnie schłodzono do temperatury pokojowej. Dodano standard wewnętrzny - 10  $\mu$ g estru metylowego deuterowanego kwasu 3-hydroksytetradekanowego (deu 3-OHC14:0, Sigma-Aldrich).

Ekstrahowano estry kwasów tłuszczowych przez dodanie do próbek 2 ml wody miliQ i 2ml n-heksanu (Supelco) przez 3 min, wirowano w 4000 obr/min przez 5 min (Heraeus Biofuge Stratos). Fazę organiczną (górną) przeniesiono do nowych próbek, ekstrakcję powtórzono. Połączone fazy organiczne osuszono pod azotem (Rys. 12).

Pochodne hydroksylowanych kwasów tłuszczowych odzyskano za pomocą ekstrakcji fazy stałej (SPE): w pierwszym etapie kondycjonowano kolumny SPE (Strata® SI-1 Silica (55  $\mu$ m, 70 Å), 100 mg/1 mL, Phenomenex) przez naniesienie 2 ml eteru dietylowego (Sigma-Aldrich), a następnie 2 ml mieszaniny heksan:dichlorometan (Sigma-Aldrich). Próbki rozpuszczono w 1 ml mieszaniny heksan:dichlorometan (1:1) i naniesiono na kolumny SPE. Kolumny SPE eluowano 2 ml mieszaniną heksan:dichlorometan (1:1), następnie kolumny SPE przeniesiono do nowych próbek i eluowano 2 ml eterem dietylowym dwukrotnie (2x2ml). Uzyskany materiał zawierał oczyszczone estry metylowe 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych. Próbki osuszono pod azotem.

Estry metylowe kwasów 3-OHFAs poddano derywatacji w celu uzyskania pochodnych silylowanych: do osuszonych próbek dodano 50  $\mu$ l bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamidu (Supelco, Merck) oraz 5  $\mu$ l pirydyny (Supelco, Merck), reakcję prowadzono w 60°C przez 20 minut. Dodano 50  $\mu$ l heksanu, na kolumnę z nanoszono 1  $\mu$ l materiału.



Rysunek 12 Schemat silylacji

Pochodne 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych były analizowane za pomocą GC-MS w aparacie ITQ700 (Thermo Scientific), wyposażonego w detektor mas typu pułapki jonowej oraz w aparacie GC 7890B (Agilent), wyposażonego w detektor mas typu potrójnego kwadrupola. GC-MS, aparat ITQ700 (Thermo Scientific). Zastosowano kolumnę kapilarną Zebron Inferno ZB-5HT, dł=30 m, średnia wew.:0,25 mm, średnica ziarna: 0,25 µm (Phenomenex) (Tab.10).

Tabela 10 Warunki analizy pochodnych 3-OHFAs na GC-MS firmy Thermo Scientific

Chromatografia gazowa (GC)			
	Tempo wzrostu temperatury [°C/min.]	Temperatura [°C]	Czas [min]
<b>Warunki wyjściowe</b>	-	150	3,00
<b>Rampa/Skok 1</b>	18,0	280	6,00

Temperatura nastrzyku (zaworu wlotowego): 250°C

Nośnik: stały przepływ 1,0 ml/min.

MS Transfer Line: 280°C

**Spektrometria aparat ITQ700 (Thermo Scientific)**

Tryb skanu: Full scan

Zakres mas: 50-650

Źródło jonów: 220°C

**GC-MS, aparat GC 7890B (Agilent)**

Kolumna kapilarna DB-5ms Columns, dł: 30 m, średnia wew.: 0,25 mm, średnica ziarna: 0,25µm (Agilent)

Temperatura nastrzyku (zaworu wlotowego): 250°C

Nośnik: stały przepływ 1,0 ml/min.

MS Transfer Line: 280°C

**Spektrometr mas, aparat 700D (Agilent)**

Tryb skanu: Full scan, MRM

Zakres mas: 50-650

Źródło jonów: 180°C

### Oznaczanie stężenia lipopolisacharydu (LPS)

Stężenie lipopolisacharydu (LPS) za pomocą jego markerów określono przez oznaczenie ilościowe 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OHFAs), które są zakotwiczone w fosforylowanym disacharydzie glukozaminy, wspólnie budując lipid A. Oznaczaliśmy kwasy 3-hydroksylowe o długości łańcucha 10-18 atomów węgla; całkowitą zawartość LPS w próbce obliczano jako sumę liczby nanomoli poszczególnych 3-OHFAs podzieloną przez 4, co uwzględnia cztery miejsca podstawienia lipidu A przez 3-OHFAs.

3-OHFAs zebrano w grupy reprezentujące rzędy bakterii:

Rząd *Enterobacteriales*: 3-OH *n*C14:0

Rząd *Bacteroidales*: 3-OH *i*C15:0, 3-OH *n*C15:0, 3-OH *n*C16:0, 3-OH *i*C17:0, 3-OH *n*C17:0

Rząd *Fusobacteriales*: 3-OH *n*C14:0, 3-OH *n*C16:0

#### **4.9. Oznaczenie poziomu receptorów GPR43 oraz GPR109A z zastosowaniem testów immunoenzymatycznych ELISA**

Próbki tkanek jelita grubego myszy (30 mg) rozcierano w moździercu na suchym lodzie. Do próbek dodano 1000  $\mu$ l schłodzonego buforu do lizy tkanek (40 mM Tris/HCl, pH 7,6; 8 M mocznik) oraz zestaw inhibitorów proteaz (1 tab. na 10 ml, Pierce Protease Inhibitor Tablets, Thermo Scientific).

Próbki poddano homogenizacji (35 000 rpm przez 2 min.) na lodzie w aparacie TH-02 (OMNI International). Materiał wirowano w 4°C przez 10 min. w 20 000 g (Centrifuge Z 36 HK, Hermle Labotechnik), uzyskane supernatanty przeniesiono do nowych probówek. Próbki przechowywano w -70°C do czasu oznaczania poziomu receptorów GPR43 i GPR109A z zastosowaniem testów immunoenzymatycznych.

Do oznaczania poziomu receptorów GPR43 zastosowano test immunoenzymatyczny Mouse Free Fatty Acid Receptor 2 (FFAR2) ELISA Kit (MyBioSource). Płytkę opłaszczono przeciwciałami specyficznymi dla GPR43 na którą naniesiono standardy (10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml, 0,3125 ng/ml, 0,156 ng/ml, 0 ng/ml), próbę ślepą oraz próbki badane i supernatanty uzyskane po homogenizacji tkanek jelita grubego. Płytkę zabezpieczono folią ochronną i inkubowano w 37°C przez 2 godziny. Po tym czasie supernatanty usunięto, a na płytkę naniesiono biotynylowane przeciwciała drugorzędowe i ponownie inkubowano w 37°C przez godzinę. Supernatant usunięto, a płytkę płukano trzykrotnie, każdorazowo pozostawiając odczynniki na 2 min. w dołkach. Dodano roztwór awidyny sprzężonej z peroksydazą chrzanową (100  $\mu$ l, Detection Reagent B) po inkubacji w 37°C przez godzinę, supernatant usunięto, a płytkę ponownie płukano pięciokrotnie roztworem do płukania (300  $\mu$ l, Wash Solution), każdorazowo pozostawiając odczynniki na 2 min. w dołkach. Do studzienek naniesiono tetrametylobenzydynę (TMB), inkubowano w 37°C przez 25 min, po czym reakcję zatrzymano przez dodanie roztworu kwasu siarkowego. Pomiar absorbancji ( $\lambda = 450$  nm), prowadzono bezpośrednio po zatrzymaniu reakcji, w czytniku PowerWave™ XS Microplate Reader (BioTek).

Oznaczenie poziomu receptorów GPR109A przeprowadzono za pomocą testu ELISA Mouse G-Protein Coupled Receptor 109A (GPR109) ELISA Kit (MyBioSource). Płytkę została wcześniej opłaszczona przeciwciałami specyficznymi dla GPR109A.

Wykonano krzywą standardową wg instrukcji producenta (0 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 40 ng/ml, 80 ng/ml). Materiał badany- supernatanty uzyskane z homogenizacji tkanek jelita grubego naniesiono do studzienek płytki 96-dołkowej, dodano przeciwciała drugorzędowe skoniugowane z peroksydazą chrzanową, płytkę zabezpieczono i inkubowano (1h w 37°C) z wytrząsaniem na kołysce laboratoryjnej (3013, GFL). Płytkę pięciokrotnie płukano roztworem do płukania, każdorazowo pozostawiając odczynniki na 1 min. w studzienkach, następnie dodano roztwór zawierający tetrametylobenzydynę (TMB), a następnie roztwór Chromogen Solution B, po czym płytkę inkubowano w ciemności w 37°C przez 15 minut z wytrząsaniem. Dodano roztwór zatrzymujący reakcję i prowadzono pomiar absorbancji ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) bezpośrednio od zatrzymania reakcji, przy użyciu czytnika PowerWave™ XS Microplate Reader (BioTek).

#### **4.10. Oznaczenie poziomu uzyskanych produktów deacetylowych przez HDAC (test immunoenzymatyczny ELISA)**

Oznaczenie poziomu uzyskanych produktów deacetylowych przez HDAC przeprowadzono w dwóch etapach: 1. przygotowanie ekstraktu jądrowego z zastosowaniem zestawu CellLytic™ NuCLEAR™ Extraction Kit (NXTRACT, Sigma-Aldrich) oraz 2. oznaczenie w nim poziomu uzyskanych produktów deacetylowych przez HDAC produktów przy użyciu zestawu kolorymetrycznego Epigenase HDAC Activity/Inhibition Direct Assay Kit (Colorimetric) (Epigentek).

*Przygotowano ekstrakt jądrowy:* do 0,1 M roztworu ditiotreitolu (DTT, 10  $\mu\text{l}$ ) dodano bufor do lizy (1x Lysis Buffer, 1000  $\mu\text{l}$ ) oraz mieszaninę inhibitorów proteaz (10  $\mu\text{l}$ ). Fragmenty tkanek dwukrotnie przemyto buforem PBS i dodano mieszaninę buforu do lizy (1000  $\mu\text{l}$ ), inhibitorów proteaz i roztworu DTT. Według instrukcji producenta tkanki jelita myszy homogenizowano (35 000 rpm) aparatem TH-02 (OMNI International) do osiągnięcia jednorodnej zawiesiny (ok. 2min.), a następnie wirowano w 11 000 g przez 20 min. (Centrifuge MiniSpin® plus, Eppendorf). Supernatanty przeniesiono do nowych probówek.

Przygotowano mieszaninę roztworu 0,1 M DTT (1,5  $\mu\text{l}$ ), inhibitorów proteaz (1,5  $\mu\text{l}$ ) oraz buforu do ekstrakcji (147  $\mu\text{l}$ , Extraction Buffer). Do każdej próbki dodano 140  $\mu\text{l}$  mieszaniny i delikatnie wytrząsano przez 30 min. na kołysce laboratoryjnej (MR-12 Rocker-Shaker, Biosan). Próbki wirowano przez 5 min. w 20 000 g (Centrifuge Z 36 HK, Hermle Labortechnik), supernatanty przeniesiono do nowych probówek. Tak uzyskany materiał przechowywano w temp. -70°C do oznaczenia poziomu deacetylowanych produktów w mieszaninie.

*Poziom uzyskanych produktów deacetylowych przez HDAC* oznaczano za pomocą komercyjnego testu immunoenzymatycznego ELISA. Wykonano krzywą standardową wg. instrukcji (5 ng/ $\mu\text{l}$ , 2,0 ng/ $\mu\text{l}$ , 1,0 ng/ $\mu\text{l}$ , 0,5 ng/ $\mu\text{l}$  oraz 0,2 ng/ $\mu\text{l}$ ). Próby kontrolne zawierające po



49 µl roztworu buforu testowego/blokującego (HDAC Assay Buffer, HO1) oraz 1 µl odczynnika substratu dla HDAC (HDAC Substrate, HO2), standardy (49 µl roztworu buforu testowego/blokującego (HDAC Assay Buffer, HO1) oraz 1 µl próbki standardu o odpowiednim rozcieńczeniu) oraz materiał badany (45 µl roztworu buforu testowego/blokującego (HDAC Assay Buffer, HO1), odczynnika substratu dla HDAC (HDAC Substrate, HO2) oraz 4 µl badanego ekstraktu jądrowego) naniesiono na płytkę do ELISA. Płytkę zabezpieczono i inkubowano w 37°C przez 90 minut.

Supernatant usunięto, a płytkę trzykrotnie przemyto (150 µl, 1x Wash Buffer), następnie naniesiono przeciwciała (50 µl, Capture Antibody) i inkubowano w temperaturze 25°C przez 60 minut. Supernatant usunięto, płytkę przemyto (150 µl, 1x Wash Buffer), i dodano przeciwciała detekcyjne (50 µl, Detection Antibody), płytkę poddano inkubacji przez 30 minut w temperaturze 25°C. Supernatant usunięto, płytkę przemyto (150 µl 1x Wash Buffer), i dodano roztworu wywołującego reakcję (100 µl Developer Solution) i inkubowano w temperaturze pokojowej, w ciemności po 10min, reakcję zatrzymano (100 µl, Stop Solution), prowadzono pomiar absorbancji ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ), bezpośrednio od zatrzymania reakcji, przy użyciu czytnika PowerWave™ XS Microplate Reader (BioTek).

#### **4.11. Oznaczanie poziomu cytokin pro- i przeciwzapalnych, z zastosowaniem testów immunoenzymatycznych ELISA**

Do określenia stężenia cytokin w surowicy myszy wykorzystano testy immunoenzymatyczne ELISA MAX Deluxe Set (BioLegend). Oznaczono poziom sześciu cytokin: TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12/IL-23 (p40), IL-17A.

Krzywe standardowe przygotowano według instrukcji producenta: IL-6 (500 pg/ml), TNF- $\alpha$  (500 pg/ml), IL-10 (2 000 pg/ml), IFN- $\gamma$  (1 000 pg/ml), IL-12/IL-23 (p40) (500 pg/ml) oraz IL-17A (1 000 pg/ml).

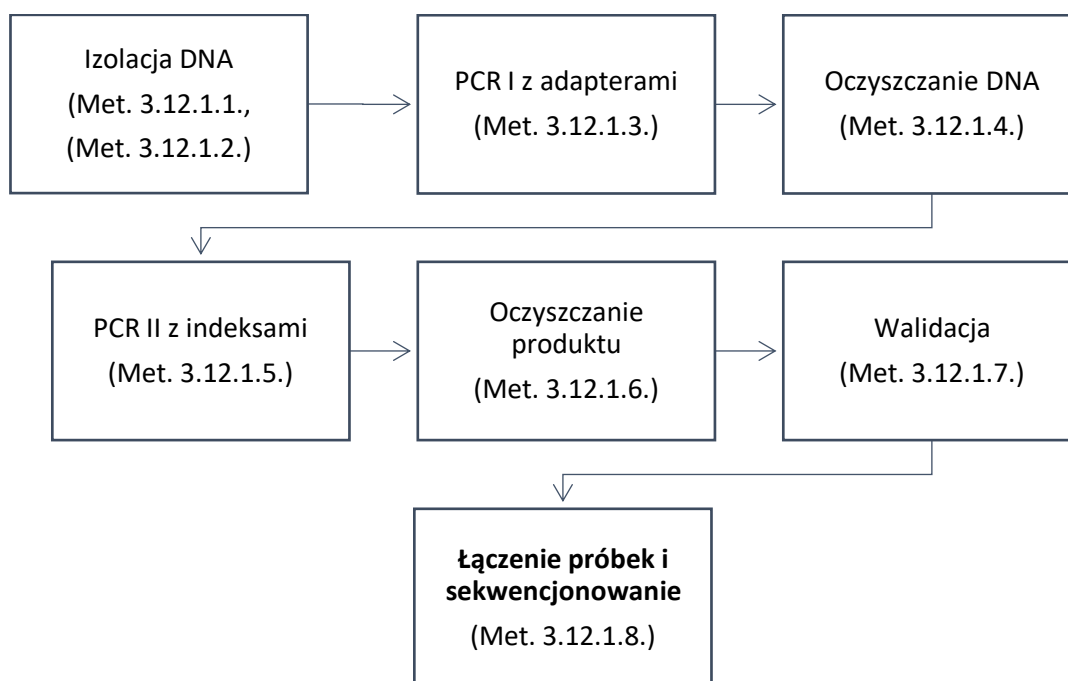
Płytki opłaszczono odpowiednim przeciwciałem (100 µl Capture Antibody) i inkubowano w temperaturze 2-8°C przez noc, następnie supernatant usunięto, płytki przemyto roztworem do płukania (300 µl, Wash Buffer), po czym naniesiono roztwór blokujący (200 µl, 1x Assay Diluent) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez godzinę wykorzystując kołyskę laboratoryjną (MR-12, Biosan). Po usunięciu supernatantu, a płytki przemyto roztworem do płukania (300 µl, Wash Buffer), po czym naniesiono surowice badane (4-krotnie rozcieńczone, 100 µl). Płytki zabezpieczono i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny z wytrząsaniem, po czym płytki płukano roztworem do płukania (300 µl, Wash Buffer). Naniesiono przeciwciała (100 µl, Detection Antibody) i inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem, po

czym supernatant usunięto, płytki przemyto i dodano roztwór awidyny-HRP (100  $\mu$ l) i inkubację powielono w temperaturze pokojowej przez 30 min. z wytrząsaniem. Supernatant usunięto, a płytki przemyto i dodano roztwór wywołujący reakcję (TMB Solution: równe objętości Substrat A Solution oraz Substrat B Solution) i inkubowano przez 15 minut w ciemności. Następnie do wszystkich studzienek dodano roztwór zatrzymujący reakcję (100  $\mu$ l, Stop Solution) i prowadzono pomiar absorbancji ( $\lambda = 450$  nm), bezpośrednio od zatrzymania reakcji, przy użyciu czytnika płytek PowerWave™ XS Microplate Reader (BioTek).

#### 4.12. Sekwencjonowanie NGS

Zestaw Stool DNA Purification Kit (EURx Molecular Biology Products) został użyty do izolacji materiału DNA bakteryjnego z kału. Izolacja, oczyszczanie i analiza DNA zostały przeprowadzone w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej i Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki IITD PAN.

##### 4.12.1. Izolacja DNA bakteryjnego



Rysunek 13 Schemat izolacji bakteryjnego DNA

Izolacja DNA przebiegała etapami: izolacja DNA, PCR I z adapterami, oczyszczanie I, PCR II z indeksami, oczyszczanie II, walidacja i łączenie próbek z sekwencjonowaniem. Pierwszym etapem było uzyskanie z próbek kału oczyszczonego materiału DNA bakteryjnego (Rys. 13).

##### *Izolacja DNA 1 (FastDNA™ Spin Kit)*

Materiał DNA izolowano z kału myszy za pomocą zestawu FastDNA Spin Kit for Feces (MP

Biomedicals), według wskazań producenta. 500 mg kału przeniesiono do probówek (*Lysing Matrix E*), dodano 825 µl buforu fosforanowego (PBS) oraz 275 µl roztworu PLS. Zawiesinę uzyskano przez wytrząsanie (10-15 sekund, Vortex-Genie™ 2, Scientific Industries SI), następnie próbkę wirowano w 14 000 g przez 5 min. (Centrifuge MiniSpin® plus, Eppendorf) i zebrano supernatant. Dodano 978 µl PBS i 122 µl buforu MT, i ponownie wytrząsano.

Homogenizację materiału prowadzono przez 40 sekund z prędkością 6 m/s (FastPrep-24 Classic Instrument, MP Biomedicals), po czym próbki wirowano w 14000 g przez 10 min. Supernatant przeniesiono do nowych probówek (2,0 ml), dodano 250 µl roztworu PBS, intensywnie mieszano, i poddano inkubcji w 4°C przez 10 minut. Materiał ponownie wirowano w 14 000 g przez 2 min. i supernatant przeniesiono do probówek typu Falcon (15 ml) i dodano do nich po 1 ml roztworu wiążącego matrycę (Binding Matrix Solution), delikatnie wymieszano i umieszczono na 3-5 minut na kołysce laboratoryjnej (MR-12 Rocker-Shaker, Biosan). Próbki wirowano w 14 000 g przez 2 min. (Heraeus Biofuge Stratos), supernatant usunięto, osad zawieszono w 1 ml buforu (Wash Buffer #1).

600 µl zawiesiny pobrano do probówek SPIN Filter i wirowano w 14 000 g przez 1 min. (Centrifuge MiniSpin® plus, Eppendorf), po czym opróżniono probówki znajdujące się pod filtrem (odbierające). Proces powtórzono dla pozostałego materiału, a następnie do probówek z filtrem dodano 500 µl buforu Wash Buffer #2, delikatnie wymieszano pipetą i ponownie wirowano w 14 000 g przez 2 min. Opróżniono probówki odbierające, proces powtórzono. Probówki z filtrem zawierającym badany materiał pozostawiono do wyschnięcia.

Osuszony materiał w probówkach SPIN Filter przeniesiono do probówek odbierających o pojemności 1,9 ml i dodano 70 µl TES (2-[Tris(hydroxymethyl)methylamino]-1-ethanesulfonic acid). Materiał zawieszono po czym wirowano w 14 000 g przez 2 min. w celu elucji oczyszczonego DNA do probówek odbierających. Tak przygotowane próbki były gotowe do reakcji PCR, zamrażane w -20°C lub przechowywane w 4°C, jeśli analiza była kontynuowana.

Izolowane bakteryjne DNA było przekazane do analizy w Laboratorium Genetyki Medycznej w Centrum Badań DNA, gdzie przeprowadzono kolejne etapy oczyszczania oraz sekwencjonowania DNA z zastosowaniem sekwenatora genomowego MiSeq (Illumina). Opracowanie bioinformatyczne zostało zlecone w ramach analizy. Przygotowane zostały biblioteki (region V3-V4, 460 bp), i przeprowadzono sekwencjonowanie (~ 150 tys. sparowanych odczytów/próbkę).

#### *Izolacja DNA 2 (Stool DNA Purification Kit, EURx)*

Ekstrakcję próbek prowadzono zgodnie z protokołem zestawu. Bufor aktywacyjny (30 µl, Buffer ST) naniesiono na minikolumny wiążące DNA (DNA binding spin-column), pozostawiono w

temperaturze pokojowej (nie wirowano) do czasu naniesienia lizatów na minikolumny.

Okolo 200 mg materiału badanego (kału) przenoszono do probówek wypełnionych kulkami szklanymi (Bead Tube) z buforem, zawieszono i prowadzono poprzez energiczne mieszanie. Następnie dodano 60 µl buforu Lyse ST i wytrząsano przez minutę (Vortex-Genie 2, Scientific Industries SI), po czym próbki inkubowano przez 5 min w 70°C w bloku grzejnym (TS-100C, Biosan). Probówki z materiałem przymocowano do wortexu w pozycji horyzontalnej i wytrząsano przez 10 min., następnie wirowano w 12 000 g przez 2 min. 400 µl supernatantu przeniesiono do nowych probówek typu Eppendorf (2 ml) i dodano 400 µl buforu PR. Probki wytrząsano przez 5 sekund i inkubowano przez 5 min na lodzie (0-4°C). Materiały odwirowano w 12 000 g przez 2 min., supernatanty (550 µl) przeniesiono do nowych probówek typu Eppendorf (2 ml). Dodano 650 µl buforu Sol ST i 400 µl 96% etanolu. Probki dokładnie wymieszano, a następnie wirowano przez kilka sekund z prędkością 11 000 g. 700 µl supernatantu przeniesiono na minikolumny wiążące DNA. Probki wirowano 1 min., 11 000 g, supernatanty odrzucono, a płukanie i wirowanie powtórzono celem przefiltrowania pozostałości lizatu przez złoże.

Minikolumny zawierające badany materiał ponownie umieszczono w probówkach odbierających. 500 µl buforu płuczającego (Wash STX) naniesiono na minikolumny i wirowano przez 1 min., 11 000 g. Przesącze odrzucono, płukanie i wirowanie powtórzono, wydłużając czas wirowania do 2 min. Minikolumny umieszczono w nowych probówkach typu Eppendorf (2 ml) i naniesiono 70 µl buforu do elucji na powierzchnię membrany, pozostawiono na 2 min. w temperaturze pokojowej, następnie wirowano przez 1 min., 11 000 g. Materiał w przesącach zawiera oczyszczone DNA. Materiał przechowywano w -20°C (długie przechowywanie) lub w 4°C, jeśli analiza była kontynuowana.

### PCR I z adapterami

W tym etapie za pomocą reakcji PCR multiplikowano fragmenty bakteryjnego DNA. Startery z sekwencjami adapterów użyte w reakcji powodowały dołączenie tych sekwencji do finalnego produktu. W reakcji PCR zastosowano matrycę (5 ng/µl), startery oraz enzymy (NEBnext Q5 HotStart HiFi PCR Master Mix, New England Biolabs). Reakcje przeprowadzono przy użyciu termocyklera (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad), w warunkach prezentowanych w tabelach 11, 12, 13. Po połączeniu wszystkich składników reakcji probówki szczelnie zamknięto i wytrząsano 5-10 sekund (V-1 plus, Biosan), a następnie krótko wirowano (mySpin12, Thermo Scientific). Otrzymany materiał był oczyszczany według Met. 3.12.1.4.

### *Tabela 11 Sekwencje starterów*

Sekwencje starterów	
<b>Starter</b>	Sekwencja 5' – 3'
<b>Forward</b>	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG
<b>Reverse</b>	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

Tabela 12 Składniki reakcji PCR

Składniki reakcji	
Składnik	Objętość
Matryca 5ng/μl	2,50 μl
Forward primer	5,00 μl
Reverse primer	5,00 μl
Enzym NebNext	12,5 μl
Objętość końcowa	<b>25,0 μl</b>

Tabela 13 Warunki reakcji PCR

Warunki reakcji PCR			
Etap	Temperatura	Czas	Cykle
<b>I</b>	98°C	30 sekund	25 razy
<b>II</b>	98°C	10 sekund	
	55°C	30 sekund	
<b>III</b>	72°C	30 sekund	
	72°C	2 minuty	
<b>IV</b>	4°C	∞	

#### Oczyszczanie produktów PCR

Produkty PCR oczyszczono z pozostałości starterów i innych niepotrzebnych fragmentów DNA, które mogły znajdować się w próbce.

Do oczyszczania wykorzystano całe próbki po reakcji PCR I (25 μl). Kulki magnetyczne (AMPure XP beads, Beckman Coulter) doprowadzono do temperatury pokojowej oraz zawieszono w buforze. Próbkę wyjęto z termocyklera (Met. 3.12.1.3.), wirowano 3-5 sekund w celu usunięcia kondensatu na wieczkach probówek. Do studzienek płytki 96-dołkowej (Agilent 4200 TapeStation system, Agilent) przenoszono całą próbkę po reakcji PCR I (25 μl) oraz 20 μl kulek magnetycznych. Materiał mieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Płytkę z naniesionym materiałem wstawiono do statywu magnetycznego (BILATEST™ magnetic separator, Sigma-Aldrich) na 2 minuty, po czym zebrano i uważnie usunięto supernatant, pozostawiając płytkę na statywie magnetycznym.

W kolejnym etapie materiał płukano 80% etanolem (200 μl) na statywie magnetycznym, po 30 sekundach ponownie ostrożnie zebrano supernatant. Płukanie powtórzono i przy użyciu najmniejszej końcówki pipety usunięto resztę etanolu z próbek. Próbki na płytce w statywie

magnetycznym pozostawiono do osuszenia przez 3 minuty, następnie płytkę zdjęto ze statywu magnetycznego. Do próbek dodano 52,5 µl buforu Tris 10 mM (pH 8,5), wymieszano pipetą, i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 minuty (bez wirowania i mieszania), po czym wstawiono do statywu magnetycznego i ponownie inkubowano przez 2 min. Uzyskane supernatanty (50 µl) przeniesiono do nowych probówek do dalszych analiz.

#### PCR II z indeksami

Na tym etapie do próbek zostały przyłączone indywidualne indeksy, pozwalające na identyfikację bakterii pochodzących z konkretnej próbki. Próbki przeniesiono do opisanych stripów do PCR (resztę – 45 µl – zamrożono). Utworzono niepowtarzalne pary indeksów, przypisując każdej próbce jeden starter N7XX i jeden starter S5XX (Nextera™ DNA CD Indexes, 24 indexes – 24 samples, Illumina), co pozwoliło na ich późniejszą identyfikację. Pary indeksów sprawdzono na sekwenatorze MiSeq (Illumina), tworząc arkusz z próbkami. Dobrane pary indeksów nie powtarzały się. Następnie do podpisanych stripów z próbkami dodano 5 µl wybranych indeksów. Do probówek dodano enzym (25 µl, NEBnext Q5 HotStart HiFi PCR Master Mix, New England Biolabs) oraz 10 µl wody MilliQ. Zamknięte szczelnie próbki wytrząsano przez 5-10 sekund na worteksie, i krótko zwirowano. Analizę PCR II przeprowadzono na termocyklerze (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad) według schemnatu zawartego w Tab. 14 i 15.

*Tabela 14 Składniki reakcji PCR II*

Składniki reakcji	
Składnik	Objętość
<b>Matryca</b>	5,00 µl
<b>Starter Nextera XT N7XX</b>	5,00 µl
<b>Starter Nextera XT N5XX</b>	5,00 µl
<b>Enzym NebNext</b>	25,0 µl
<b>Woda MiliQ</b>	10,0 µl
<b>Objętość końcowa</b>	<b>50,0 µl</b>

*Tabela 15 Warunki reakcji PCR II*

Warunki reakcji PCR			
Etap	Temperatura	Czas	Cykle
<b>I</b>	95°C	3 minuty	8 razy
<b>II</b>	95°C	30 sekund	
	55°C	30 sekund	
<b>III</b>	72°C	30 sekund	
	72°C	5 minut	
<b>IV</b>	4°C	∞	

### Oczyszczanie produktów PCR II

Ten etap prowadził do oczyszczenia produktu PCR z pozostałości starterów i innych niepotrzebnych fragmentów DNA, które mogły znajdować się w próbce. Reakcji oczyszczania poddano całą próbkę po reakcji PCR II (50 µl).

Procedura była analogiczna do met. 3.12.1.4 do etapu dwukrotnego płukania etanolem i usunięcia go z próbek.

Próbki na płytce w statywie magnetycznym były inkubowane z otwartymi wieczkami przez 3 minuty w celu odparowania pozostałości etanolu. Następnie płytkę zdjęto ze statywu magnetycznego i do każdej próbki dodano 27,5 µl buforu Tris 10 mM, pH 8,5. Próbki wymieszano przy użyciu pipety i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 minuty (bez wirowania i mieszania), po czym wstawiono do statywu magnetycznego i ponownie inkubowano przez 2 minuty. Uzyskane supernatanty (25 µl) przeniesiono do nowych probówek do dalszych analiz.

### Validacja

Materiał przed analizą sekwencji DNA na aparacie MiSeq był normalizowany, czyli rozcieńczany w celu uzyskania takiego samego stężenia DNA we wszystkich próbkach. Poprawna normalizacja zapewnia jednakowe pokrycie wszystkich próbek np. w przypadku ośmiu próbek każda z nich będzie reprezentowana w przybliżeniu przez 12,5 % wszystkich sekwencji.

Stężenie dsDNA ustalono w każdej z próbek na aparacie Quantus Fluorometer (Promega) z zastosowaniem zestawu QuantiFluor dsDNA System zgodnie z procedurą producenta (Promega). Przygotowano rozcieńczony bufor TE (z 20 x TE Buffer), a następnie barwnik (Working Solutions, barwnik 1:400 QuantiFluor dsDNA Dye w buforze TE). Przygotowano kontrolę: 100 ng/µl standard DNA (Standard Sample) dodano do 200 µl buforu (Working Solution). Do nowych probówek do PCR-u (0,5 ml) naniesiono 200 µl roztworu Working Solution, a następnie 2 µl próbki poddano analizie we fluorymetrze.

Wszystkie próbki doprowadzono do stężenia 4 nM przy użyciu buforu Tris 10 mM, pH 8,5.

Analizę jakościową rozkładu produktów reakcji PCR przeprowadzono z zastosowaniem systemu do automatycznej elektroforezy żelowej DNA i RNA (System TapeStation 4200, Agilent). Do probówek dodano 2 µl próbki i 2 µl buforu High Sensitivity D1000 Sample Buffer oraz markery masy. Przygotowano standard: 2 µl High Sensitivity D1000 Ladder dodano do 2 µl buforu High Sensitivity D1000 Sample Buffer, worteksowano przez 1 minutę (IKA® MS 3 Vortexer, IKA), a następnie wirowano 5-10 sekund (mySpin12, Thermo Scientific). Tak uzyskany materiał analizowano przy użyciu aparatu do automatycznej elektroforezy żelowej DNA i RNA (System TapeStation 4200, Agilent). Oczekiwana długość produktu po reakcji PCR to około 550-600 par

zasad.

#### Łączenie próbek i sekwencjonowanie

Z materiału przygotowanego na etapie walidacji (stężenie 4nM) pobrano 5  $\mu$ l i połączono w jednej probówce. Przygotowano kartridż (MiSeq Reagent Kit v2, 500-cycles, Illumina) (odwracając go kilkakrotnie, w celu wymieszania buforów) w temperaturze pokojowej, pozostałe odczynniki po rozmrożeniu przechowywano w lodówce w +4°C (na schłodzonym statywie lub w łaźni z lodem).

Do próbki (1,5 ml) przeniesiono mieszaninę próbek (5  $\mu$ l) oraz 0,2 N wodorotlenek sodu (5  $\mu$ l). Do drugiej próbki (1,5 ml) przeniesiono kontrolę PhiX (5  $\mu$ l) oraz 0,2 N wodorotlenek sodu (5  $\mu$ l), obie próbki umieszczono na 5-10 sekund na wortexie, a następnie wirowano przez 1 minutę w 280 g. Próbkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut, po czym dodano 990  $\mu$ l buforu HT1. W wyniku rozcieńczenia buforem HT1 powstały biblioteki oraz kontrola PhiX o końcowym stężeniu biblioteki 20 pM. Bibliotekę oraz próbki kontrolne ponownie rozcieńczono buforem HT1 do otrzymania stężenia 6 pM (180  $\mu$ l biblioteki/kontroli PhiX o stężeniu 20 pM oraz 420  $\mu$ l schłodzonego buforu HT1). Wymieszano przez kilkukrotne obrócenie probówek i pozostawiono w łaźni lodowej.

W nowej probówce (1,5 ml) połączono 30  $\mu$ l kontroli PhiX o stężeniu 6 pM oraz 570  $\mu$ l biblioteki o stężeniu 6 pM. Całość przeniesiono na lód i inkubowano do etapu denaturacji. Przygotowano arkusz pracy w sekwenatorze MiSeq – wprowadzono dane o eksperymencie i arkusz z próbkami, opróżniono butle z odpadami, wstawiono nowy bufor oraz komorę przepływową (flow cell). Gotową bibliotekę poddano denaturacji poprzez inkubację przez 2 minuty w 96°C w termobloku (TS-100C, Biosan). Następnie próbkę krótko wymieszano przez odwracanie i inkubowano na lodzie przez 5 minut.

Gotową bibliotekę załadowano na kartridż. W tym celu przebito czystym tipsem membranę i nałożono całą objętość przygotowanego roztworu z biblioteką (600  $\mu$ l) i przeprowadzono analizę za pomocą sekwenatora MiSeq.

#### 4.12.2. Analiza danych sekwencjonowania DNA

W eksperymencie, w którym analizowano wpływ diety o zwiększonej zawartości celulozy na mikrobiom i przebieg procesu zapalnego wywołanego nowotworem MC38/EGFP. Sekwencjonowanie zostało zlecone firmie zewnętrznej (Centrum Badań DNA Sp. z o.o. w Poznaniu). Analizę przeprowadzono z zastosowaniem bazy danych GreenGenes. Biblioteki zostały przygotowane dla regionów V3-V4 (460 bp). Sekwencjonowanie prowadzono w trybie ~ 150 tys. sparowanych odczytów/próbkę. Uzyskane dane dla próbek wyjściowych:



Number of pairs of reads 1009782

Number of quality filtered reads 864096

Percentage of quality filtered reads 85,57%

Dla uzyskanych danych sporządzono również analizy  $\beta$ -diversity (wykresy analizy głównych składowych PCoA).

W eksperymencie dotyczącym analizy wpływu diety o zwiększonej zawartości skrobi kukurydzianej na mikrobiom oraz przebieg procesu zapalnego wywołanego nowotworem MC38/0 podanym podskórnie bądź dojelitowo. Sekwencjonowanie zostało w całości wykonane w Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, wraz z analizą bioinformatyczną (którą przeprowadził dr hab. Łukasz Łaczmański, prof. IITD PAN). Wyniki były zanalizowane z zastosowaniem bazy danych GreenGenes oraz Silva. Biblioteki zostały przygotowane dla regionów V3-V4 (460 bp). Dane były analizowane na internetowej platformie QIIME II.

#### 4.12.3. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną prowadzono za pomocą programu STATISTICA, wer. 13 (StatSoft, Inc., USA), z zastosowaniem testów nieparametrycznych U Mann'a-Whitney'a, Kruskala-Wallisa oraz korelacji rang Spearmana. Za istotne statystycznie uznano wartości P mniejsze niż 0,05.

## 5. Aparatura

1. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)
  - Waters 1525 Binary HPLC Pump;
  - Waters 2489 UV/Visible Detector.
2. Chromatografia gazowa ze spektrometrią mas (GC-MS) firmy Thermo Scientific
  - Spektrometr masowy ITQ 700;
  - Chromatograf gazowy FOCUS GC;
  - Autosampler TriPlus.
3. Chromatografia gazowa ze spektrometrią mas (GC-MS) firmy Agilent  
Agilent GC 7890B GC System 700D
4. Spektrometr mas MALDI-TOF MS ultrafleXtreme firmy Bruker.
5. Wirówka do probówek Eppendorf:  
Centrifuge MiniSpin® plus, bez chłodzenia, zawiera Rotor F-45-12-11, 230 V/50 – 60 Hz
6. Komora laminarna II klasy bezpieczeństwa do hodowli bakteryjnych serii Safeflow 1.2 firmy Bioair.
7. Wirówka wysokiej prędkości, w lodówce, Heraeus™ Biofuge™ Stratos™.
8. Łaźnia wodna Grant JB Aqua 5 Plus.
9. Wyrząsarka kołyskowa MR-12 Rocker–Shaker firmy Biosan.
10. pH-metr stacjonarny FiveEasy™ F20/ FiveEasy Plus™ FP20 firmy METTLER-TOLEDO.
11. Mieszadło magnetyczne ES21 firmy WIGO.
12. Inkubator O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, MCO-19M firmy Panasonic.
13. Termomikser (grzanie i chłodzenie) TS-100C firmy Biosan.
14. Miniwirówka mySpin12 firmy Thermo Scientific, przystosowana do wirowania 12 probówek o poj. 1,5/2 ml o maks. śr. 11 mm oraz 32 probówek PCR 0,2 ml.
15. Worteks V-1 plus firmy Biosan.
16. System TapeStation 4200 firmy Agilent, do automatycznej elektroforezy żelowej DNA i RNA.
17. T100 Thermal Cycler firmy Bio-Rad.
18. Sekwenator nowej generacji MiSeq firmy Illumina.
19. Reacti-Therm™ I #18822 Heating and Stirring Modules firmy Thermo Scientific.
20. Vortex-Genie™ 2 firmy Scientific Industries SI™.
21. Waga analityczna AX205 DeltaRange firmy METTLER-TOLEDO.
22. Termoblok, AccuBlock DigitalDry Bath, firmy Labnet.
23. Homogenizator FastPrep-24™ Classic Instrument, firmy MP Biomedicals.
24. Aparat Quantus™ Fluorometer (nr katalogowy: E6150, firma Promega).
25. Worteks IKA® MS 3 Vortexer (nr katalogowy: 0003617000, firma IKA).
26. Czytnik płytek PowerWave™ XS Microplate Reader, firmy BioTek.
27. Homogenizator TH-02, firmy OMNI International.
28. Wyrząsarka kołyskowa MR-12 firmy Biosan

## 6. Wyniki

### 6.1. Model nowotworu prostaty u myszy (TRAMP-C1, TRAMP-C2)

W celu wstępnej weryfikacji tezy o możliwości monitorowania zmian zachodzących w składzie i aktywności metabolicznej mikrobiomu jelitowego w czasie rozwoju nowotworu na pierwszym etapie badań przyjęliśmy model nowotworu prostaty indukowanego u myszy. W eksperymencie wykorzystano samce C57BL6/J/cmdb, którym zaaplikowano komórki TRAMP-C1 (o niższej inwazyjności) lub komórki TRAMP-C2 (o wyższej inwazyjności) bezpośrednio do prostaty, z odpowiednią grupą kontrolną. Poddaliśmy analizie próbki kału w kierunku badania składu bakteryjnego (za pomocą klasycznej hodowli i identyfikacji w spektrometrze MALDI-TOF), poziomu metabolitów bakteryjnych - krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) oraz markerów lipopolisachrydu (LPSu) - 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych 3-OHFAs. Wyniki zestawiono w odniesieniu do czasu trwania eksperymentu i stopnia rozwoju nowotworu.

#### 6.1.1. Bakterie w mikrobiomie jelitowym myszy z nowotworem prostaty

Zastosowanie różnych warunków hodowli bezpośredniej oraz spektrometrii MALDI-TOF pozwoliło na identyfikację bakterii, które występowały w wszystkich próbach kału (niezależnie od typu nowotworu i etapu doświadczenia) lub były ograniczone do jednej grupy (Tab. 16). Szczepy zidentyfikowane w systemie Biotyper osiągnęły wartości punktowe od 2,000 do 2,299, wymagane do wiarygodnego rozpoznania rodzaju i prawdopodobnej identyfikacji na poziomie gatunku.

Tabela 16 Bakterie w mikrobiomie jelitowym myszy z nowotworem prostaty (hodowla bezpośrednia, identyfikacja MALDI-TOF).

	nowotwór prostaty TRAMP-C1	nowotwór prostaty TRAMP-C2	grupa kontrolna
we wszystkich grupach	<i>Enterobacter hormaechei, Enterobacter cloacae, Enterobacter ludwigii, Enterobacter asburiae, Acinetobacter johnsonii, Acinetobacter pittii, Staphylococcus xylosus, Lactobacillus murinus, Lactobacillus johnsonii, Enterococcus faecalis, Enterococcus gallinarum</i>		
występowanie ograniczone do wskazanych grup	<i>Kocuria kristinae</i> <i>Pseudomonas monteilii</i> <i>Bacillus vallismortis</i> <i>Arthrobacter castelli</i> <i>Filifactor villosum</i>	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>Acinetobacter lwoffii</i> <i>Pseudomonas monteilii</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

### 6.1.2. Profil krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFAs) w modelu nowotworu prostaty

Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe: kwas octowy, propionowy i masłowy, zostały oznaczone w próbkach kału z zastosowaniem HPLC z detektorem UV/Vis (Tab. 17).

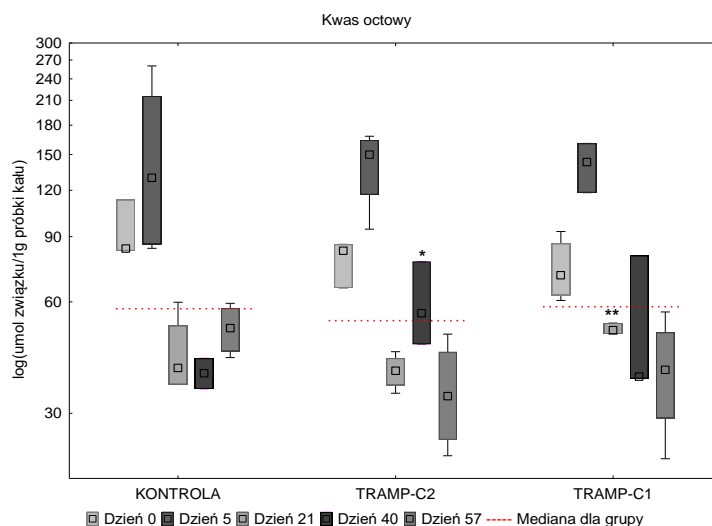
Krótko po zabiegu podania komórek nowotworowych (5. dzień) nastąpił silny wzrost stężenia SCFAs (w stosunku do stanu przed zabiegiem), prawdopodobnie jako skutek reakcji organizmu na operację. Zwiększona produkcja SCFAs nie była związana z wystąpieniem biegunki, próbki kału posiadały jednolitą strukturę.

Stężenie **kwasy octowego** w próbkach kału było podobne we wszystkich grupach (Rys. 14). W 21. dniu poziom kwasu octowego był istotnie wyższy u myszy z nowotworem prostaty TRAMP-C1 (indukowanym komórkami o mniejszej inwazyjności) w odnienieniu do kontroli, natomiast dla grupy TRAMP-C2 zależność ta wystąpiła w 40. dniu.

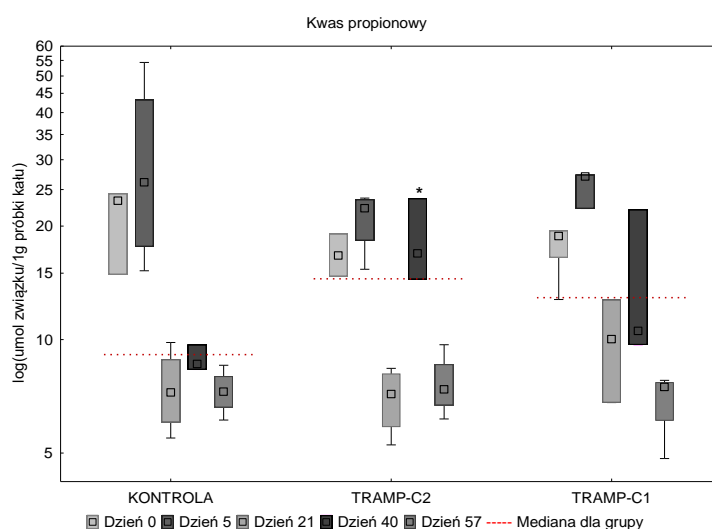
Stężenie **kwasy propionowego** było zróżnicowane, myszy z nowotworem prostaty charakteryzowało ogólnie wyższe stężenie kwasu propionowego w odniesieniu do grupy kontrolnej, istotne w 40. dniu w grupie z nowotworem prostaty TRAMP-C2; dla grupy TRAMP-C1 istnieje podobna zależność, jednak nieistotna statystycznie (Rys. 15).

Stężenie **kwasy masłowego** również nie różniło się znacząco pomiędzy grupami, jedynie w grupie myszy z nowotworem prostaty TRAMP-C2 wykazano niższe stężenie tego związku w kale w porównaniu do grupy kontrolnej (dzień 0. i 57.). W trzecim tygodniu eksperymentu (dzień 21.) poziom kwasu masłowego wzrósł u myszy z nowotworem prostaty o łagodniejszym przebiegu TRAMP-C1 w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Zależność taką obserwowano w grupie TRAMP-C2 dopiero w piątym tygodniu eksperymentu (dzień 40.) i nie była ona istotna statystycznie (Rys. 16).

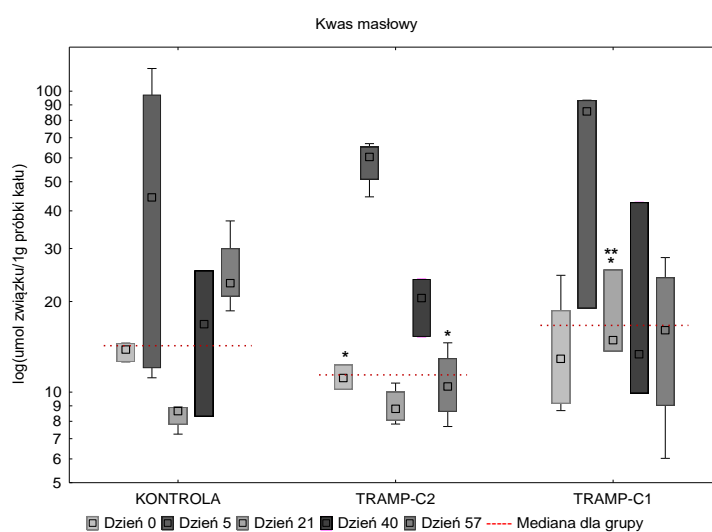
Podsumowując, w modelu nowotworu prostaty podczas rozwoju nowotworu wzrastał poziom krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, przy czym dla modelu indukowanego komórkami mniej agresywnymi TRAMP-C1 od 21. dnia, natomiast dla modelu nowotworu bardziej inwazyjnego TRAMP-C2 - od 40. dnia eksperymentu.



Rysunek 14 Stężenie kwasu octowego w próbkach kału w modelu nowotworu prostaty



Rysunek 15 Stężenie kwasu propionowego w próbkach kału w modelu nowotworu prostaty



Rysunek 16 Stężenie kwasu masłowego w próbkach kału w modelu nowotworu prostaty

\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem kontroli

\*\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  TRAMP-C2 vs. TRAMP-C1

Analiza wyników wykazała, że pomiędzy 3. a 5. tygodniem eksperymentu wystąpiły

największe istotne zmiany stężenia SCFAs (Tab. 17); w tym czasie zachodziły znaczne zmiany w składzie mikrobioty jelitowej. W warunkach aktywności nowotworu dominację zdobyły inne bakterie, co odzwierciedlają zmiany stężenia produktów metabolizmu.

Tabela 17 Profil SCFAs w modelu nowotworu prostaty

		SCFA [ $\mu\text{mol} / 1\text{g}$ kału]				
		0. dzień	5. dzień	21. dzień	40. dzień	57. dzień
<b>Kwas octowy</b>	kontrola	83,51	129,65	39,75	38,45	50,93
	TRAMP-C2	82,39	149,79	39,04	55,88*	33,36
	TRAMP-C1	70,76	143,05	50,28**	37,68	39,27
<b>Kwas propionowy</b>	kontrola	23,35	26,11	7,24	8,61	7,27
	TRAMP-C2	16,71	22,30	7,17	16,92*	7,38
	TRAMP-C1	18,81	27,08	10,03	10,55	7,49
<b>Kwas masłowy</b>	kontrola	13,83	44,31	8,64	16,81	22,99
	TRAMP-C2	11,13*	60,40	8,79	20,53	10,43*
	TRAMP-C1	12,90	85,54	14,87*,**	13,35	16,05

\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem kontroli

\*\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  TRAMP-C2 vs. TRAMP-C1

### 6.1.3. Profil 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OH FAs) w modelu nowotworu prostaty

3-hydroksylowe kwasy tłuszczowe, markery LPS, przyporządkowano do taksonów (zgodnie z Tab. 5, rozdz. 2.3.2.5, rozdz. 3.8).

3-OHFAs zebrano w grupy reprezentujące rzędy bakterii:

Rząd *Enterobacteriales*: 3-OH *n*C14:0

Rząd *Bacteroidales*: 3-OH *i*C15:0, 3-OH *n*C15:0, 3-OH *n*C16:0, 3-OH *i*C17:0, 3-OH *n*C17:0

Rząd *Fusobacteriales*: 3-OH *n*C14:0, 3-OH *n*C16:0

Największe zmiany odnotowano pomiędzy 3. a 5. tygodniem: początkowo (21. dzień) nastąpił spadek obecności przedstawicieli *Bacteroidales* i *Fusobacteriales* w grupie myszy z nowotworem prostaty indukowanym komórkami mniej inwazyjnymi (TRAMP-C1) w porównaniu do kontroli i grupy TRAMP-C2 (Rys. 17). W późnej fazie choroby obserwowaliśmy spadek markerów *Bacteroidales* i *Fusobacteriales* w obu grupach myszy z nowotworem (w odniesieniu do grupy kontrolnej). W grupie TRAMP-C1 z nowotworem prostaty indukowanym komórkami mniej zjadliwymi taka sytuacja utrzymywała się do 8. tygodnia eksperymentu. Nie obserwowano

znaczących zmian poziomu 3-OH *n*C14:0, markera rzędu *Enterobacteriales*, związanych z przebiegiem procesu zapalnego (Rys. 17, Tab. 18).

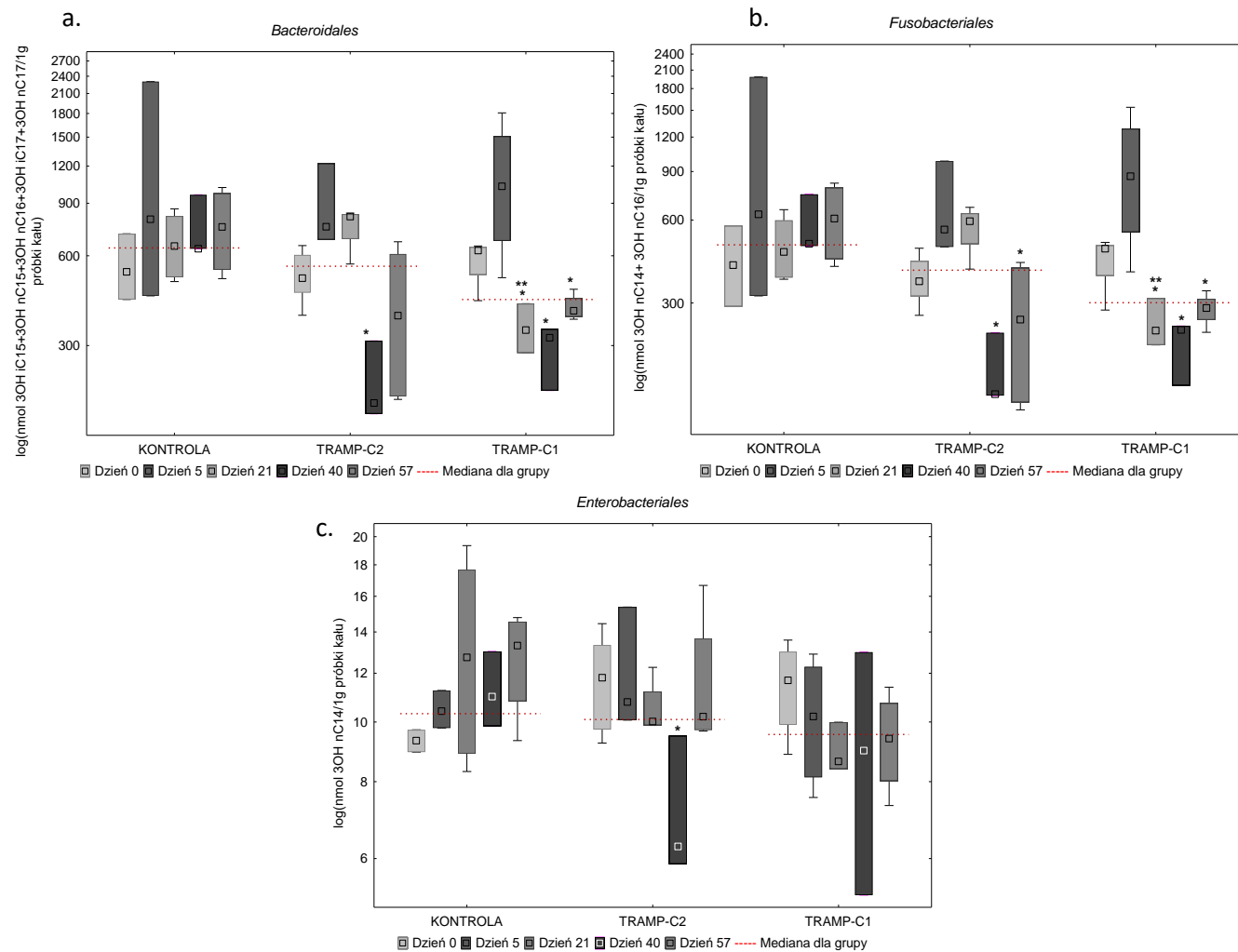
Tabela 18 Stężenie 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OH FAs), markerów LPSu, w próbkach kału w modelu nowotworu prostaty

		3-OH FAs [nmol/1g kału]																
Grupa		nC10:0	nC11:0	nC12:0	iC13:0	nC13:0	iC14:0	nC14:0	iC15:0	aC15:0	nC15:0	iC16:0	nC16:0	iC17:0	aC17:0	nC17:0	iC18:0	nC18:0
Dzień 0	KONTROLA	0,28	0,24	0,51	0,10	0,26	0,45	9,32	5,34	1,72	14,92	12,43	415,60	83,83	18,58	36,66	1,24	5,25
	TRAMP-C2	0,33	0,41	0,60	0,11	0,35	0,56	11,71	7,48*	2,37	17,24	15,25	357,84	93,57	21,76	41,58	1,43	5,81
	TRAMP-C1	0,28	0,26	0,63	0,09	0,33	0,66	11,45	6,49	1,89	19,55*	18,18	419,86	86,11	22,21*	48,21*	1,64	5,85
Dzień 5	KONTROLA	0,23	0,21	0,69	0,14	0,32	0,79	10,48	6,76	2,30	12,17	14,54	966,49	163,61	39,49	30,56	3,39	7,97
	TRAMP-C2	0,25	0,22	0,73	0,04*	0,29	0,72	12,07	9,15	2,33	19,44	14,38	659,65	157,14	32,87	38,95	2,95	9,79
	TRAMP-C1	0,17	0,18	0,69	0,14	0,34	1,42	10,21	6,80**	2,05	12,66**	12,23	904,30	137,38	36,13	30,27	2,38	9,38
Dzień	KONTROLA	0,16	0,15	0,85	0,24	0,34	1,49	13,28	9,38	2,63	17,04	15,93	471,66	115,99	27,73	47,79	2,76	8,98
	TRAMP-C2	0,38	0,28	0,95	0,12	0,34	0,35*	10,54	6,29	2,44	13,27	14,60	552,70	129,89	28,83	53,11	3,92	6,74
	TRAMP-C1	0,08	0,07*	0,45	0,13	0,25	0,55	9,00	5,15	1,79	7,35*	7,16*	244,84*	62,49*	13,78*	25,62*	1,41*	5,39
Dzień	KONTROLA	0,34	0,25	0,90	0,13	0,50	0,63	11,29	8,30	2,46	15,85	13,44	561,61	112,51	27,97	44,20	2,40	8,02
	TRAMP-C2	0,32	0,08*	0,66	0,10	0,24*	0,87	7,22*	4,86	1,18*	6,24*	4,59*	163,60*	33,36*	8,48*	18,85*	1,43	3,51
	TRAMP-C1	0,40	0,12	0,83	0,09	0,20*	0,75	9,07	5,43	1,44*	6,93*	6,83	203,60*	50,56*	11,20*	23,77*	1,43	4,90
Dzień 57	KONTROLA	0,35	0,45	1,10	0,15	0,41	0,64	12,68	6,39	1,51	14,73	12,46	597,01	89,30	22,12	47,18	2,79	9,85
	TRAMP-C2	0,84	0,49	1,21	0,26	0,64	1,24	11,68	6,30	1,97	13,45	9,16	254,89*	61,49	16,21	69,46	2,34	14,48
	TRAMP-C1	0,51	0,16	1,04	0,08***	0,54	0,44	9,38	5,35	1,37	10,15	7,77	276,20*	67,74	15,41	44,33	2,66	13,85

\* Test U Manna-Whitneya, p<0.05 względem kontroli

\*\* Test U Manna-Whitneya, p<0.05 TRAMP-C2 vs. TRAMP-C1





Rysunek 17 Stężenie 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OH FAs) w próbkach kału w modelu nowotworu prostaty. Markery reprezentują rzędy: a. Bacteroidales; b. Fusobacteriales; c. Enterobacteriales

\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem kontroli; \*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  TRAMP-C2 vs. TRAMP-C

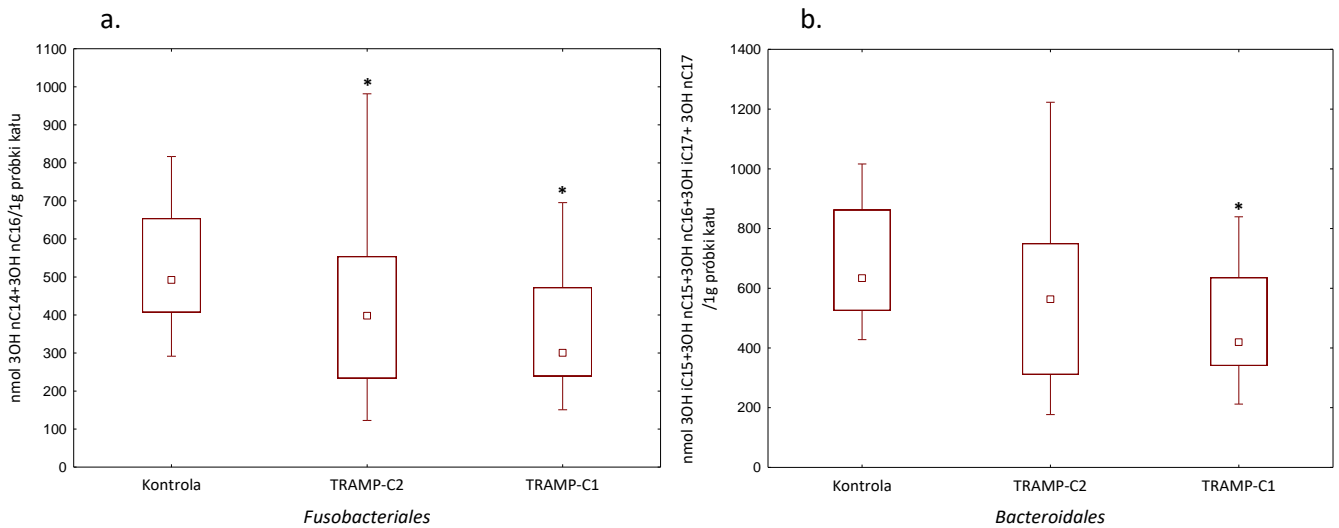
Tabela 19 Stężenie 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OH FAs) w próbkach kału w modelu nowotworu prostaty, z wyróżnieniem odpowiadających im rzędów.

		3-OH FAs [nmol/g kału]		
		<i>Enterobacteriales</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Fusobacteriales</i>
0. dzień	kontrola	9,32	529,96	411,91
	TRAMP-C2	11,8	504,71	359,51
	TRAMP-C1	11,69	624,62	472,26
5. dzień	kontrola	10,41	795,61	629,26
	TRAMP-C2	10,77	750,18	554,13
	TRAMP-C1	10,21	1025,32	865,12
21. dzień	kontrola	12,73	646,84	459,83
	TRAMP-C2	10,02	812,19	593,8
	TRAMP-C1	8,63	337,92	238,2
40. dzień	kontrola	10,99	633,6	491,9
	TRAMP-C2	6,28	192,55	140,13
	TRAMP-C1	8,99	318,5	239,52
57. dzień	kontrola	13,31	749,58	607,38
	TRAMP-C2	10,2	377,8	261,28
	TRAMP-C1	9,4	392,05	287,64

\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem kontroli

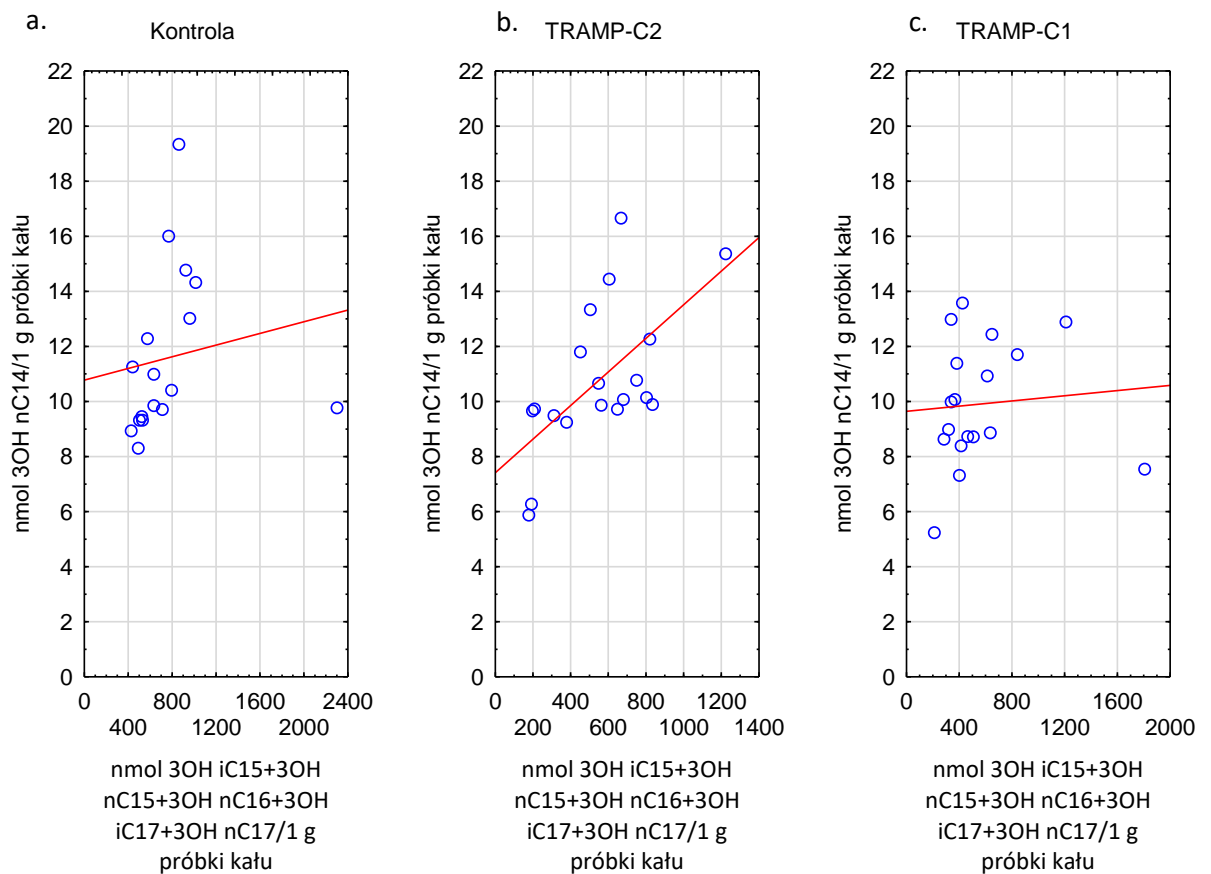
\*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  TRAMP-C2 vs. TRAMP-C1

Porównanie stężenia markerów LPS na poziomie rzędów wykazało, że myszy z nowotworem w obu grupach (TRAMP-C1 i TRAMP-C2) charakteryzowało istotnie niższe stężenie markerów *Fusobacteriales* w kale. Podobną zależność obserwowano dla rzędu *Bacteroidales*, ale tylko dla grupy TRAMP-C1 (Rys. 18, Tab.19).



Rysunek 18 Stężenie 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OH FAs) w próbkach kału w modelu nowotworu prostaty, z wyróżnieniem odpowiadających im rzędów.

\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem kontroli



Rysunek 19 Relacja między rzędami Enterobacteriales (marker: 3-OH nC14) i Bacteroidales (markery: 3-OH (iC15+nC15+nC16+iC17+nC17)) w próbkach kału w modelu nowotworu prostaty

Zależność pomiędzy markerami LPSu charakterystycznymi dla rzędów *Enterobacteriales* i

*Bacteroidales* wykazała, że tylko w grupie z silnie inwazyjnym nowotworem prostaty TRAMP-C2 wystąpiło przesunięcie równowagi mikrobioty w kierunku *Enterobacteriales* (za sprawą wzrostu stężenia 3-OH *n*C14) (Rys. 19c). Wynik ten wskazuje na znaczenie obecności nowotworu dla modyfikacji mikrobiomu jelitowego i wywołany stan zapalny, prawdopodobnie z uwagi na obecność LPSu zawierającego 3-OH *n*C14 - struktury wchodzącej u licznych *Enterobacteriales* w skład makrocząsteczki będącej ligandem dla receptora TLR4 (Rys. 19).

#### 6.1.4. Zależności pomiędzy metabolitami bakteryjnymi (SCFAs) a markerami LPSu w modelu nowotworu prostaty

W modelu nowotworu prostaty o łagodniejszym przebiegu TRAMP-C1 poziom 3-OH *i*C16:0, *i*C17 i *a*C17, charakterystycznych dla rzędu *Bacteroidales*, dodatnio korelował ze stężeniem kwasu octowego i propionowego, co potwierdza, że przedstawiciele tego rzędu wydajnie produkują zarówno kwasu propionowy, jak i octowy (Tab. 20).

Tabela 20 Korelacje pomiędzy metabolitami bakteryjnymi (SCFAs) a markerami LPSu w modelu nowotworu prostaty. Korelacja rangowa Spearmana,  $p < 0.05$

		R	p
kontrola	Kwas propionowy vs. 3-OH <i>n</i> C12:0	-0,51	0,039
TRAMP-C2	Kwas octowy vs. 3-OH <i>n</i> C12:0	-0,56	0,015
	Kwas propionowy vs. 3-OH <i>n</i> C12:0	-0,6	0,009
	Kwas propionowy vs. 3-OH <i>n</i> C13:0	-0,48	0,043
TRAMP-C1	Kwas octowy vs. 3-OH <i>i</i> C16:0	0,51	0,033
	Kwas octowy vs. 3-OH <i>i</i> C17:0	0,54	0,021
	Kwas octowy vs. 3-OH <i>a</i> C17:0	0,57	0,013
	Kwas propionowy vs. 3-OH <i>i</i> C16:0	0,49	0,038
	Kwas propionowy vs. 3-OH <i>a</i> C17:0	0,55	0,019

W oparciu o analizę markerów LPS zaobserwowano korelacje pomiędzy rzędami bakterii i stężeniem SCFAs w grupie kontrolnej (zdrowych myszy), w tym ujemną korelację kwasu propionowego i rzędu *Enterobacteriales*. W grupie myszy z nowotworem prostaty indukowanym komórkami TRAMP-C2 zaobserwowano liczne korelacje w zakresie SCFAs oraz dodatnie korelacje bakterii rzędu *Enterobacteriales*, *Bacteroidales* i *Fusobacteriales*. W grupie z nowotworem prostaty indukowanym komórkami mniej inwazyjnymi TRAMP-C1 wystąpiła korelacja poziomu

kwasów octowego, masłowego i propionowym oraz dodatnia korelacja z rzędów *Bacteroidales* i *Fusobacteriales* z kwasem octowym (Tab. 21).

Tabela 21 Korelacje pomiędzy metabolitami bakteryjnymi (SCFAs) a bakteriami wybranych rzędów. Korelacja rangowa Spearmana,  $p < 0.05$

		R	t(N-2)	p
<b>kontrola</b>	<i>Enterobacteriales</i> & <i>Bacteroidales</i>	0,63	3,16	0,007
	<i>Enterobacteriales</i> & <i>Fusobacteriales</i>	0,60	2,91	0,011
	<i>Enterobacteriales</i> & Kwas propionowy	-0,49	-2,18	0,046
	<i>Bacteroidales</i> & <i>Fusobacteriales</i>	0,99	24,51	0,000
	Kwas octowy & Kwas propionowy	0,77	4,81	0,000
<b>TRAMP-C2</b>	<i>Enterobacteriales</i> & <i>Bacteroidales</i>	0,66	3,62	0,002
	<i>Enterobacteriales</i> & <i>Fusobacteriales</i>	0,57	2,89	0,010
	<i>Bacteroidales</i> & <i>Fusobacteriales</i>	0,97	15,57	0,000
	Kwas octowy & Kwas propionowy	0,87	6,92	0,000
	Kwas octowy & Kwas masłowy	0,82	5,74	0,000
	Kwas propionowy & Kwas masłowy	0,77	4,84	0,000
<b>TRAMP-C1</b>	<i>Bacteroidales</i> & <i>Fusobacteriales</i>	0,97	16,28	0,000
	<i>Bacteroidales</i> & Kwas octowy	0,56	2,59	0,020
	Kwas octowy & Kwas masłowy	0,53	2,61	0,018
	Kwas propionowy & Kwas octowy	0,89	8,02	0,000

### Podsumowanie

Wyniki tego eksperymentu wykazały znaczną zmienność mikrobiomu jelitowego u myszy z nowotworem prostaty w trakcie procesu chorobowego. Takie zaburzenie homeostazy ekosystemu jelitowego może wynikać z ucisku guzów nowotworowych prostaty na jelita bądź, co bardziej prawdopodobne, z postępującego procesu zapalnego. Należy zauważyć, że w omawianym eksperymencie nowotwór prostaty nie był bezpośrednio związany z układem pokarmowym.

Analiza markerów LPS oraz metabolitów bakteryjnych pokazała, że szczególnie intensywne zmiany mikrobiomu zachodziły w środkowej fazie badań, gdy przyrost guzów prostaty był największy. Stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych oznaczane w kale było wtedy istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej; w przypadku nowotworu prostaty indukowanego komórkami o bardziej inwazyjnym charakterze TRAMP-C2 wzrost stężenia SCFA następował wcześniej niż w przypadku modelu TRAMP-C1.

Populacja bakterii produkujących SCFA w tych warunkach zwiększała się, nasilał się także proces zapalny, co wpłynęło na absorpcję ich metabolitów przez kolonocyty i wzrost wydalania SCFA z kałem. Jednocześnie miał miejsce znaczny spadek stężenia markerów *Bacteroidales* w

grupach myszy TRAMP-C1 i TRAMP-C2.

Wyniki wstępnych doświadczeń obejmujące dane na temat stężenia metabolitów i markerów bakterii potwierdziły możliwość wprowadzenia tych oznaczeń do badania ekosystemu jelitowego. Uznane zostały za dobre uzupełnienie planowanego sekwencjonowania NGS, prowadzące do celu, tj. wyjaśnienia zależności w mikrobiomie jelitowym podczas rozwijającego się procesu nowotworowego i równoległe występującego zapalenia. Obserwacje te zostały wykorzystane w kolejnych eksperymentach.

## 6.2. Model nowotworu jelita grubego MC38/EGFP - model podskórny

W doświadczeniu na modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP komórki nowotworowe były podane podskórnie, wprowadzona została pasza z wysoką zawartością  $\alpha$ -celulozy (pasza wysokobłonnikowa), w związku z tym wydzielono cztery grupy myszy: pod względem podania lub niepodania komórek MC38/EGFP oraz diety (paszy) wysokobłonnikowej (DW) i diety (paszy) standardowej (DS).

### 6.2.1. Bakterie mikrobiomu jelitowego myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38-EGFP - sekwencjonowanie NGS

Profil mikrobioty jelitowej w grupach myszy otrzymujących dietę z wysoką zawartością  $\alpha$ -celulozy (20%) w istotny sposób różni się od grup utrzymywanych na paszy standardowej (5%  $\alpha$ -celulozy): zarówno grupa z nowotworem (MC38/EGFP-DS), jak i kontrolna (K-DS) charakteryzowały się większym udziałem *Actinobacteria* oraz *Firmicutes* (głównie bakterie Gram-dodatnie), a mniejszą *Verrucomicrobia* i *Bacteroidetes* (bakterie Gram-ujemne) (Rys. 20). Sekwencjonowanie próbek kału przeprowadzono interwałach czasowych, w dniu 0., 15., 30. i 45.

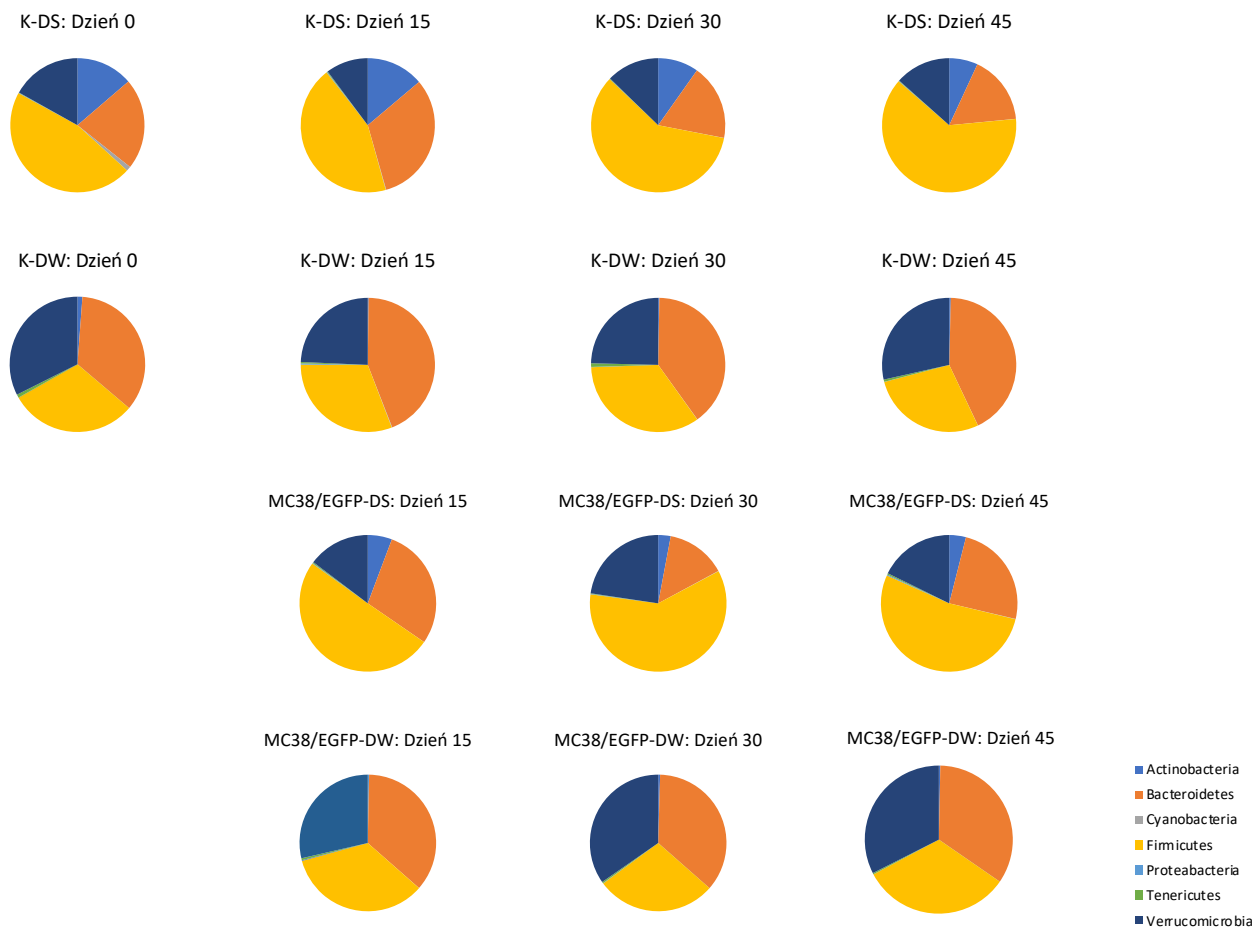
Grupy z nowotworem charakteryzowały się mniejszym udziałem *Actinobacteria* i *Verrucomicrobia* w porównaniu do grupy kontrolnej, natomiast w mikrobiomie myszy otrzymujących paszę wysokobłonnikową (MC38/EGFP-DW) odnotowano wzrost udziału *Verrucomicrobia* na niekorzyść *Bacteroidetes* (w porównaniu do grupy kontrolnej). Dieta wysokobłonnikowa istotnie wpływała na skład mikrobiomu jelitowego, ponieważ u myszy otrzymujących paszę o zwiększonej zawartości  $\alpha$ -celulozy wzrastał udział *Bacteroidetes* oraz *Verrucomicrobia*, a obniżał *Actinobacteria* i *Firmicutes*. Zmiany te dotyczyły myszy zdrowych otrzymujących dietę wysokobłonnikową, jak też zwierząt chorych, chociaż w mniejszym stopniu (Rys. 21).

Ogólna zależność w mikrobiomie myszy zdrowych względem myszy z nowotworem

dotyczyła dominacji *Verrucomicrobia* nad *Firmicutes*, których poziom wzrastał w obecności rozwijającego się guza (Rys. 21).

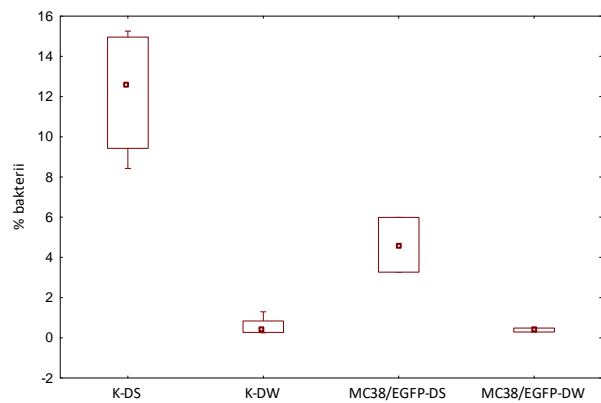
Pasza wzbogacona  $\alpha$ -celulozą znacząco zmieniała proporcje bakterii w mikrobiocie, stymulując preferencyjny rozwój *Bacteroidetes*, *Tenericutes* oraz *Verrucomicrobia* i redukując poziom *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* oraz *Firmicutes*. Różnice pomiędzy grupami kontrolnymi a grupami z nowotworem nie były statystycznie istotne, wydaje się więc, że to dieta była kluczową zmienną wpływającą na skład mikrobioty, a nie toczący się proces chorobowy (Rys. 21, 22).

Obecność nowotworu miała wpływ na preferencyjny wzrost bakterii z rodzaju *Bacteroides*, *Dehalobacterium* i *Ruminococcus* oraz rodziny *Christensenellaceae*. Przewlekły stan chorobowy wiązał się ze spadkiem poziomu bakterii rodziny *Rhodospirillaceae*, ale rozwijający się nowotwór miał mniejszy wpływ na mikrobiom jelitowy niż wzrost zawartości błonnika pokarmowego w paszy. W tabelach (Tab. 22, 23, 24) wykazano istotne statystycznie różnice pomiędzy rodzajami bakterii.



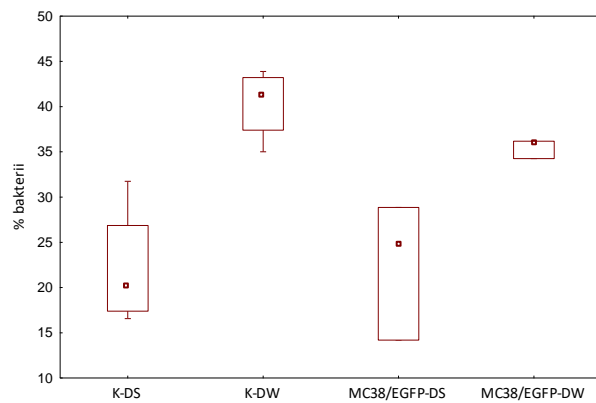
Rysunek 20 Wykresy schematycznie ukazujące proporcje typów bakterii w badanych próbkach





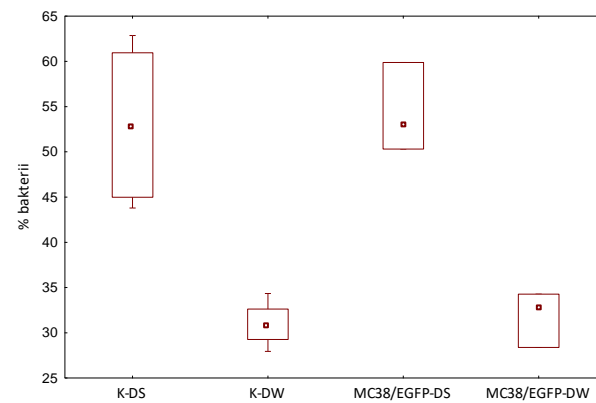
*Actinobacteria*

Test Kruskala-Wallis, p=0,0116



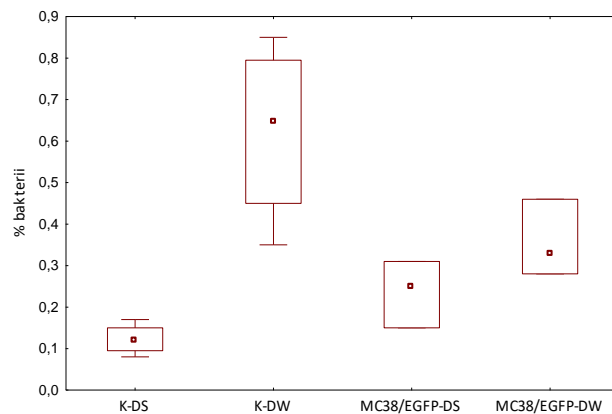
*Bacteroidetes*

Test Kruskala-Wallis, p=0,0159



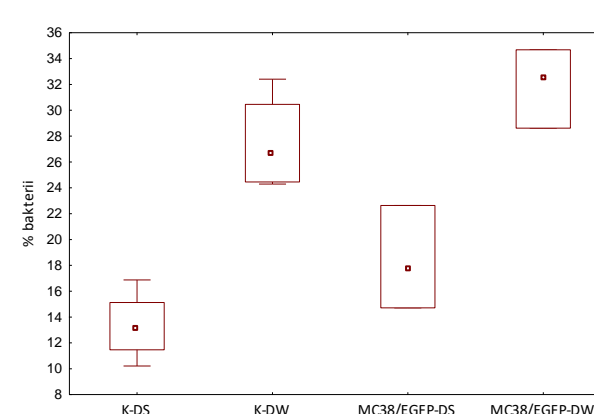
*Firmicutes*

Test Kruskala-Wallis, p=0,0197



*Tenericutes*

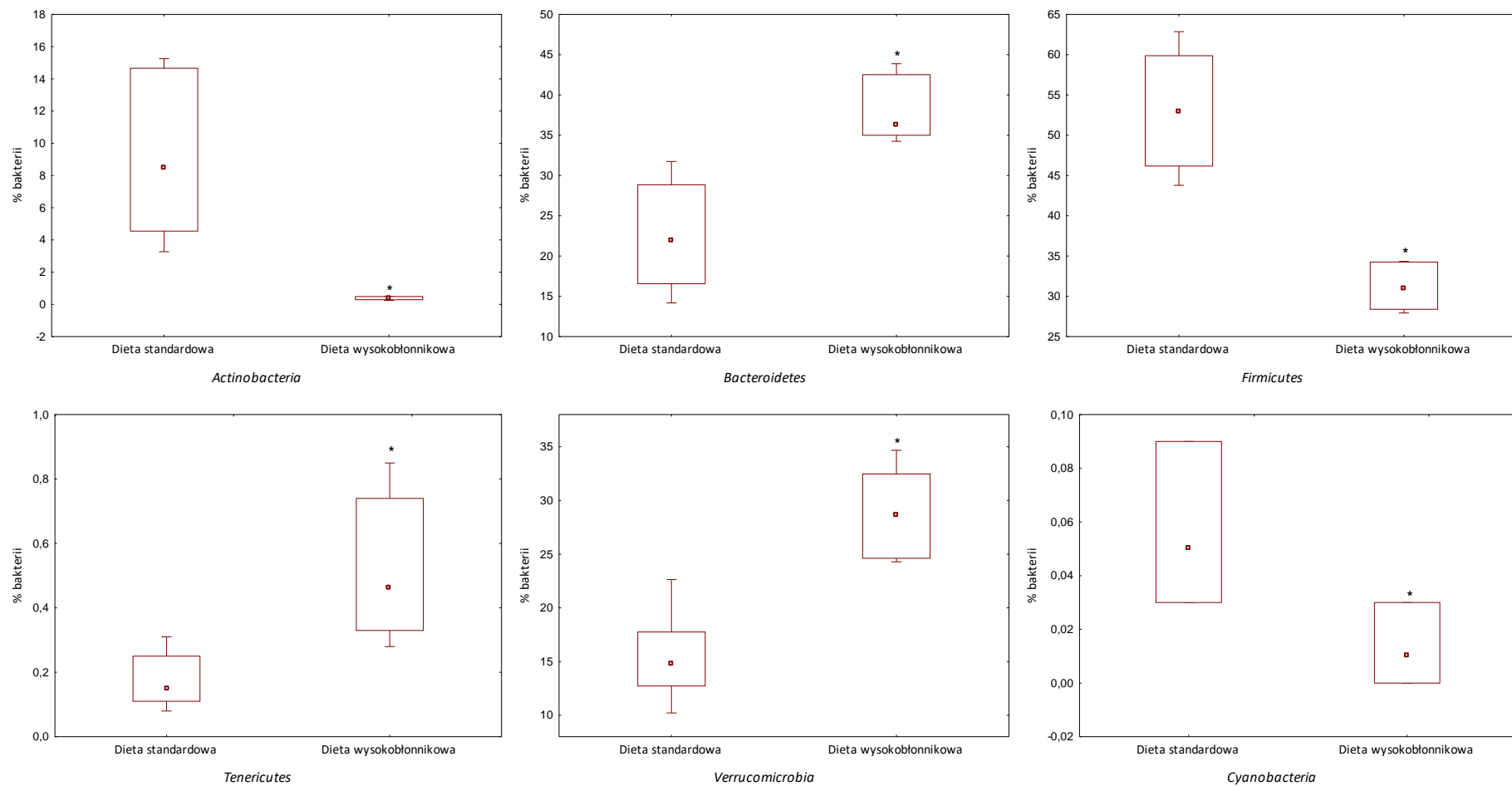
Test Kruskala-Wallis, p=0,0113



*Verrucomicrobia*

Test Kruskala-Wallis, p=0,0095

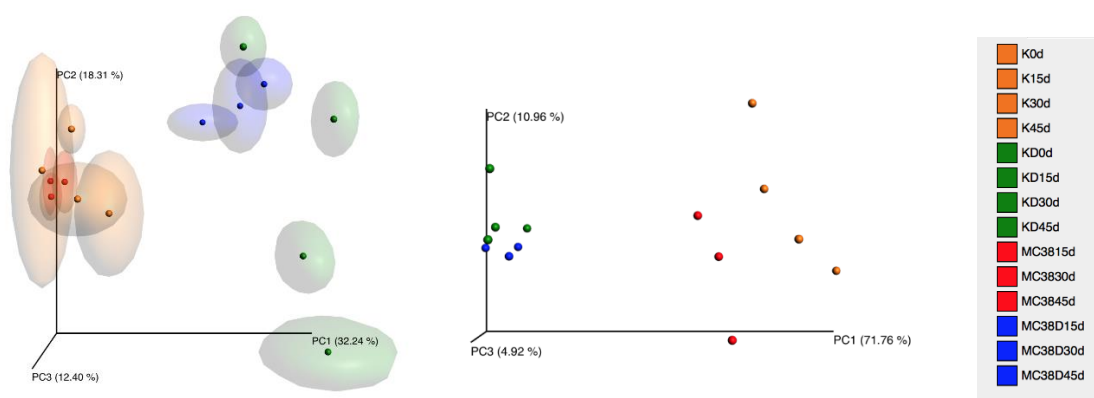
Rysunek 21 Udział procentowy bakterii na poziomie taksonomicznym typu. K – grupa kontrolna; MC38 – grupa z nowotworem; DS – dieta standardowa; DW – dieta wzbogacona błonnikami –  $\alpha$ -celulozą



Rysunek 22 Udział procentowy bakterii w kale na poziomie taksonomicznym typu. K – grupa kontrolna; MC38 – grupa z nowotworem; DS – dieta standardowa; DW – dieta wzbogacona błonnikiem –  $\alpha$ -celulozą \* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS

W przypadku zwiększonej podaży  $\alpha$ -celulozy (5% vs. 20%) w mikrobiomie jelitowym myszy następował spadek licznosci *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Adlercreutzia*, *Lactobacillus*, *Allobaculum* i *Ralstonia* oraz bakterii rodzin *Coriobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Peptostreptococcaceae* i *Mogibacteriaceae*. Pasza z wysoką zawartością błonnika sprzyjała **wzrostowi** obecności *Parabacteroides*, *Coprobacillus*, *Anaeroplasma* oraz *Akkermansia* (Tab. 23, 24 i 25).

Różnorodność  $\beta$  mikrobiomów zobrażowano na wykresie PCoA (analiza głównych składowych) na podstawie metryki UniFrac unweighted i weighted (Rys. 23).



Rysunek 23 Różnorodność  $\beta$  mikrobiomów zobrażowana na wykresie PCoA (analiza głównych składowych) na podstawie metryki UniFrac unweighted i weighted; główne osie zmienności zostały wyodrębnione z macierzy odległości. Obecność błonnika ( $\alpha$ -celulozy) wpływa na skład mikrobioty. Każdy punkt reprezentuje grupę badaną. a. unweighted PCoA; b. weighted PCoA

Tabela 22 Mediana ilości odczytów sekwencji DNA (NGS) w grupach, na poziomie rodzaju; K – kontrona, MC38 – nowotwór jelita grubego (różnie istotnie statystycznie); Test Kruskalla-Wallisa,  $p < 0,05$

Rodzaj	K-DS	K-DW	MC38/EGFP-DS	MC38/EGFP-DW
	[mediana odczytów]			
<i>k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Propionibacteriaceae;g__Propionibacterium</i>	9	4	23↑	2↓
<i>k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Bifidobacteriales;f__Bifidobacteriaceae;g__Bifidobacterium</i>	685	0↓	193↓	3↓
<i>k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae;g__</i>	5827	1↓	1394↓	0↓
<i>k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae;g__Adlercreutzia</i>	584	182↓	632	199↓
<i>k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__;g__</i>	0	0	1183↑	0
<i>k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Bacteroides</i>	16	1	403↑	1173↑
<i>k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Rikenellaceae;g__</i>	295	6355	2111↑	4165↑
<i>k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__S24-7;g__</i>	10446	7781	7894	3366↑
<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus</i>	5940	2933↓	8491	2962↓
<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;Other;Other</i>	3	0↓	4	0↓
<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__;g__</i>	3004	6507↑	5767	4906
<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Christensenellaceae;g__</i>	3	2	10↑	4
<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Clostridiaceae;g__</i>	259	50	625↑	87
<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Dehalobacteriaceae;g__Dehalobacterium</i>	30	50	68	84↑
<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;Other</i>	2	0	14↑	2
<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__[Mogibacteriaceae];g__</i>	9	4	16	2↓
<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Erysipelotrichi;o__Erysipelotrichales;f__Erysipelotrichaceae;g__</i>	147	393↑	93	517↑
<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Erysipelotrichi;o__Erysipelotrichales;f__Erysipelotrichaceae;g__Allobaculum</i>	13612	2↓	6696↓	650↓
<i>k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__RF32;f__;g__</i>	13	0↓	34	11
<i>k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Oxalobacteraceae;g__Ralstonia</i>	38	17	39	2↓
<i>k__Bacteria;p__Tenericutes;c__Mollicutes;o__Anaeroplasmatales;f__Anaeroplasmataceae;g__Anaeroplasma</i>	55	305↑	93	136
<i>k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__Verrucomicrobiae;o__Verrucomicrobiales;f__Verrucomicrobiaceae;g__Akkermansia</i>	8526	14109↑	9469	17751↑

Tabela 23 Rodzaje bakterii uzyskane w wyniku sekwencjonowania NGS próbek kału z podziałem na zwierzęta zdrowe i chore (różnice się istotnie statystycznie), Test Mann'a-Whitney'a,  $p < 0,05$

Rodzaj	Kontrola	MC38/EGFP
	[mediana odczytów]	
<i>k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__g__</i>	0	966↑
<i>k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Bacteroides</i>	1	1089↑
<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Christensenellaceae;g__</i>	3	7↑
<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Dehalobacteriaceae;g__Dehalobacterium</i>	35	75↑
<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__Ruminococcus</i>	149	216↑
<i>k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhodospirillales;f__Rhodospirillaceae;g__</i>	2	0↓

Tabela 24 Rodzaje bakterii uzyskane w wyniku sekwencjonowania NGS próbek kału z podziałem na stosowaną dietę (różnice się istotnie statystycznie), Test Mann'a-Whitney'a,  $p < 0,05$

Rodzaj	Dieta standardowa	Dieta wysokobłonnikowa
	[mediana odczytów]	
<i>k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Propionibacteriaceae;g__Propionibacterium</i>	12	2↓
<i>k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Bifidobacteriales;f__Bifidobacteriaceae;g__Bifidobacterium</i>	378	0↓
<i>k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae;g__</i>	2765	1↓
<i>k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae;g__Adlercreutzia</i>	588	199↓
<i>k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Porphyromonadaceae;g__Parabacteroides</i>	1304	6512↑
<i>k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Rikenellaceae;g__</i>	631	6062↑
<i>k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__Chloroplast;o__Streptophyta;f__</i> ;g__	3	0↓
<i>k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__ML635J-21;o__</i> ;f__	18	6↓
<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus</i>	6970	2962↓
<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;Other;Other</i>	3	0↓
<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Clostridiaceae;g__</i>	267	62↓
<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Peptostreptococcaceae;g__</i>	3329	1315↓
<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__[Mogibacteriaceae];g__</i>	12	3↓
<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Erysipelotrichi;o__Erysipelotrichales;f__Erysipelotrichaceae;g__</i>	123	492↑
<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Erysipelotrichi;o__Erysipelotrichales;f__Erysipelotrichaceae;g__Allobaculum</i>	10098	414↓
<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Erysipelotrichi;o__Erysipelotrichales;f__Erysipelotrichaceae;g__Coprobacillus</i>	1	77↑
<i>k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__RF32;f__</i> ;g__	13	0↓
<i>k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Oxalobacteraceae;g__Ralstonia</i>	39	10↓
<i>k__Bacteria;p__Tenericutes;c__Mollicutes;o__Anaeroplasmatales;f__Anaeroplasmataceae;g__Anaeroplasma</i>	73	220↑
<i>k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__Verrucomicrobiae;o__Verrucomicrobiales;f__Verrucomicrobiaceae;g__Akkermansia</i>	9401	15877↑

## 6.2.2. Profil markerów lipopolisacharydów

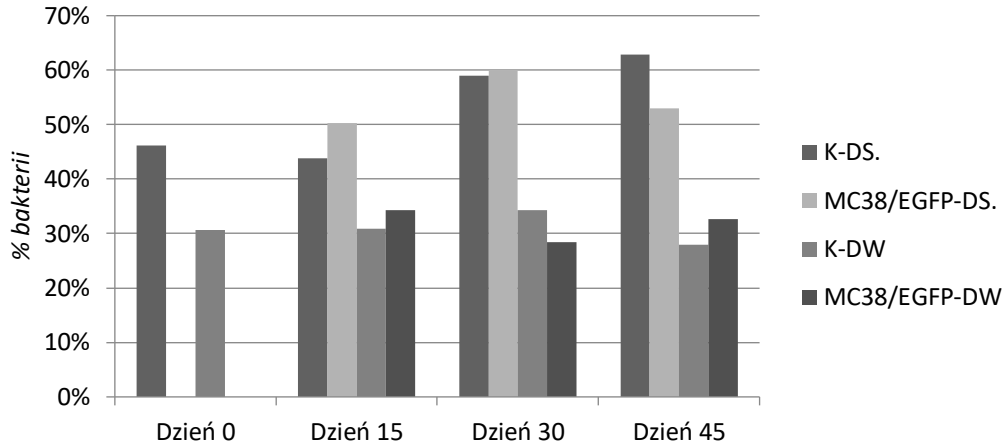
U myszy otrzymujących paszę wysokobłonnikową (20%  $\alpha$ -celulozy) występowała zmieniona proporcja *Firmicutes* do *Bacteroidetes* oraz obniżone stężenie 3-OH FAs, markerów LPSu, w porównaniu do myszy otrzymujących paszę standardową. Dieta wysokobłonnikowa sprzyjała spadkowi poziomu *Firmicutes*, a wzrostowi *Bacteroidetes*. Można zauważyć, że u zwierząt spożywających paszę o zwiększonej zawartości  $\alpha$ -celulozy, pomimo wzrostu poziomu *Bacteroidetes* (bakterie Gram-ujemne) i spadkiem *Firmicutes* (głównie bakterie Gram-dodatnie), ogólne stężenie markerów LPSu w kale myszy obniżało się (Rys. 24, 25, 26).

Sekwencjonowanie NGS wykazało, że myszy z nowotworem MC38/EGFP charakteryzowały się zwiększoną zawartością bakterii rodzaju *Bacteroides*, co potwierdziła analiza profilu 3-OH FAs: u tych myszy występuje wzrost stężenia 3-OH FAs charakterystycznych dla *Bacteroides*.

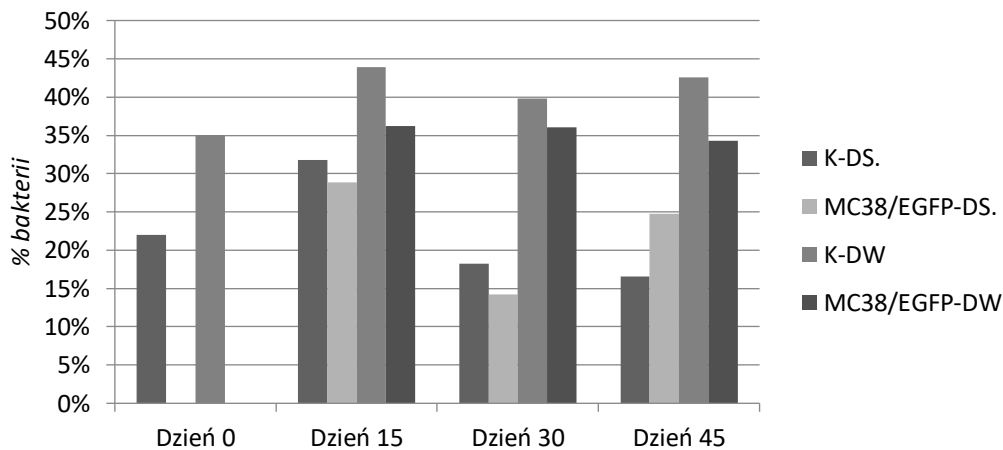
Stężenie SCFA u tej grupy było obniżone w stosunku do stężenia SCFA w grupach otrzymujących paszę z 5%-zawartością  $\alpha$ -celulozy (wyjątkiem jest kwas mlekowy).

Tabela 25 Udział bakterii typu *Firmicutes* i *Bacteroidetes* w mikrobiomie jelitowym myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP, na podstawie markerów 3-OH FAs; K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza)

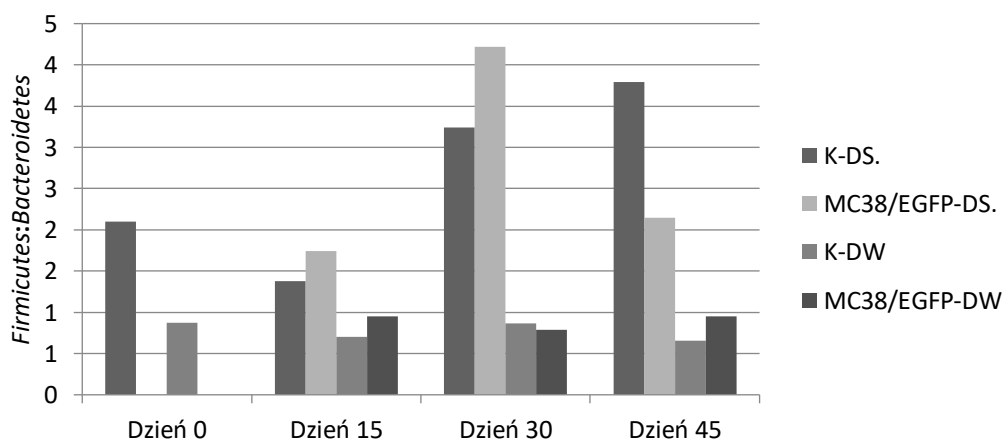
		0.dzień	15.dzień	30.dzień	45.dzień
<b>K-DS</b>	<i>Firmicutes</i>	46,19%	43,79%	59,03%	62,87%
	<i>Bacteroidetes</i>	21,97%	31,75%	18,21%	16,57%
	<b><i>Firmicutes: Bacteroidetes</i></b>	<b>2,1</b>	<b>1,38</b>	<b>3,24</b>	<b>3,79</b>
<b>K-DW</b>	<i>Firmicutes</i>	30,60%	30,91%	34,34%	27,94%
	<i>Bacteroidetes</i>	35,01%	43,89%	39,78%	42,53%
	<b><i>Firmicutes: Bacteroidetes</i></b>	<b>0,874</b>	<b>0,704</b>	<b>0,863</b>	<b>0,657</b>
<b>MC38/EGFP-DS</b>	<i>Firmicutes</i>		50,31%	59,88%	52,97%
	<i>Bacteroidetes</i>		28,85%	14,19%	24,72%
	<b><i>Firmicutes: Bacteroidetes</i></b>		<b>1,74</b>	<b>4,22</b>	<b>2,14</b>
<b>MC38/EGFP-DW</b>	<i>Firmicutes</i>		34,27%	28,39%	32,60%
	<i>Bacteroidetes</i>		36,18%	36,02%	34,26%
	<b><i>Firmicutes: Bacteroidetes</i></b>		<b>0,947</b>	<b>0,788</b>	<b>0,952</b>



Rysunek 24 Udział bakterii typu Firmicutes w mikrobiomie jelitowym myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP na podstawie markerów 3-OH FAs; K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza)



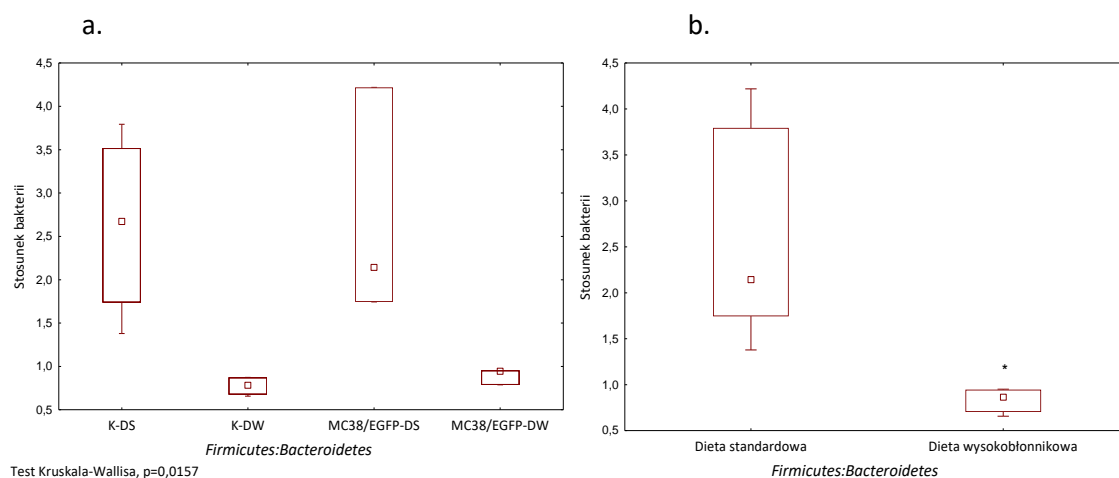
Rysunek 25 Udział bakterii typu Bacteroidetes w mikrobiomie jelitowym myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP na podstawie markerów 3-OH FAs; K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza)



Rysunek 26 Proporcja Firmicutes i Bacteroidetes w mikrobiomie jelitowym myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP na podstawie markerów 3-OH FAs; K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza)



Myszy otrzymujące paszę z wyższą zawartością  $\alpha$ -celulozy charakteryzowały się niższym stosunkiem *Firmicutes*:*Bacteroidetes* w porównaniu do grup kontrolnych (Rys. 27).



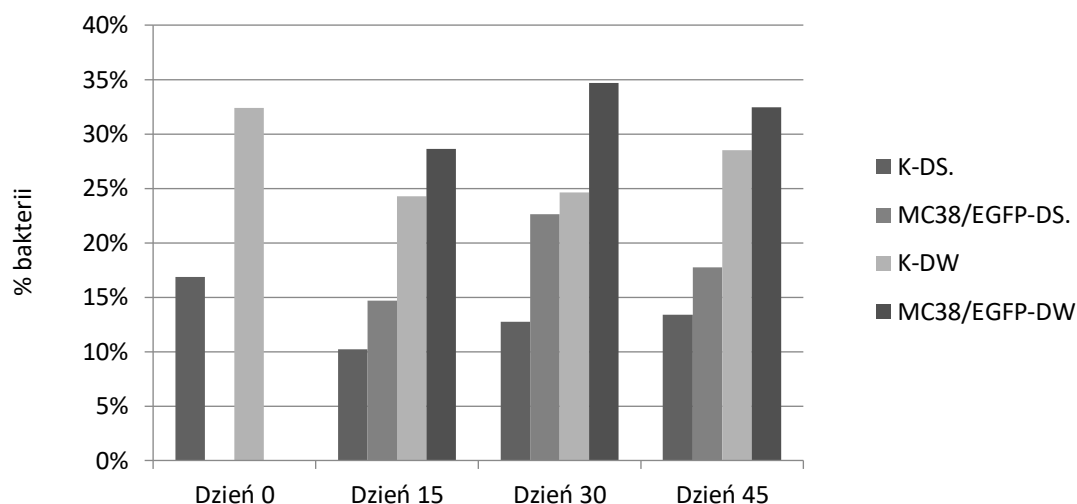
Rysunek 27 Proporcja *Firmicutes* i *Bacteroidetes* w mikrobiomie jelitowym myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP na podstawie markerów 3-OH FAs, a. względem grup myszy z nowotworem; b. względem otrzymywanej paszy. K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza)

#### 6.2.2.1. Analiza wybranych taksonów w mikrobiomie jelitowym - *Akkermansia muciniphila*

Obecność bakterii Gram-ujemnych *Akkermansia muciniphila*, znakomitych producentów SCFA (szczególnie kwasu octowego) w istotny sposób zwiększyła się u myszy otrzymujących paszę wysokobłonnikową (Tab. 26), także w grupach myszy z nowotworem MC38/EGFP (Rys. 28).

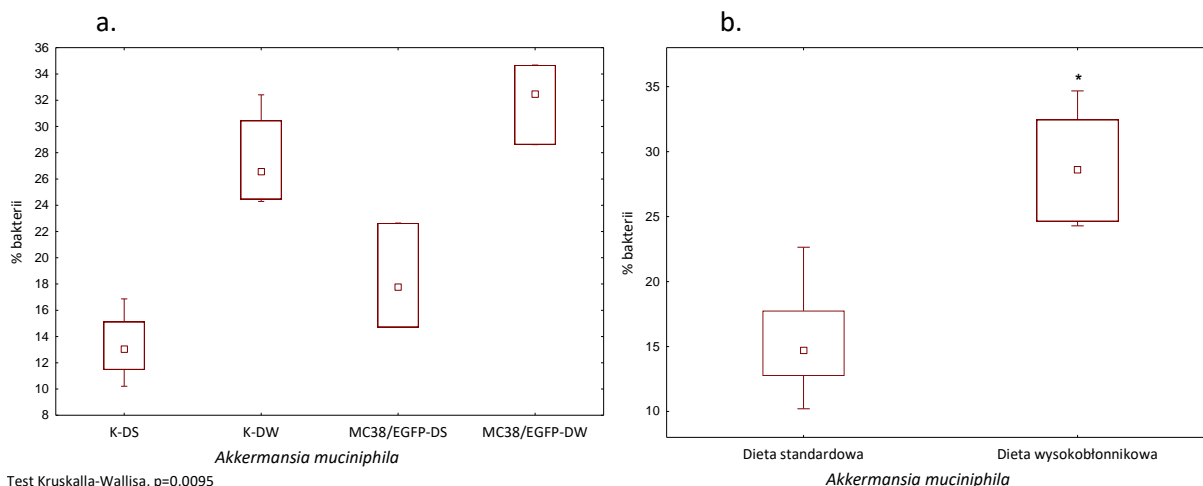
Tabela 26 Udział *Akkermansia muciniphila* w mikrobiomie myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP na podstawie sekwencjonowania NGS; K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza)

	<b><i>Akkermansia muciniphila</i> [% bakterii w mikrobiomie]</b>			
	0. dzień	15. dzień	30. dzień	45. dzień
<b>K-DS</b>	16,87%	10,21%	12,73%	13,38%
<b>K-DW</b>	32,41%	24,29%	24,62%	28,50%
<b>MC38/EGFP-DS</b>	16,87%	14,71%	22,64%	17,76%
<b>MC38/EGFP-DW</b>	32,41%	28,62%	34,68%	32,47%



Rysunek 28 Udział *Akkermansia muciniphila* w mikrobiomie myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP na podstawie sekwencjonowania NGS; K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS.-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza)

Dostęp myszy do paszy o zwiększonej zawartości  $\alpha$ -celulozy ma kluczowe znaczenie dla występowania bakterii *Akkermansia muciniphila* (Rys 29).



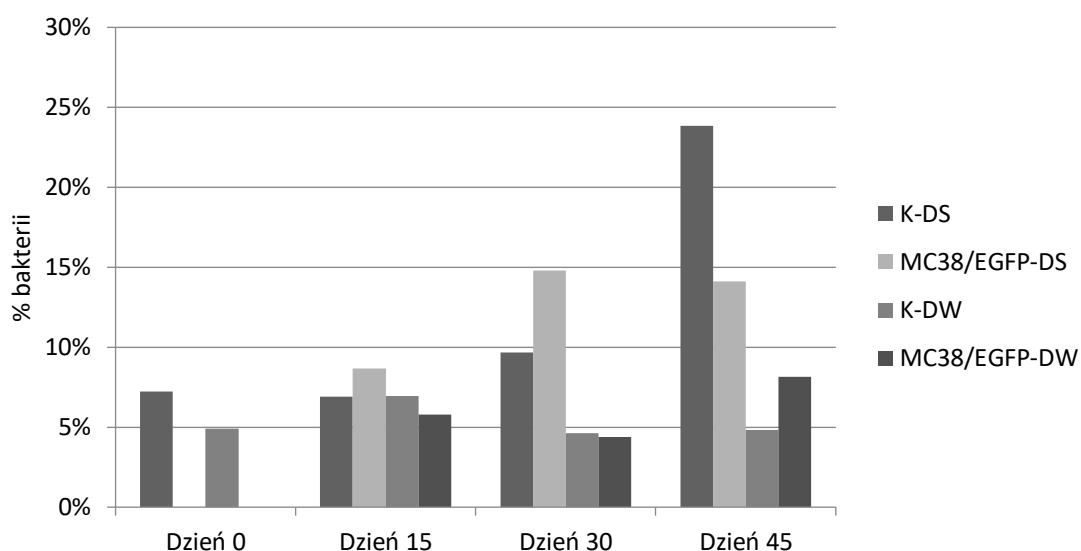
Rysunek 29 Udział *Akkermansia muciniphila* w mikrobiomie jelitowym myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP na podstawie NGS; a. względem grup myszy z nowotworem; b. względem otrzymywanej paszy. K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza)

### 6.2.2.2. Analiza wybranych taksonów w mikrobiomie jelitowym - rodzaj *Lactobacillus*

Obecność rodzaju *Lactobacillus* w mikrobiomie jelitowym była obniżona w grupach otrzymujących paszę wysokobłonnikową w stosunku do grupy z paszą standardową, tak na poziomie rodzaju (Tab. 27, Rys. 30), jak i poziomie gatunku *L. reuteri* (Tab. 28, Rys. 31, 32)

Tabela 27 Udział *Lactobacillus spp.* w mikrobiomie myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP na podstawie sekwencjonowania NGS; K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza)

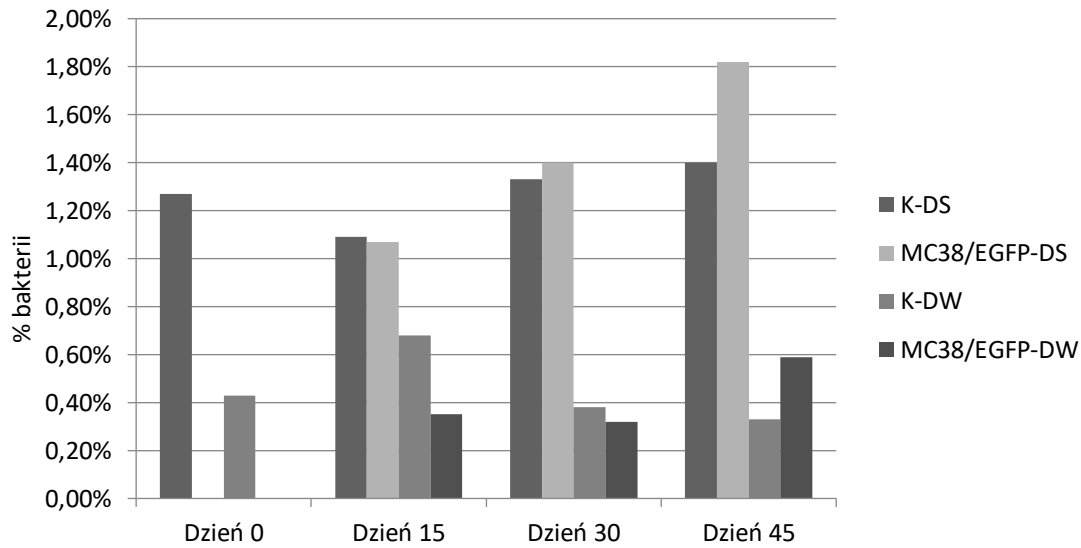
<i>Lactobacillus spp.</i> [% bakterii]				
	0. dzień	15. dzień	30. dzień	45. dzień
<b>K-DS</b>	7,22%	6,91%	9,68%	23,86%
<b>K-DW</b>	4,91%	6,95%	4,62%	4,83%
<b>MC38/EGFP-DS</b>	7,22%	8,68%	14,78%	14,11%
<b>MC38/EGFP-DW</b>	4,91%	5,77%	4,37%	8,13%



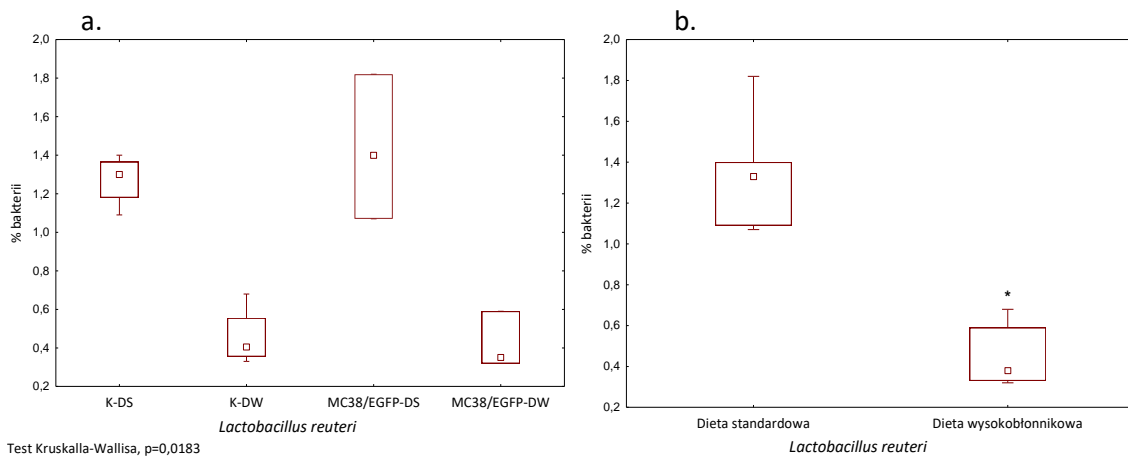
Rysunek 30 Udział *Lactobacillus spp.* w mikrobiomie myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP na podstawie sekwencjonowania NGS; K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza)

Tabela 28 Procentowy udział bakterii *Lactobacillus reuteri* w modelu nowotworu jelita grubego

<i>Lactobacillus reuteri</i> [% bakterii]				
	0. dzień	15. dzień	30. dzień	45. dzień
<b>K-DS</b>	1,27%	1,09%	1,33%	1,40%
<b>K-DW</b>	0,43%	0,68%	0,38%	0,33%
<b>MC38/EGFP-DS</b>	1,27%	1,07%	1,40%	1,82%
<b>MC38/EGFP-DW</b>	0,43%	0,35%	0,32%	0,59%

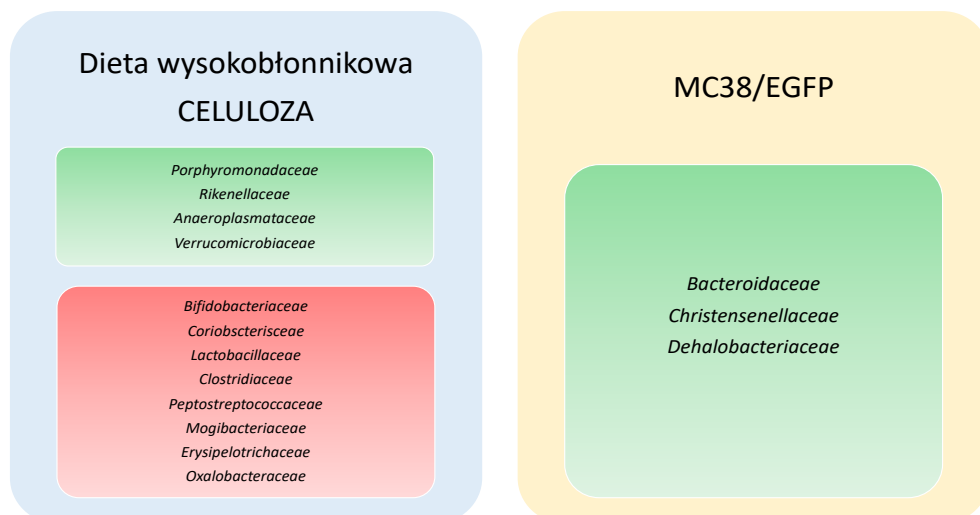


Rysunek 31 Udział *Lactobacillus reuteri* w mikrobiomie myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP na podstawie sekwencjonowania NGS; K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza)



Rysunek 32 Udział *Lactobacillus reuteri* w mikrobiomie jelitowym myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP na podstawie NGS; a. względem grup myszy z nowotworem; b. względem otrzymywanej paszy. K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza)

Podsumowując, podawanie paszy z wysoką zawartością  $\alpha$ -celulozy miało większe znaczenie dla składu mikrobiomu jelitowego myszy niż postępujący proces nowotworowy.



### 6.2.3. Metabolity bakterii jelitowych – krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA) w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP

#### 6.2.3.1. *Profil SCFA w próbkach kału*

Stężenie **kwasu mlekowego** oznaczane w kale było zmienne w zależności od etapu eksperymentu oraz w zależności od grupy myszy badanych. Wzrost stężenia SCFA występował w zaawansowanej fazie nowotworu; zarówno dla grupy kontrolnej otrzymującej paszę o zwiększonej zawartości  $\alpha$ -celulozy (K-DW), jak też dla grup nowotworowych (MC38/EGFP-DW), stężenie kwasu mlekowego w kale było wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej otrzymującej dietę standardową (Rys. 33a).

Poziom kwasu mlekowego był najwyższy w grupach nowotworowych (MC38/EGFP-DS oraz MC38/EGFP-DW), bez znaczących różnic stężenia kwasu mlekowego w odniesieniu do zawartości  $\alpha$ -celulozy w paszy.

Stężenie **kwasu octowego** w kale zmienia się w grupach z nowotworem, szczególnie od 30. dnia eksperymentu: ilość kwasu octowego była istotnie niższa w grupach z nowotworem (MC38/EGFP-DS, MC38/EGFP-DW) i kontrolnej (K-DW) w porównaniu do grupy kontrolnej (K-DS). Myszy otrzymujące paszę ze zwiększoną zawartością  $\alpha$ -celulozy charakteryzowały się niższym stężeniem kwasu octowego w kale w porównaniu do paszy standardowej (Rys. 33b).

Dla **kwasu propionowego** obserwowaliśmy podobne zależności, tj. największe zmiany były widoczne po 30. dniu eksperymentu, gdy odnotowano istotny spadek stężenia kwasu propionowego w kale w grupie z nowotworem MC38/EGFP-DS i w grupie kontrolnej K-DW w

odniesieniu do grupy kontrolnej K-DS. Poziom kwasu propionowego był wyższy w grupach otrzymujących paszę standardową w odniesieniu do paszy ze zwiększoną zawartością  $\alpha$ -celulozy (Rys. 33c).

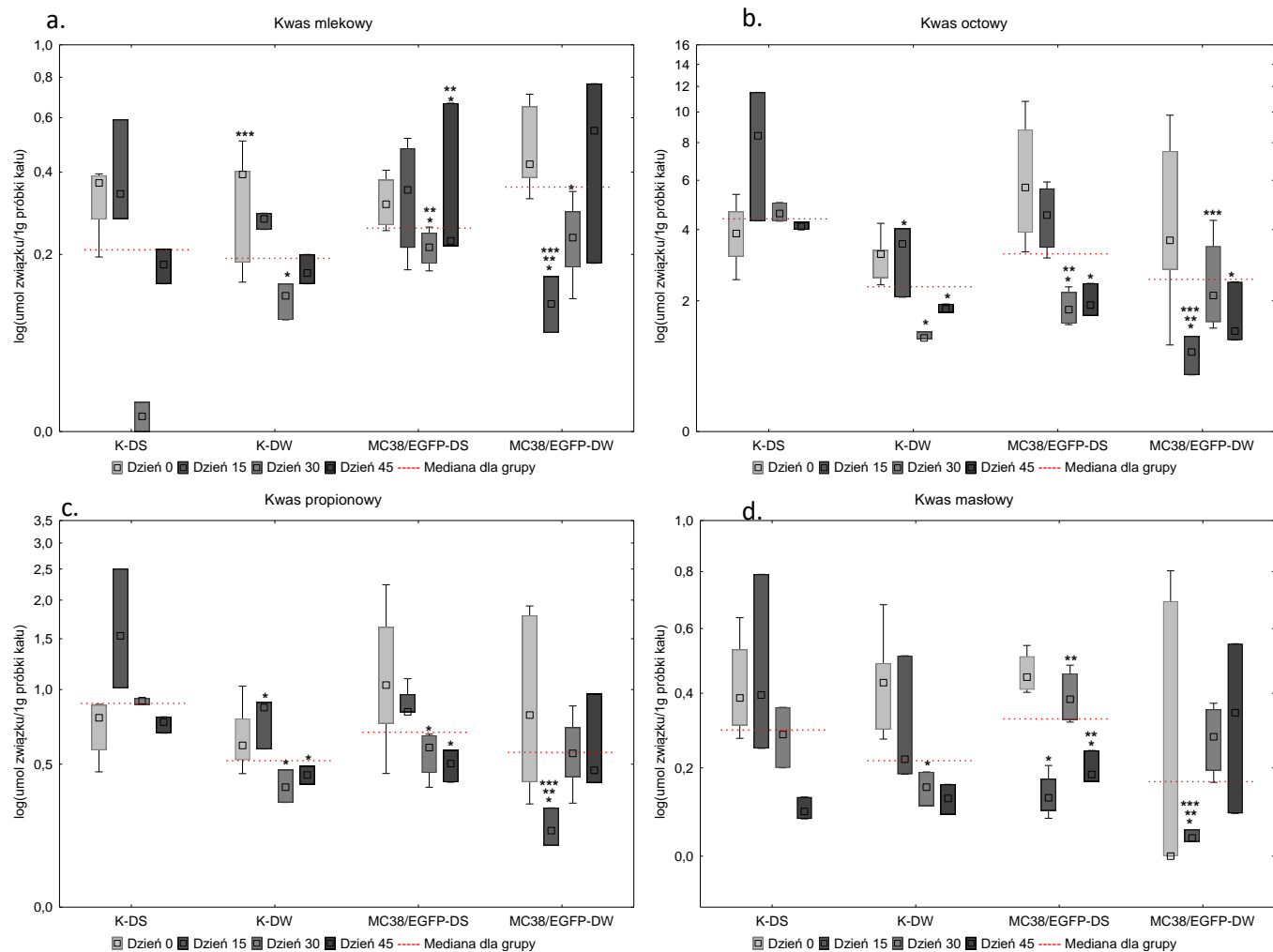
Poziom **kwasu masłowego** w kale był zmienny podczas eksperymentu. Zwraca uwagę konsekwentny spadek stężenia kwasu masłowego w grupach kontrolnych bez względu na typ paszy, natomiast w grupach z nowotworem zwiększona zawartość  $\alpha$ -celulozy silnie korelowała ze wzrostem tego metabolitu w kale (Rys. 33d).

Podsumowując, dla grupy MC38/EGFP-DW, w 15. dniu eksperymentu, stężenia wszystkich badanych krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych były istotnie niższe niż w grupach K-DS, K-DW i MC38/EGFP-DS. Efekt taki zaobserwowano tylko na tym etapie, co może sugerować znaczenie wzbogacenia paszy w  $\alpha$ -celulozę. Należy zauważyć także, że obok produkcji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych przez mikrobiom jelitowy stale odbywa się absorpcja SCFAs przez nabłonek, proces obniżający ostateczne stężenie tych związków w kale.

W 30. dniu eksperymentu stężenie kwasu mlekowego we wszystkich grupach w odniesieniu do grupy kontrolnej K-DS istotnie wzrosło (szczególnie znacząco w grupach z nowotworem). W przypadku kwasu octowego i propionowego wystąpiła odwrotna tendencja, utrzymana do końca eksperymentu.

W odniesieniu do stężenia SCFAs w kale myszy (Tab. 29), największą zmianę zaobserwowano w 15. dniu eksperymentu, podczas intensywnego wzrostu guzów nowotworowych u myszy z grupy MC38/EGFP, otrzymujących paszę o zwiększonej zawartości  $\alpha$ -celulozy (DW). Grupę charakteryzowało istotnie niższe stężenie wszystkich SCFA, w odniesieniu do innych grup badanych.

Po 30. dniu eksperymentu myszy z grupy z nowotworem MC38/EGFP otrzymujące paszę standardową (DS) charakteryzowały się istotnie wyższym stężeniem kwasu mlekowego i niższym stężeniem kwasu octowego wobec do obu grup kontrolnych K-DS i K-DW. Stężenie kwasu propionowego osiągnęło niższy poziom w odniesieniu do grupy kontrolnej K-DS, a stężenie kwasu masłowego istotnie wyższy w odniesieniu do grupy kontrolnej K-DW. W grupie myszy MC38/EGFP otrzymującej paszę wysokobłonnikową (DW) wykazano wyższe stężenie kwasu mlekowego w porównaniu do grupy kontrolnej (K-DS). Spożywanie paszy z wysoką zawartością błonnika ( $\alpha$ -celulozy) przez myszy MC38-EGFP-DW było związane z wyższym stężeniem kwasu octowego w odniesieniu do grupy myszy z nowotworem otrzymujących paszę standardową (MC38/EGFP-DS); od 45. dnia eksperymentu tendencja ta była obecna również w grupie MC38/EGFP-DS.



Rysunek 33 Stężenie SCFAs w próbkach kału w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP; K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza); (\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS.; \*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DW; \*\*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  MC38/EGFP-DS względem MC38/EGFP-DW)

Zestawienie stężenia kwasu mlekowego, octowego i propionowego wykazało istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami: stężenie kwasu mlekowego (Rys. 34) było istotnie wyższe u myszy z nowotworem MC38/EGFP w porównaniu do grup kontrolnych przez cały okres trwania eksperymentu, natomiast stężenie kwasu octowego i propionowego (Rys. 35 i 36) było istotnie niższe w grupach myszy otrzymujących paszę ze zwiększoną zawartością  $\alpha$ -celulozy.

Tabela 29 Profil SCFA w próbkach kału w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP; K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza)

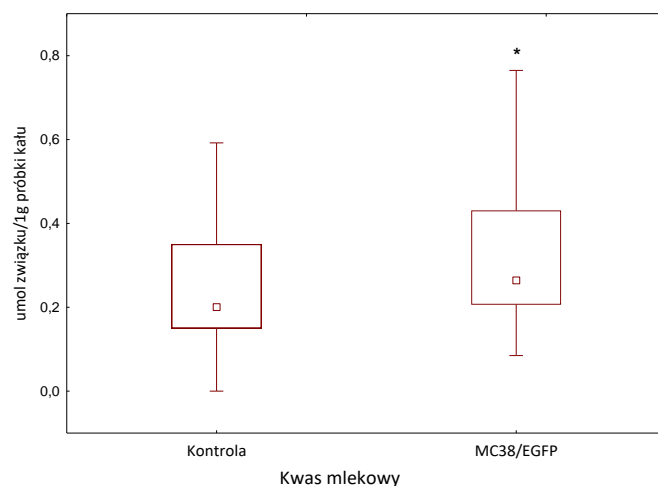
		SCFA [ $\mu\text{mol}/1\text{g}$ kału]			
		Kwas mlekowy	Kwas octowy	Kwas propionowy	Kwas masłowy
0. dzień	K-DS	0,37	3,87	0,78	0,39
	K-DW	0,39	3,21	0,61	0,43
	MC38/EGFP-DS	0,31	5,67	1,04	0,45
	MC38/EGFP-DW	0,43 <sup>***</sup>	3,64	0,8	0
15. dzień	K-DS	0,34	8,42	1,53	0,4
	K-DW	0,27	3,52 <sup>*</sup>	0,86 <sup>*</sup>	0,22
	MC38/EGFP-DS	0,35	4,52	0,83	0,13 <sup>*</sup>
	MC38/EGFP-DW	0,12 <sup>***,***</sup>	1,02 <sup>***,***</sup>	0,21 <sup>***,***</sup>	0,04 <sup>***,***</sup>
30. dzień	K-DS	0,01	4,59	0,91	0,29
	K-DW	0,13 <sup>*</sup>	1,26 <sup>*</sup>	0,39 <sup>*</sup>	0,15
	MC38/EGFP-DS	0,21 <sup>*,**</sup>	1,81 <sup>*,**</sup>	0,59 <sup>*</sup>	0,38 <sup>**</sup>
	MC38/EGFP-DW	0,23 <sup>*</sup>	2,12 <sup>***</sup>	0,56	0,28
45. dzień	K-DS	0,18	4,1	0,75	0,1
	K-DW	0,17	1,83 <sup>*</sup>	0,44 <sup>*</sup>	0,13
	MC38/EGFP-DS	0,23 <sup>*,**</sup>	1,91 <sup>*</sup>	0,5 <sup>*</sup>	0,18 <sup>*,**</sup>
	MC38/EGFP-DW	0,55	1,38 <sup>*</sup>	0,47	0,35

\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS

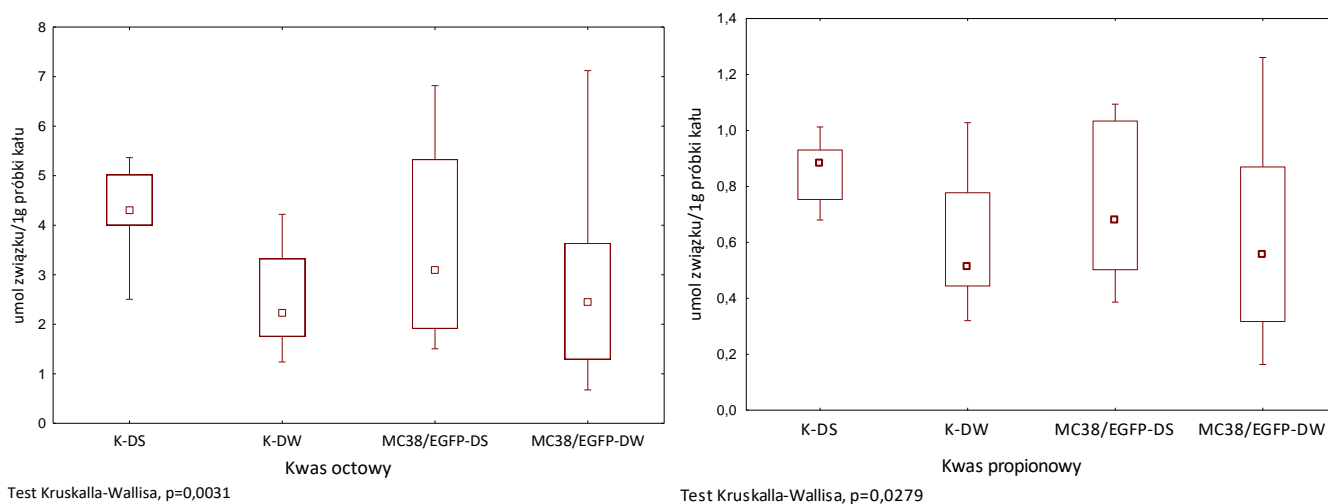
\*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DW

\*\*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  MC38/EGFP-DS względem MC38/EGFP-DW





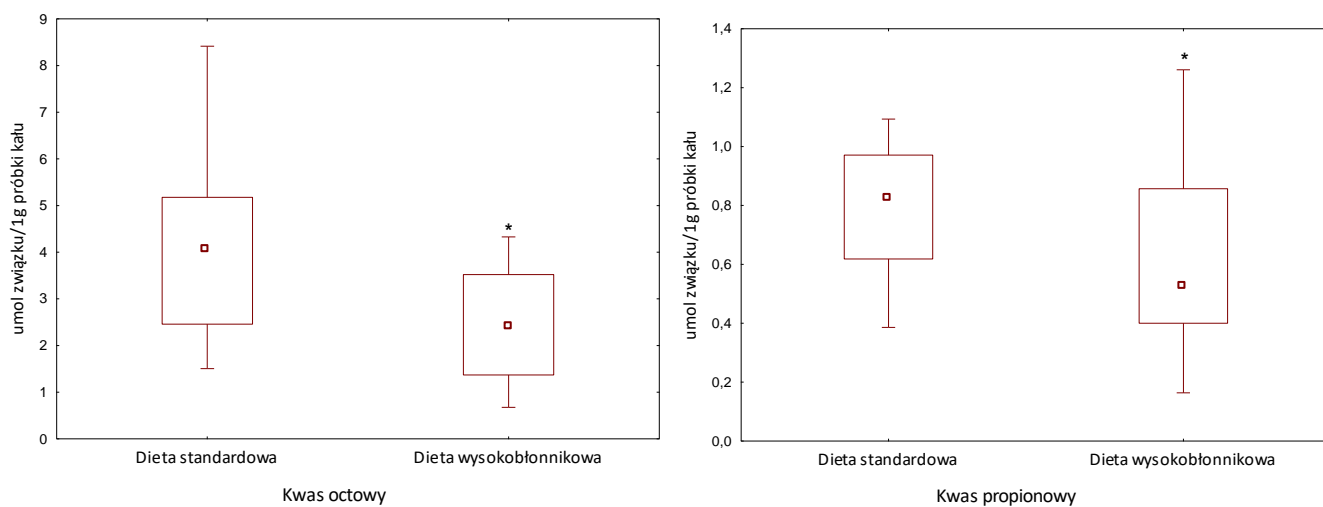
Rysunek 34 Stężenie kwasu mlekowego w próbkach kału w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP; \* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS



Test Kruskala-Wallis,  $p = 0,0031$

Test Kruskala-Wallis,  $p = 0,0279$

Rysunek 35 Stężenie kwasu octowego i propionowego w próbkach kału w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP; \* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS



Rysunek 36 Stężenie kwasu octowego i propionowego w próbkach kału w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP; \* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS

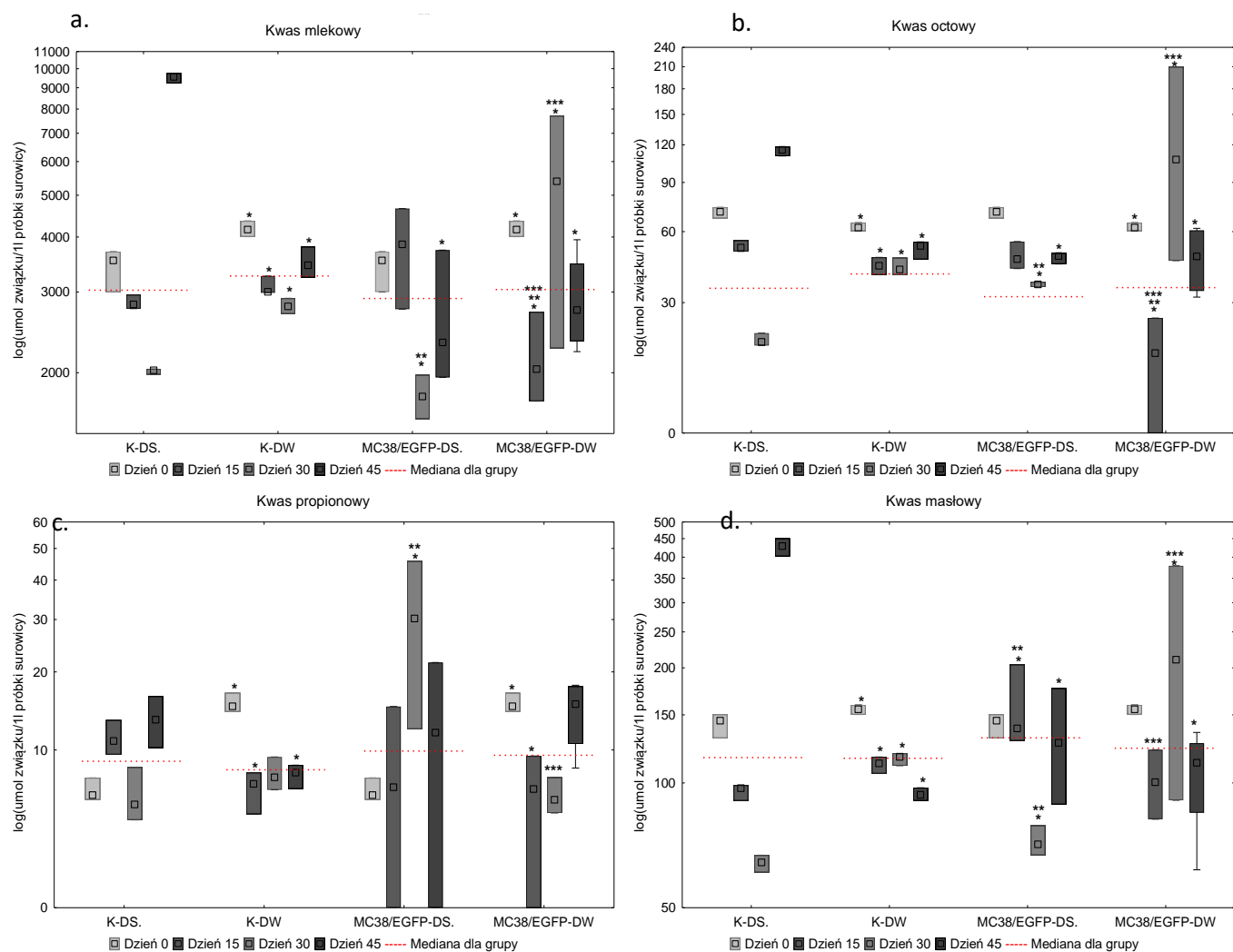
Podsumowując, rodzaj paszy wydaje się głównym czynnikiem stanowiącym o stężeniu krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w badanym modelu nowotworu jelita grubego oznaczanych w próbkach kału.

#### 6.2.3.2. Profil SCFA w surowicy

Oznaczenie stężenia SCFAs w próbkach surowicy myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP wykazało znaczące zmiany tego parametru od 15. dnia eksperymentu, podczas wzrostu guzów nowotworowych (Tab. 30).

Poziom **kwasu mlekowego** w grupach kontrolnych (K) był na stałym poziomie, natomiast w grupach myszy z nowotworem zmieniał się i był istotnie zależny od obecności zwiększonej zawartości  $\alpha$ -celulozy w paszy (Rys. 37a). Podobne obserwacje dotyczyły stężenia **kwasu octowego**, przy czym istotne różnice poziomu tego związku zaznaczyły się w grupie myszy z nowotworem otrzymującą paszę bogatą w  $\alpha$ -celulozę, odwrotnie niż w przypadku wyników SCFA w kale. Podobnie w przypadku kwasu mlekowego, grupę MC38/EGFP-DW charakteryzowały największe zmiany stężenia kwasu octowego w odniesieniu do grupy kontrolnej (Rys. 37b).

U myszy z nowotworem MC38/EGFP-DS i MC38/EGFP-DW stężenie **kwasu propionowego** było znacząco zaburzone przez rozwój guzów, podobnie jak stężenie **kwasu masłowego** (Rys. 37c i 37d).



Rysunek 37 Stężenie SCFA w próbkach surowicy w modelu nowotworu jelita grubego MC8/EGFP;K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza); (\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS.; \*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DW; \*\*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  MC38/EGFP-DS względem MC38/EGFP-DW)

Podsumowując, wykazano, że w pierwszych dniach eksperymentu stężenia SCFA w surowicy były istotnie różne dla grup otrzymujących paszę z wysoką zawartością  $\alpha$ -celulozy w porównaniu do grup kontrolnych (wyższy poziom kwasów mlekowego, propionowego i masłowego, a niższy kwasu octowego), co pokazuje, że zwiększona zawartość  $\alpha$ -celulozy w paszy może modulować stężenie SCFA.

Tabela 30 Profil SCFAs w próbkach surowicy w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP; K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza)

		SCFAs [mmol/ml surowicy]			
		Kwas mlekowy	Kwas octowy	Kwas propionowy	Kwas masłowy
0. dzień	K-DS	3534,2	70,9	6,1	144,7
	K-DW	4159,1*	62,1*	15,0*	155,1
	MC38/EGFP-DS	3534,2	70,9	6,1	144,7
	MC38/EGFP-DW	4159,1*	62,1*	15,0*	155,1
15. dzień	K-DS	2813,0	52,1	10,9	96,9
	K-DW	3003,0*	43,9*	7,0*	112,2*
	MC38/EGFP-DS	3845,2	46,8	6,7	138,2***
	MC38/EGFP-DW	2034,6*,**,***	15,5*,**,***	6,5*	100,5***
30. dzień	K-DS	2024,7	18,3	5,4	63,7
	K-DW	2784,6*	42,4*	7,5	116,5*
	MC38/EGFP-DS	1783,2***	36,5	30,2***	70,3***
	MC38/EGFP-DW	5389,4*,***	107,3	5,7***	210,3*,***
45. dzień	K-DS	9549,9	115,6	13,3	429,0
	K-DW	3447,4*	52,8*	7,9*	93,2
	MC38/EGFP-DS	2321,3*	48,1*	11,8	126,8*
	MC38/EGFP-DW	2733,0*	47,9*	15,3	112,6*

\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS

\*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DW

\*\*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  MC38/EGFP-DS względem MC38/EGFP-DW

Nie obserwowano takiej prawidłowości w próbkach kału, co może tłumaczyć absorpcja większości (90-95%) SCFAs przez nabłonek jelitowy, zjawisko występujące u zdrowych myszy bez względu na modyfikacje paszy i zawartości  $\alpha$ -celulozy; dopiero dysfunkcje układu pokarmowego pojawiające się w wyniku nowotworzenia znajdują odbicie w zaburzonym profilu SCFA w kale.

Wydaje się, że zmienność stężenia SCFA w surowicy obserwowana w tym eksperymencie odpowiada postępującemu procesowi nowotworowemu, począwszy od pierwszego punktu

pomiarowego w 15. dniu przez kolejne (30. i 45.). Znaczny wzrost wartości dla poszczególnych metabolitów bakteryjnych wskazuje na osobniczą i niejednakową reakcję mikrobiomu jelitowego na rozwijający się nowotwór.

Mimo że wyniki te nie są łatwe do interpretacji, można na ich podstawie stwierdzić, że pomiar stężenia krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w kale jest bardziej stabilnym i wiarygodnym wskaźnikiem kondycji mikrobiomu jelitowego, szczególnie u osobników chorych. Poziom SCFA w surowicy był dynamiczny, szybko się zmieniał i zasadniczo w mniejszym stopniu odpowiadał relacjom występującym w równoległe pobieranych próbkach kału, co, jak wspomniano wyżej, prawdopodobnie wynika z zaburzeń metabolizmu SCFA oraz ich absorpcji ze światła jelita do tkanek.

#### 6.2.4. Profil 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OH FAs) w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP

##### *6.2.4.1. Profil 3-OH FAs w próbkach kału*

W pierwszych dniach eksperymentu (dzień 0.) wszystkie osobniki otrzymujące paszę z wysoką zawartością  $\alpha$ -celulozy charakteryzowały się niższym stężeniem kałowych 3-OH FAs, markerów LPSu, w kale w porównaniu do grup otrzymujących paszę standardową. Efekt ten zanikał w trakcie trwania eksperymentu, także w grupach myszy kontrolnych (Tab. 31).

Tabela 31 Profil 3-OH FAs, markerów LPS, w próbkach kału w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP; K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza)

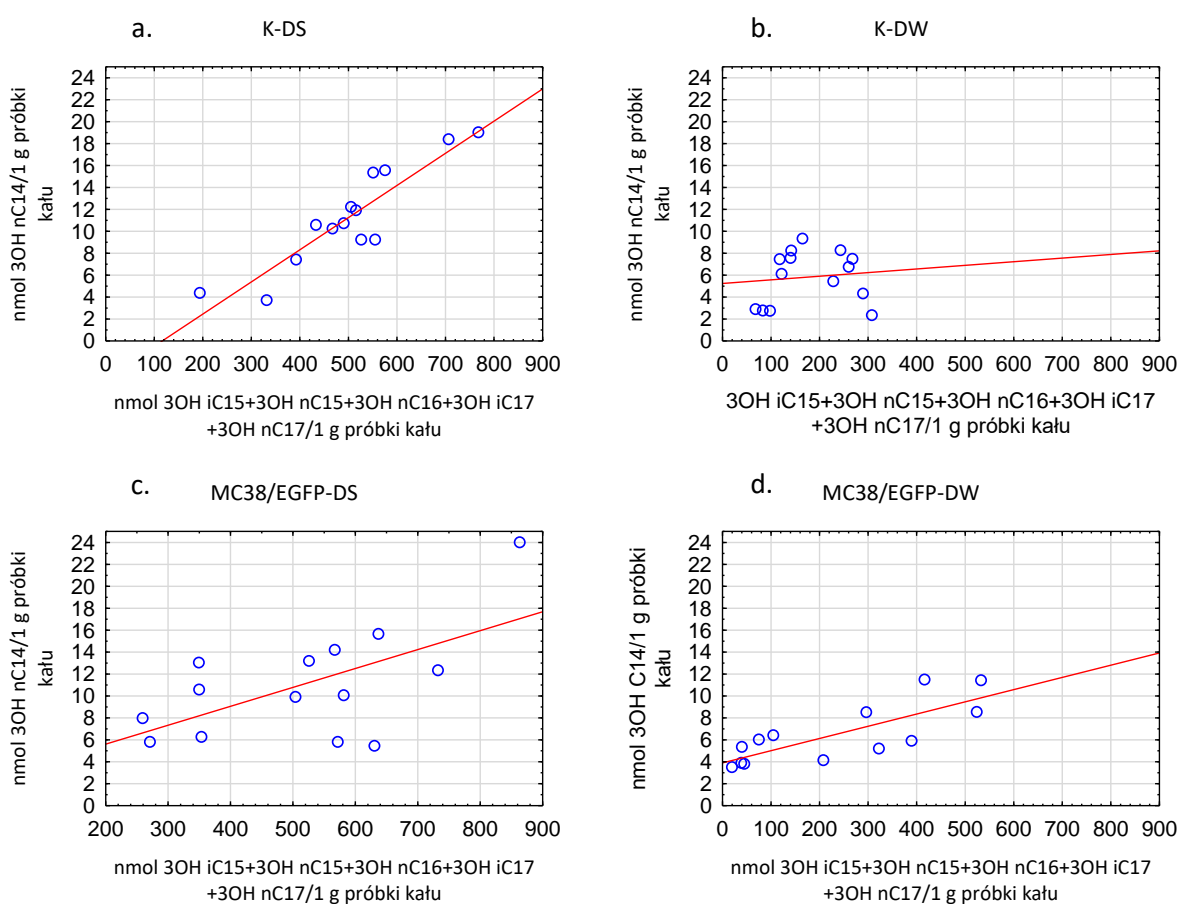
		3-OH FAs [nmol/g kału]									
		nC14:0	iC15:0	aC15:0	nC15:0	iC16:0	nC16:0	iC17:0	aC17:0	nC17:0	nC18:0
0. dzień	K-DS	15,6	13,2	4,0	63,7	23,3	318,2	136,0	30,7	48,2	3,4
	K-DW	6,4*	4,7*	2,0	23,2	4,6*	66,4*	20,8*	11,3*	19,3*	1,2*
	MC38/EGFP-DS	9,0	9,4**,	3,5**	40,0	15,6**	160,9**,	69,3**,	16,6*	32,8**	2,2
	MC38/EGFP-DW	3,9*,**	2,1*,**,*	0,7*	12,3*,**,*	2,4*,**	15,2*,**,*	4,5*,**,*	2,3*,**,*	4,8*,**,*	0,3*,**
15. dzień	K-DS	4,4	7,6	1,7	19,4	13,6	204,7	77,8	19,5	22,8	2,2
	K-DW	4,2	9,7	1,3	29,4	6,0	78,0*	27,7*	8,0	18,5	1,1
	MC38/EGFP-DS	6,0	8,3	1,8	29,8	18,6**	387,3**	139,3**	29,8**	38,9**	5,1**
	MC38/EGFP-DW	5,6	3,5	0,9	63,5	11,9	172,6**,**	80,8	21,3	36,2	2,3**
30. dzień	K-DS	10,7	15,2	1,9	57,2	19,8	275,8	123,0	24,3	44,8	1,2
	K-DW	4,3*	21,5*	2,7	20,2*	9,2*	173,8*	52,5*	12,3*	22,1*	2,8
	MC38/EGFP-DS	19,8**	21,9	3,7	108,0**	30,7**	391,6**	192,9**	44,0**	70,4**	4,6**
	MC38/EGFP-DW	11,4	19,6	2,5	115,2**	14,9**	169,5*,**,*	74,5**,	12,7*,**,*	28,2**	2,5
45. dzień	K-DS	12,2	13,0	2,4	45,8	20,9	268,6	128,2	33,8	50,0	5,4
	K-DW	8,2*	13,5*	2,0	11,2*	7,2*	76,1*	30,7*	3,4*	10,3*	1,2
	MC38/EGFP-DS	13,2**	17,2	3,8	41,3**	19,6**	244,7**	153,9**	35,7**	54,0**	4,0**,
	MC38/EGFP-DW	11,5	17,0	2,8	78,7**	10,2**	146,2*,**,*	55,1*,**,*	14,3**,	32,8**	2,0**,

\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS

\*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DW

\*\*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  MC38/EGFP-DS względem MC38/EGFP-DW

Analiza stężenia markerów LPSu charakterystycznych dla rzędu *Enterobacteriales* (3-OH *nC14*), do *Bacteroidales* (3-OH *iC15*, 3-OH *nC15*, 3-OH *nC16*, 3-OH *iC17*, 3-OH *nC17*), w większości komensalnych, należących do bakterii najliczniej zasiedlających jelito grube u ssaków, wykazała, że u myszy otrzymujących paszę standardową (DS) wzrrostowi stężenia markerów *Bacteroidales* towarzyszy wzrost stężenia markerów *Enterobacteriales*, natomiast w grupach otrzymujących paszę z wyższą zawartością  $\alpha$ -celulozy (DW) zależności tej nie obserwowano (Rys. 38a), co więcej, występował wzrost stężenia markerów *Bacteroidales*, gdy markery *Enterobacteriales* pozostawały na tym samym poziomie (Rys. 38b). W grupach z nowotworem obserwowaliśmy podobną zależność, chociaż bez istotności statystycznej (Ryc. 38c i 37d).



Rysunek 38 Stosunek stężenia 3-OH *nC14* (*Enterobacteriales*) do sumy 3-OH (*iC15+nC15+nC16+iC17+nC17*) (*Bacteroidales*) w próbkach kału w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP; K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza)

#### 6.2.4.2. Markery LPSu z podziałem na rzędy w próbkach kału

Myszy otrzymujące paszę wysokobłonnikową charakteryzowały się istotnie niższym stężeniem 3-OH FAs, co świadczy o mniejszej obecności bakterii rzędów *Enterobacteriales*, *Bacteroidales* i *Fusobacteriales* w odniesieniu do zwierząt otrzymujących paszę standardową.

Myszy otrzymujące paszę ze zwiększoną zawartością  $\alpha$ -celulozy charakteryzowało niższe stężenie markerów *Enterobacteriales*, przy czym w grupie z nowotworem (MC38/EGFP-DS i MC38/EGP-DW) w późnej fazie eksperymentu, gdy guzy nowotworowe były już rozwinięte, nastąpił wzrost stężenia markerów *Enterobacteriales* w próbkach kału, niższy u myszy MC38/EGFP-DW w porównaniu do grupy MC38/EGFP-DS (Rys. 39a).

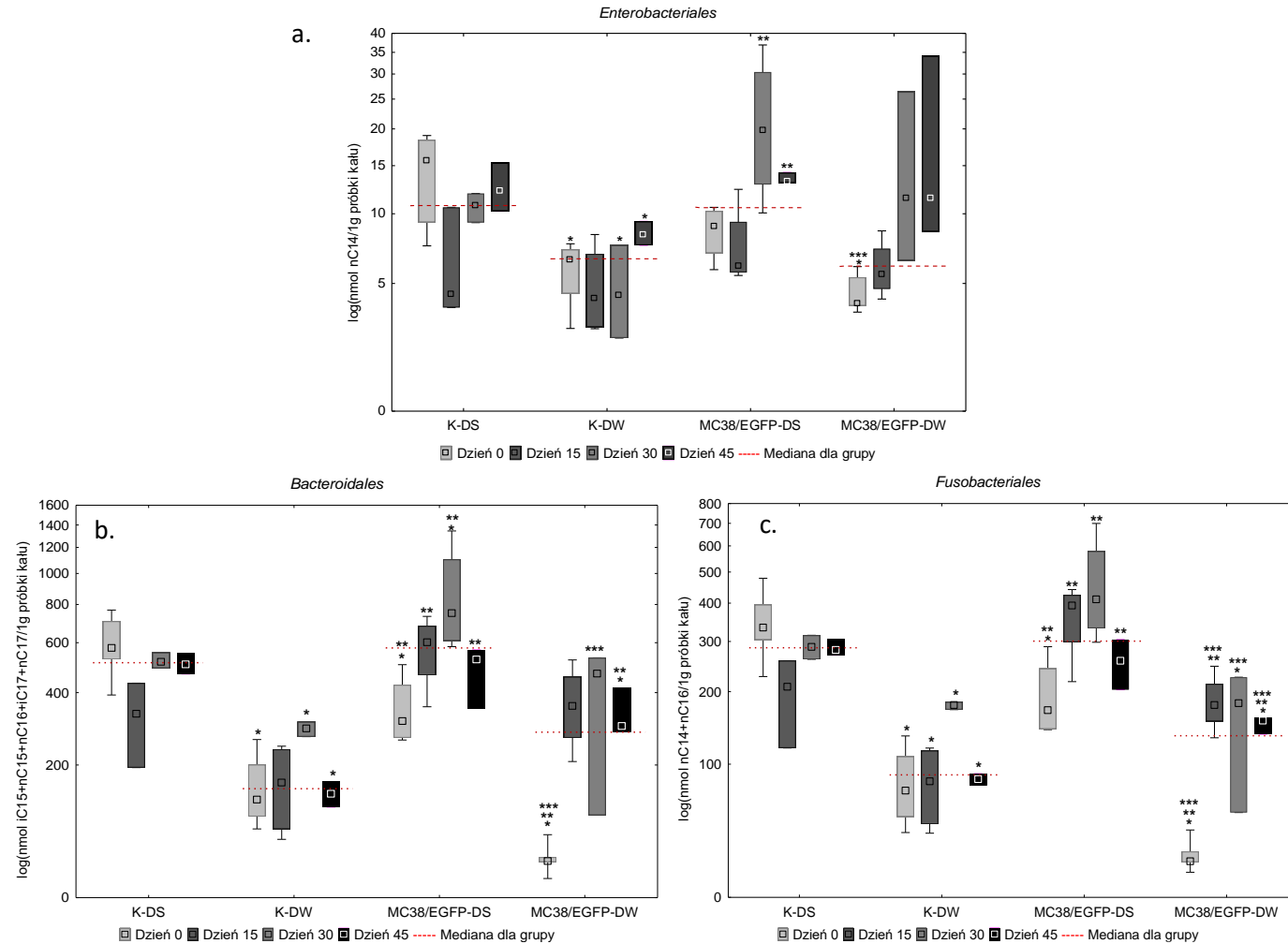
Stężenie markerów *Bacteroidales* i *Fusobacteriales* było niższe w grupach otrzymujących paszę wysokobłonnikową w porównaniu do grupy kontrolnej (Rys. 39b i 39c).

Zwiększona podaż  $\alpha$ -celulozy ma istotny wpływ na skład mikrobiomu jelitowego obniżając ilość bakterii Gram-ujemnych w dolnych odcinkach przewodu pokarmowego. Za pomocą pomiaru stężenia markerów LPSu można monitorować zmienność mikrobiomu w grupach z nowotworem w zakresie bakterii Gram-ujemnych, w tym *Enterobacteriales*, *Bacteroidales* i *Fusobacteriales*.

Stężenie 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych, markerów LPSu, obniżało się w próbkach kału po zastosowaniu paszy wzbogaconej  $\alpha$ -celulozą, co pozwala na wniosek, że pasza - ograniczając wzrost bakterii Gram-ujemnych - promowała wzrost bakterii Gram-dodatnich (Tab. 32).

Stężenie markerów bakterii typów *Bacteroidales* i *Fusobacteriales* było zależne od zawartości  $\alpha$ -celulozy w paszy i rozwoju nowotworu: myszy z grupy z nowotworem charakteryzowały się wyższym stężeniem markerów *Bacteroidales* i *Fusobacteriales* w porównaniu do grup kontrolnych, a zastosowanie paszy ze zwiększoną zawartością  $\alpha$ -celulozy osłabiało ten efekt i wyrównywało poziom *Bacteroidales*, ale nie *Fusobacteriales* (Tab. 32).





Rysunek 39 Markery LPS z podziałem na rzędy w próbkach kału w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP; K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza); (\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS.; \*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DW; \*\*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  MC38/EGFP-DS względem MC38/EGFP-DW)

Zwiększona podaż  $\alpha$ -celulozy w diecie ogranicza dominację bakterii Gram-ujemnych, przez co w istotny sposób moduluje skład mikrobiomu jelitowego.

Tabela 32 Profil bakteryjny (według 3-OH FAs) próbkach kału w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP; K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza)

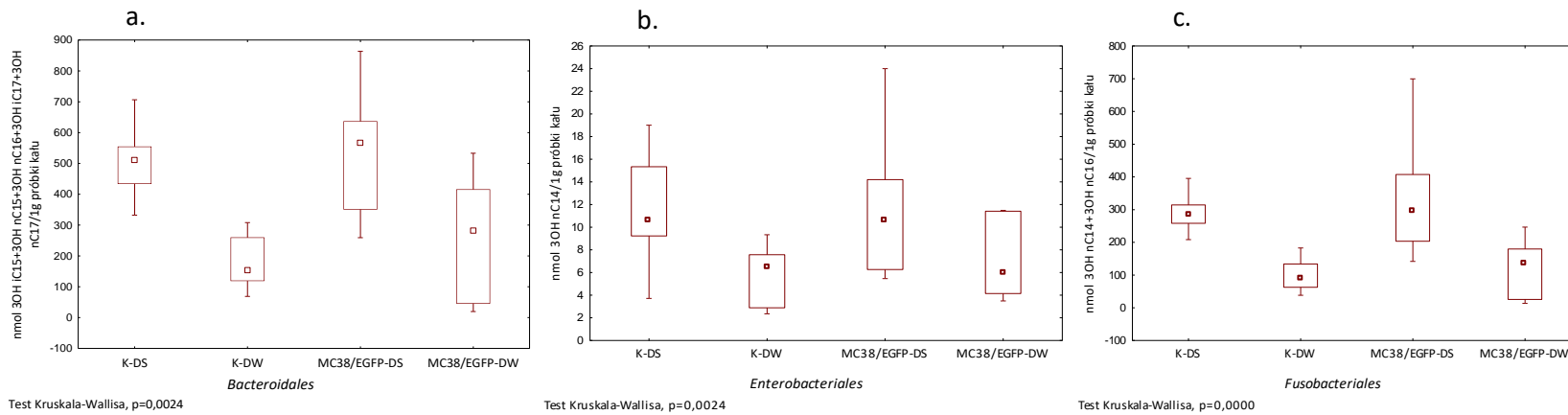
		3-OH FAs [nmol/g kału]		
		<i>Enterobacteriales</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Fusobacteriales</i>
0. dzień	K-DS	15,6	576,0	333,6
	K-DW	6,4	131,4	73,2
	MC38/EGFP-DS	9,0	310,5	170,1
	MC38/EGFP-DW	3,9	40,2	19,6
15. dzień	K-DS	4,4	332,2	208,4
	K-DW	4,2	163,4	82,1
	MC38/EGFP-DS	6,0	601,5	393,0
	MC38/EGFP-DW	5,6	356,0	178,2
30. dzień	K-DS	10,7	515,8	287,8
	K-DW	4,3	290,2	178,2
	MC38/EGFP-DS	19,8	750,4	411,4
	MC38/EGFP-DW	11,4	469,1	181,0
45. dzień	K-DS	12,2	505,5	280,8
	K-DW	8,2	141,7	84,3
	MC38/EGFP-DS	13,2	526,1	257,9
	MC38/EGFP-DW	11,5	296,5	154,7

\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS

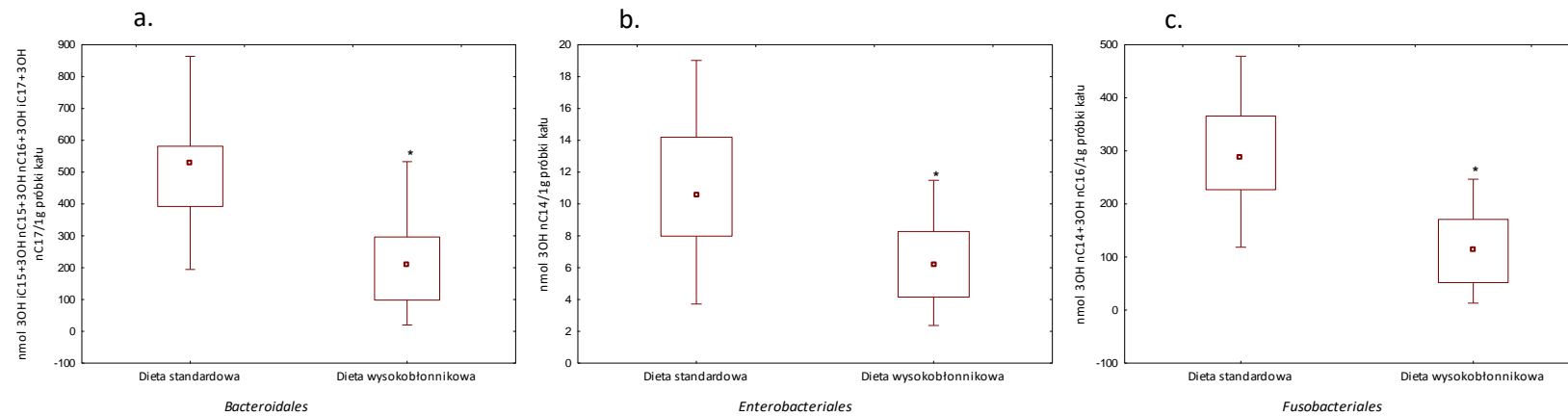
\*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DW

\*\*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  MC38/EGFP-DS względem MC38/EGFP-DW

Analiza wykazała, że największe różnice poziomu markerów LPSu w grupach wprowadzała zawartość  $\alpha$ -celulozy w paszy, bez względu na występowanie (bądź nie) nowotworu. Zwiększone spożycie błonnika powodowało obniżenie stężenia markerów LPSu *Bacteroidales*, *Enterobacteriales* i *Fusobacteriales*. W wartościach bezwzględnych dominowały markery *Bacteroidales* (ok. 500 nmol/1g) wobec *Enterobacteriales* i innych (6-12 nmol/1g) (Rys. 40, 41).



Rysunek 40 Profil markerów bakteryjny z podziałem na rzędy w próbkach kału w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP; a. Bacteroidetes; b. Enterobacteriales; c. Fusobacteriales; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza).  
\* Test U Manna-Whitneya,  $p<0.05$  względem K-DS.



Rysunek 41 Profil markerów bakteryjnych z podziałem na rzędy w próbkach kału i dietę zawierającą  $\alpha$ -celulozę; a. Bacteroidetes; b. Enterobacteriales; c. Fusobacteriales; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza).  
\* Test U Manna-Whitneya,  $p<0.05$  względem K-DS

#### 6.2.4.3. Profil 3-OH FAs w próbkach surowicy

W pierwszych dniach eksperymentu stężenie 3-OH FAs, markerów LPS, w surowicy było niższe u zwierząt otrzymujących paszę ze zwiększoną zawartością  $\alpha$ -celulozy, przy czym zmiany istotne statystycznie dotyczyły 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych o długości łańcucha *n*C14, *i*C15, *i*C16, *n*C16. Po 15. dniach nastąpił spadek stężenia w surowicy kwasów 3-OH FAs o długości łańcucha *n*C14, *i*C15, *i*C16, *n*C16, *i*C17, *a*C17, *n*C17, *n*C18, charakterystycznych dla rzędów *Bacteroidales* i *Enterobacteriales*. W 30. dniu największe zmiany wystąpiły w grupie MC38/EGFP-DW dla 3-OH *i*C15, *a*C15, *n*C15, *i*C16, *n*C16, *n*C18, których stężenie było niższe w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast w dniu 45. niższe stężenie w surowicy kwasów 3-OH *n*C16, *i*C17, *a*C17 oraz *n*C18, które korespondują z rzędem *Bacteroidales*, dotyczyło wszystkich grup z nowotworem (w odniesieniu do myszy z grupy kontrolnej) (Tab. 33, Rys. 42).

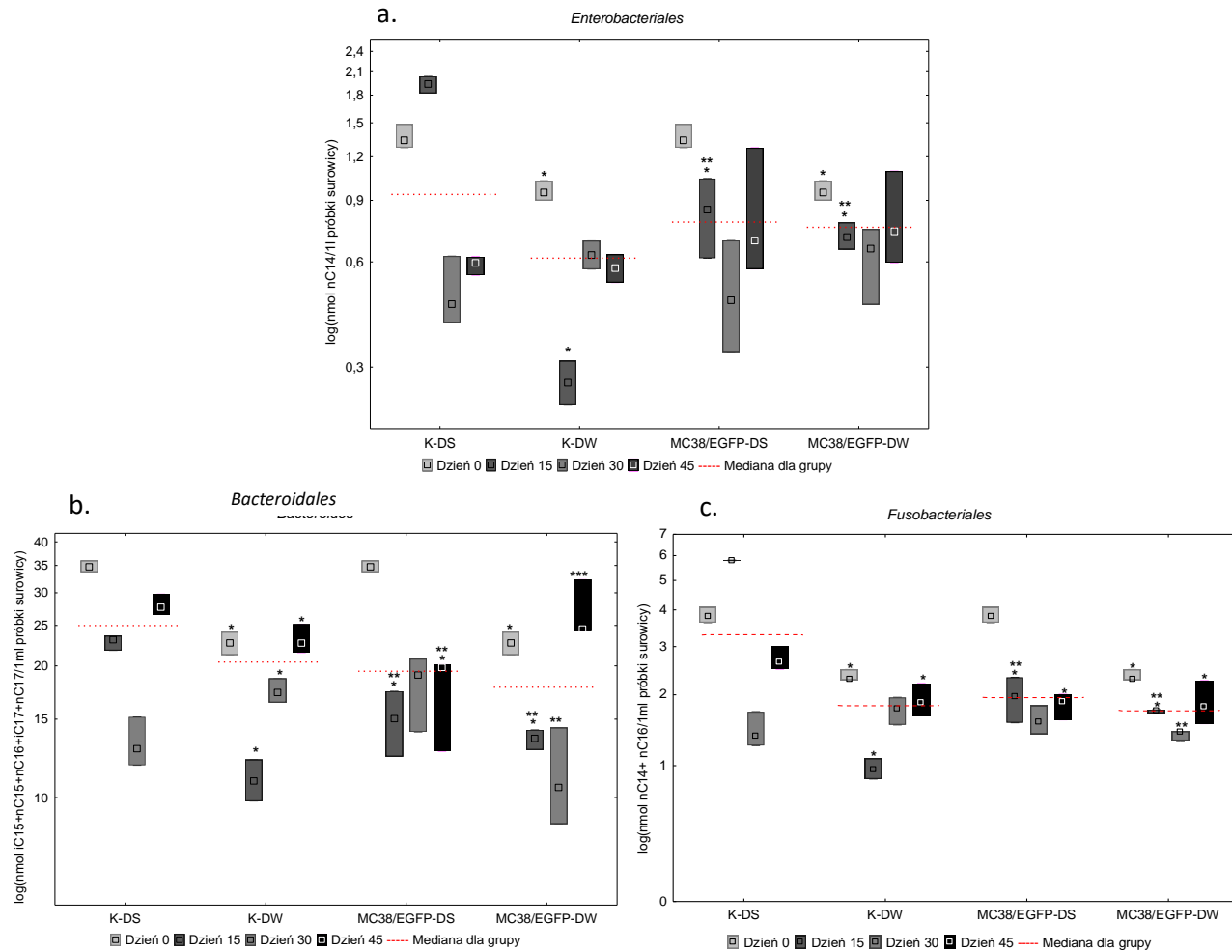
Tabela 33 Profil 3-OH FAs, markerów LPS, w surowicy myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP; K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza)

		3-OH FAs [pmol/ml surowicy]									
		nC14:0	iC15:0	$\alpha$ C15:0	nC15:0	iC16:0	nC16:0	iC17:0	$\alpha$ C17:0	nC17:0	nC18:0
0. dzień	K-DS	1366,0	257,3	301,0	3404,5	260,8	2458,7	288,5	217,8	28303,5	433,6
	K-DW	947,5*	388,2*	155,9*	2198,5*	236,0	1329,4*	297,1	201,7	18481,4*	662,6*
15. dzień	K-DS	1938,2	310,9	139,2	614,4	255,0	3867,0	354,8	132,5	17950,6	1057,2
	K-DW	270,6*	151,3*	49,2*	621,5	68,2*	687,2*	78,1*	46,9*	9326,3*	194,6*
	MC38/EGFP-DS	846,8**,**	190,4**,**	129,4**	1239,5**,**	74,6*	1129,4**,**	97,6**,**	61,3**,**	12390,5*	201,2*
	MC38/EGFP-DW	706,5**,**	172,1**,***	82,4**,**	1023,5*	75,7*	987,9**,**	74,6**,***	54,6*	11294,2*	149,5*
30. dzień	K-DS	454,1	189,9	129,2	1400,7	74,6	909,3	126,3	156,0	10209,5	213,3
	K-DW	627,5	197,6	99,3	1654,5	101,5	1135,6	151,2	71,8*	14161,2*	438,6*
	MC38/EGFP-DS	465,8	163,5	92,4	1548,6	83,5	1098,4	283,4	148,6	15934,5	314,3
	MC38/EGFP-DW	654,4	143,5**,**	67,5**,***	1090,2**,**	54,4**,**	768,4***	164,6	78,4*	8349,2**	159,4**,***
45. dzień	K-DS	596,3	108,4	0,0	2233,7	0,0	2039,0	364,6	155,3	22913,1	586,6
	K-DW	576,0	176,9*	89,8*	2020,0	109,2*	1297,6*	128,2*	51,2*	19052,7*	282,5*
	MC38/EGFP-DS	690,7	119,1	60,0**,**	1557,2	62,8**,**	902,3*	201,4**,**	61,9*	13726,3**,**	233,5*
	MC38/EGFP-DW	733,0	166,9*	73,3*	1445,4**,**	70,5**,**	1166,9*	127,0**,***	60,0*	21586,4***	288,0*

\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS

\*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DW

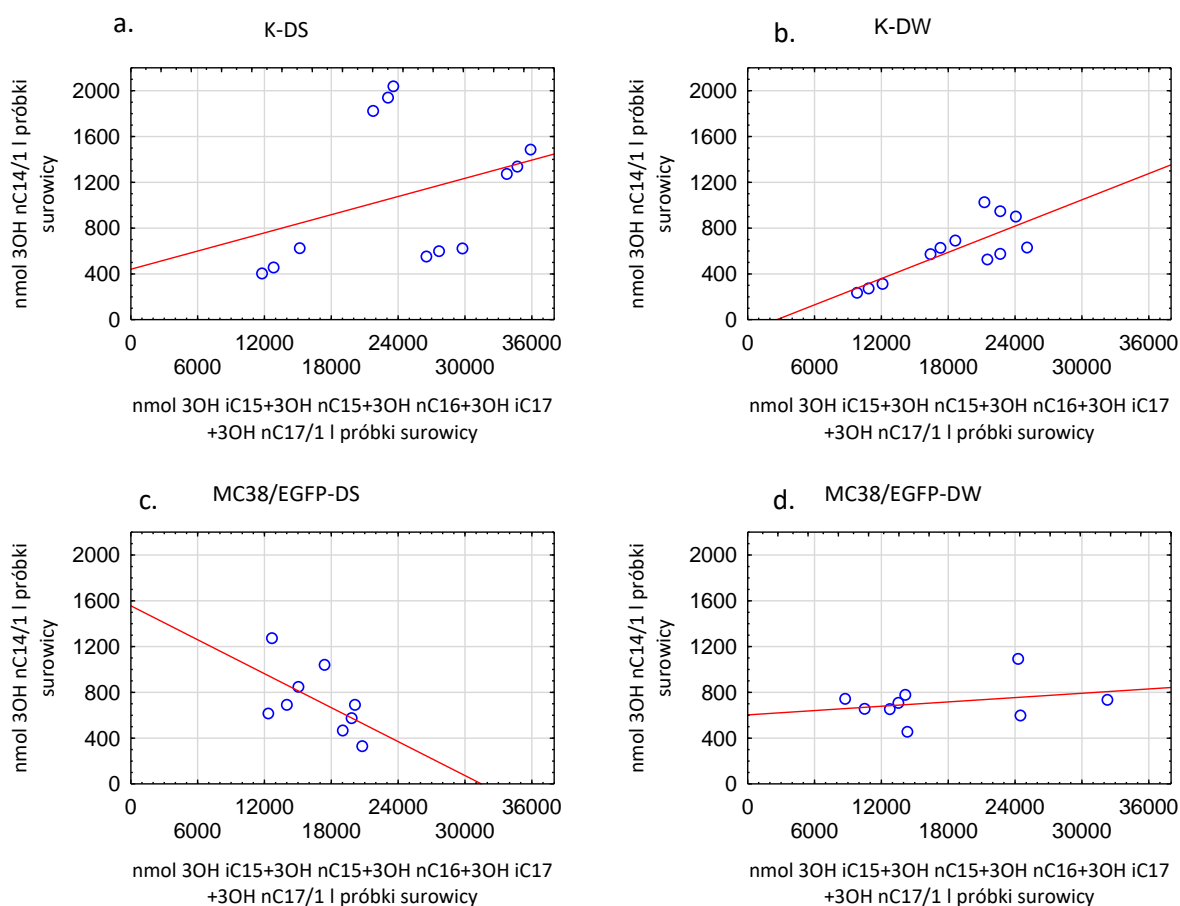
\*\*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  MC38/EGFP-DS względem MC38/EGFP-DW



Rysunek 42 3-OH FAs, markery LPS, w surowicy myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP; K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza); (\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS.; \*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DW; \*\*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  MC38/EGFP-DS względem MC38/EGFP-DW)

Analiza korelacji markerów LPS *Enterobacteriales* i *Bacteroidales*, w większości bakterii komensalnych, najliczniej zasiedlających jelito grube u ssaków wykazano, że w obu grupach myszy zdrowych (DS i DW) wzrost stężenia markerów *Bacteroidales* jest związany ze wzrostem stężenia markerów *Enterobacteriales* (Rys. 43a i 43b). W grupach myszy z nowotworem MC38, otrzymujących paszę ze zwiększoną zawartością  $\alpha$ -celulozy wystąpił wzrost stężenia markerów *Bacteroidales* (Rys. 43d), natomiast markery charakterystyczne dla (patogennych) *Enterobacteriales* utrzymywały się na stałym poziomie, co sugeruje brak translokacji tych bakterii do krwi.

Wysoki poziom markerów *Enterobacteriales* w surowicy myszy z nowotworem MC38 otrzymujących paszę standardową (DS) wiązał się z niskim poziomem markerów *Bacteroidales* (Rys. 43c). Wydaje się, że translokacja bakterii patogennych ze światła jelita do krwioobiegu u zwierząt chorych była znacznie zwiększona podczas stosowania paszy standardowej, ale proces ten zatrzymywało podanie paszy wzbogaconej 20% dodatkiem  $\alpha$ -celulozy (Rys 43d).



Rysunek 43 Stosunek stężenia 3-OH nC14 (*Enterobacteriales*) do sumy 3-OH (iC15+nC15+nC16+iC17+nC17) (*Bacteroidales*) w surowicy myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP; K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza)

#### 6.2.4.4. Profil bakteryjny rzędów w próbkach surowicy

Stężenie markerów *Enterobacteriales* w surowicy myszy z nowotworem MC38, które otrzymywały paszę z wysoką zawartością  $\alpha$ -celulozy, było niższe w porównaniu do myszy otrzymujących paszę standardową, natomiast stężenie markerów *Bacteroidales* było niższe w grupach otrzymujących paszę z wysoką zawartością  $\alpha$ -celulozy w porównaniu do paszy standardowej (Tab. 34).

Dieta wysokobłonnikowa istotnie wpływała na obniżenie poziomu markerów *Fusobacteriales* w surowicy; zanotowano niższe stężenie w grupach z nowotworem w porównaniu do grup kontrolnych. Znaczna zmienność profilu markerów bakterii Gram-ujemnych utrzymywała się w ciągu całego eksperymentu (Rys. 44c).

Należy podkreślić, że rodzaj materiału: kał bądź surowica wykazują te same zależności, jednak w surowicy są one mniej wyraźne. Odpowiednim materiałem do badania mikrobiomu jelitowego i jego zmian wynikających ze stosowania paszy z wysoką zawartością błonnika bądź procesu nowotworzenia, są próbki kału.

Oznaczanie markerów bakterii Gram-ujemnych dostarczyło interesujących informacji o stosunku markerów *Enterobacteriales* do *Bacteroidales*, ponieważ w grupie myszy chorych przebywających na paszy standardowej, translokacja LPSu dla *Enterobacteriales* związana była z niższą translokacją markerów *Bacteroidales*, przy czym pasza z wysoką zawartością  $\alpha$ -celulozy niwelowała ten efekt.

Analiza markerów LPSu w surowicy z podziałem na rzędy bakteryjne wykazała, że stężenie markerów charakterystycznych dla *Fusobacteriales* i *Bacteroidales* było istotnie różne w grupach; myszy otrzymujące paszę ze zwiększoną ilością  $\alpha$ -celulozy charakteryzowały się niższym stężeniem markerów *Fusobacteriales* i *Bacteroidales* w surowicy (Rys. 44).



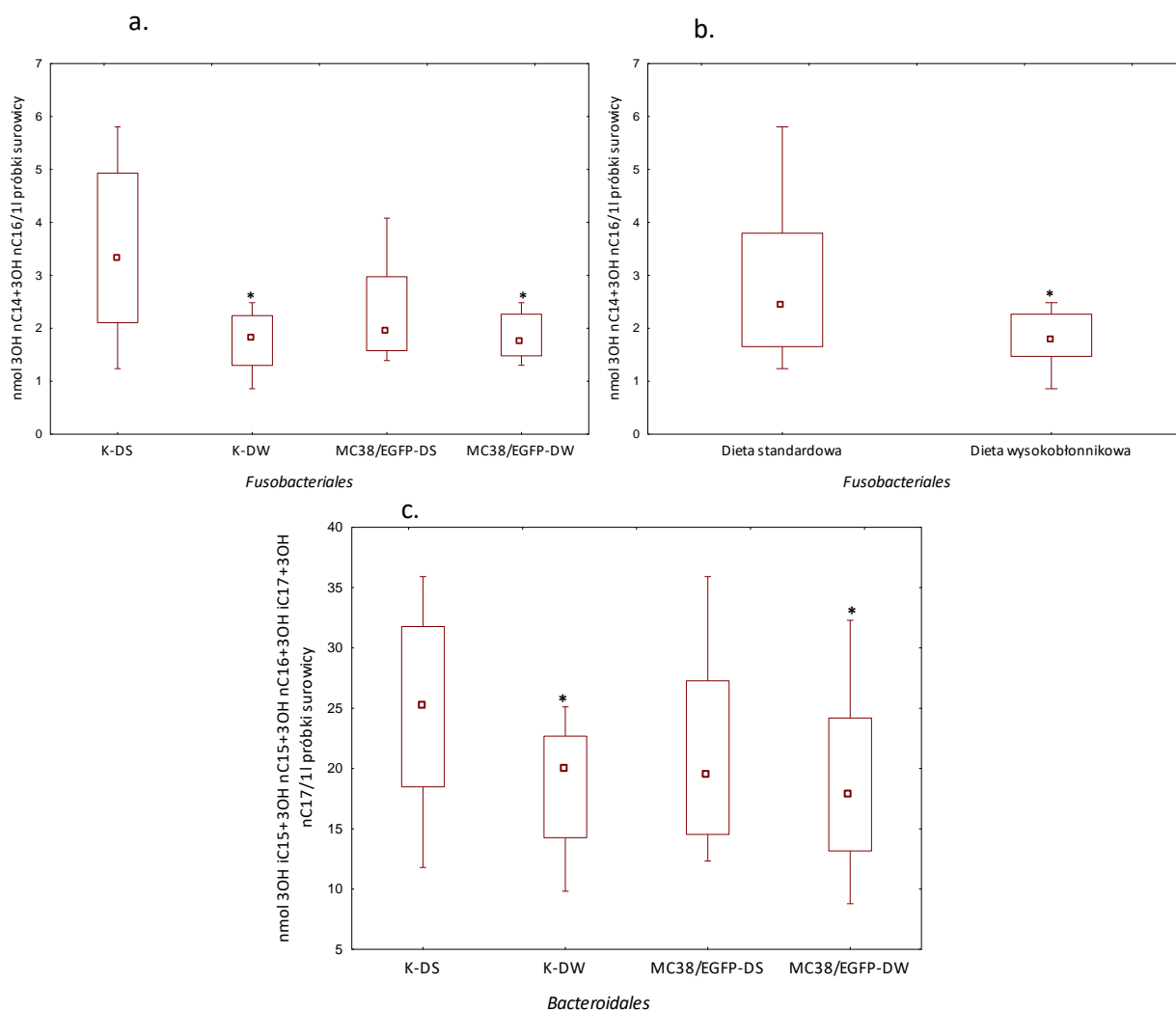
Tabela 34 Profil bakteryjny (według 3-OH FAs) w surowicy myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP; K-kontrola; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza)

		3-OH FAs [nmol/ml surowicy]		
		<i>Enterobacteriales</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Fusobacteriales</i>
0. dzień	K-DS	1,33	34,71	3,8
	K-DW	0,95	22,7	2,28
	MC38/EGFP-DS	1,34	34,71	3,8
	MC38/EGFP-DW	0,95	22,7	2,28
15. dzień	K-DS	1,94	23,1	5,78
	K-DW	0,27	10,86	0,96
	MC38/EGFP-DS	0,85	15,05	1,98
	MC38/EGFP-DW	0,71	13,55	1,74
30. dzień	K-DS	0,45	12,84	1,36
	K-DW	0,63	17,3	1,76
	MC38/EGFP-DS	0,47	19,03	1,56
	MC38/EGFP-DW	0,65	10,52	1,42
45. dzień	K-DS	0,6	27,66	2,64
	K-DW	0,58	22,68	1,87
	MC38/EGFP-DS	0,69	20,13	1,88
	MC38/EGFP-DW	0,73	24,5	1,79

\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS

\*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DW

\*\*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  MC38/EGFP-DS względem MC38/EGFP-DW



Rysunek 44 Profil markerów bakteryjnych w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP, w surowicy, z podziałem na rzędy oraz paszę zawierającą  $\alpha$ -celulozę; a. Bacteroidetes; b. Enterobacteriales; c. Fusobacteriales; MC38/EGFP-grupa z nowotworem; DS-dieta standardowa; DW-dieta wysokobłonnikowa ( $\alpha$ -celuloza)

\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS

#### 6.2.5. Zależności pomiędzy metabolitami bakteryjnymi (SCFAs) a markerami LPSu (3-OH FAs) w modelu nowotworu jelita grubego MC38/EGFP

Uzyskane wyniki zestawiliśmy znajdując następujące korelacje:

**W grupie kontrolnej otrzymującej paszę standardową (K-DS)** wystąpiła silna dodatnia korelacja pomiędzy wszystkimi badanymi markerami bakterii Gram-ujemnych w próbkach kału;

- markery *Bacteroidales* w surowicy silnie ujemnie korelowały ze stężeniem kwasu octowego i propionowego w kale; dodatnia korelacja odczytała stężenia kwasu mlekowego, octowego i masłowego w surowicy; stężenie kwasu octowego w kale ujemnie korelowało ze stężeniem kwasu mlekowego i masłowego w surowicy (Tab. 35).

Tabela 35 Korelacje dla bakterii wybranych rzędów i SCFAs w surowicy i próbkach kału dla grupy kontrolnej (K) otrzymującej paszę standardową (DS). Korelacja rangowa Spearmana,  $p < 0.05$

K-DS			
	R	t(N-2)	p
<i>Enterobacteriales</i> (kał) & <i>Bacteroidales</i> (kał)	0,80	4,58	0,0006
<i>Enterobacteriales</i> (kał) & <i>Fusobacteriales</i> (kał)	0,79	4,45	0,0008
<i>Bacteroidales</i> (kał) & <i>Fusobacteriales</i> (kał)	1,00	36,82	0,0000
<i>Enterobacteriales</i> (surowica) & <i>Fusobacteriales</i> (surowica)	0,95	9,73	0,0000
<i>Enterobacteriales</i> (surowica) & Kwas mlekowy (kał)	0,69	3,03	0,0126
<i>Bacteroidales</i> (surowica) & Kwas octowy (kał)	-0,80	-4,18	0,0019
<i>Bacteroidales</i> (surowica) & Kwas propionowy (kał)	-0,58	-2,25	0,0479
<i>Bacteroidales</i> (surowica) & Kwas mlekowy (surowica)	0,74	3,49	0,0058
<i>Bacteroidales</i> (surowica) & Kwas octowy (surowica)	0,74	3,49	0,0058
<i>Bacteroidales</i> (surowica) & Kwas masłowy (surowica)	0,73	3,35	0,0074
<i>Fusobacteriales</i> (surowica) & Kwas mlekowy (kał)	0,79	4,08	0,0022
Kwas octowy (kał) & Kwas propionowy (kał)	0,75	3,79	0,0030
Kwas octowy (kał) & Kwas mlekowy (surowica)	-0,58	-2,25	0,0479
Kwas octowy (kał) & Kwas masłowy (surowica)	-0,61	-2,42	0,0358
Kwas propionowy (kał) & Kwas mlekowy (surowica)	-0,66	-2,76	0,0202
Kwas propionowy (kał) & Kwas masłowy (surowica)	-0,63	-2,56	0,0283
Kwas mlekowy (surowica) & Kwas octowy (surowica)	0,94	9,05	0,0000
Kwas mlekowy (surowica) & Kwas propionowy (surowica)	0,59	2,30	0,0446
Kwas mlekowy (surowica) & Kwas masłowy (surowica)	0,94	9,05	0,0000
Kwas octowy (surowica) & Kwas propionowy (surowica)	0,62	2,47	0,0332
Kwas octowy (surowica) & Kwas masłowy (surowica)	0,94	9,05	0,0000

**W grupie kontrolnej otrzymującej paszę ze zwiększoną zawartością  $\alpha$ -celulozy (K-DW)** wystąpiły silne ujemne korelacje pomiędzy poziomem *Fusobacteriales* i *Bacteroidales* w kale a stężeniem kwasu octowego w kale i kwasu masłowego w surowicy, również występowanie *Fusobacteriales* i *Bacteroidales* w kale było skorelowane dodatnio

- stężenie markerów *Enterobacteriales* w surowicy dodatnio korelowało z markerami *Fusobacteriales* i *Bacteroidales* oraz ze stężeniem kwasu octowego, propionowego i masłowego w surowicy
- stężenia badanych SCFAs w kale były wzajemnie skorelowane, w surowicy taką korelację wystąpiła jedynie dla kwasu mlekowego i octowego oraz propionowego (Tab. 36).

Tabela 36 Korelacje dla bakterii wybranych rzędów i SCFAs w surowicy i próbkach kału dla grupy kontrolnej (K) otrzymującej paszę z wysoką zawartością  $\alpha$ -celulozy (DW). Korelacja rangowa Spearmana,  $p < 0,05$

K-DW			
	R	t(N-2)	p
<i>Bacteroidales</i> (kał) & <i>Fusobacteriales</i> (kał)	1,00	36,82	0,0000
<i>Bacteroidales</i> (kał) & Kwas octowy (kał)	-0,59	-2,41	0,0346
<i>Bacteroidales</i> (kał) & Kwas mlekowy (surowica)	-0,68	-2,92	0,0153
<i>Fusobacteriales</i> (kał) & Kwas octowy (kał)	-0,63	-2,70	0,0205
<i>Fusobacteriales</i> (kał) & Kwas mlekowy (surowica)	-0,69	-3,03	0,0126
<i>Enterobacteriales</i> (surowica) & <i>Bacteroidales</i> (surowica)	0,71	3,22	0,0092
<i>Enterobacteriales</i> (surowica) & <i>Fusobacteriales</i> (surowica)	0,96	10,57	0,0000
<i>Enterobacteriales</i> (surowica) & Kwas octowy (surowica)	0,66	2,79	0,0190
<i>Enterobacteriales</i> (surowica) & Kwas propionowy (surowica)	0,62	2,51	0,0307
<i>Enterobacteriales</i> (surowica) & Kwas masłowy (surowica)	0,59	2,34	0,0415
<i>Bacteroidales</i> (surowica) & <i>Fusobacteriales</i> (surowica)	0,85	5,02	0,0005
<i>Bacteroidales</i> (surowica) & Kwas octowy (surowica)	0,63	2,57	0,0280
<i>Fusobacteriales</i> (surowica) & Kwas octowy (surowica)	0,72	3,30	0,0081
<i>Fusobacteriales</i> (surowica) & Kwas propionowy (surowica)	0,66	2,76	0,0202
Kwas mlekowy (kał) & Kwas octowy (kał)	0,81	4,71	0,0005
Kwas mlekowy (kał) & Kwas propionowy (kał)	0,79	4,43	0,0008
Kwas mlekowy (kał) & Kwas masłowy (kał)	0,75	3,88	0,0022
Kwas mlekowy (kał) & Kwas mlekowy (surowica)	0,62	2,50	0,0315
Kwas octowy (kał) & Kwas propionowy (kał)	0,94	9,41	0,0000
Kwas octowy (kał) & Kwas masłowy (kał)	0,79	4,52	0,0007
Kwas octowy (kał) & Kwas mlekowy (surowica)	0,60	2,38	0,0386
Kwas propionowy (kał) & Kwas masłowy (kał)	0,76	4,03	0,0017
Kwas masłowy (kał) & Kwas masłowy (surowica)	0,76	3,72	0,004
Kwas mlekowy (surowica) & Kwas octowy (surowica)	0,79	4,05	0,0023
Kwas mlekowy (surowica) & Kwas propionowy (surowica)	0,63	2,56	0,0283

W grupie myszy z postępującym procesem nowotworowym (MC38-EGFP) otrzymujących paszę standardową (DS) występuje ujemna korelacja pomiędzy markerami wszystkich rzędów w kale, a stężeniem markerów *Enterobacteriales*, oraz *Fusobacteriales* w surowicy

- stężenie *Enterobacteriales* w kale ujemnie korelowało ze stężeniem kwasu octowego i propionowego w kale oraz ze stężeniem kwasu mlekowego w surowicy
- *Bacteroidales* i *Fusobacteriales* ujemnie korelowały ze stężeniem kwasu octowego, zarówno w kale, jak i w surowicy
- stężenie markerów *Enterobacteriales* oraz *Fusobacteriales* dodatnio korelowało ze stężeniem kwasu octowego i propionowego w kale oraz ze stężeniem kwasu mlekowego i octowego w surowicy
- wystąpiła dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem kwasu octowego w kale a stężeniem kwasu propionowego w kale oraz kwasu mlekowego i octowego w surowicy (Tab. 37).

Tabela 37 Korelacje dla bakterii wybranych rzędów i SCFAs w surowicy i próbkach kału dla grupy z nowotworem (MC38/EGFP) otrzymującej paszę standardową (DS). Korelacja rangowa Spearmana,  $p < 0.05$

MC38-DS			
	R	t(N-2)	p
<i>Enterobacteriales</i> (kał) & <i>Enterobacteriales</i> (surowica)	-0,63	-2,56	0,0283
<i>Enterobacteriales</i> (kał) & <i>Fusobacteriales</i> (surowica)	-0,67	-2,86	0,0168
<i>Enterobacteriales</i> (kał) & Kwas octowy (kał)	-0,86	-6,20	0,0000
<i>Enterobacteriales</i> (kał) & Kwas propionowy (kał)	-0,71	-3,64	0,003
<i>Enterobacteriales</i> (kał) & Kwas mlekowy (surowica)	-0,78	-3,98	0,0026
<i>Bacteroidales</i> (kał) & <i>Fusobacteriales</i> (kał)	0,96	13,13	0,0000
<i>Bacteroidales</i> (kał) & <i>Enterobacteriales</i> (surowica)	-0,74	-3,49	0,0058
<i>Bacteroidales</i> (kał) & <i>Fusobacteriales</i> (surowica)	-0,81	-4,39	0,0014
<i>Bacteroidales</i> (kał) & Kwas mlekowy (kał)	-0,52	-2,20	0,0462
<i>Bacteroidales</i> (kał) & Kwas octowy (kał)	-0,64	-3,03	0,0097
<i>Bacteroidales</i> (kał) & Kwas octowy (surowica)	-0,71	-3,16	0,0102
<i>Fusobacteriales</i> (kał) & <i>Enterobacteriales</i> (surowica)	-0,78	-3,98	0,0026
<i>Fusobacteriales</i> (kał) & <i>Fusobacteriales</i> (surowica)	-0,84	-4,88	0,0006
<i>Fusobacteriales</i> (kał) & Kwas octowy (kał)	-0,60	-2,68	0,0189
<i>Fusobacteriales</i> (kał) & Kwas octowy (surowica)	-0,72	-3,28	0,0082
<i>Enterobacteriales</i> (surowica) & <i>Fusobacteriales</i> (surowica)	0,93	8,01	0,0000
<i>Enterobacteriales</i> (surowica) & Kwas octowy (kał)	0,85	5,17	0,0004
<i>Enterobacteriales</i> (surowica) & Kwas propionowy (kał)	0,64	2,61	0,0261

<i>Enterobacteriales</i> (surowica) & Kwas mlekowy (surowica)	0,69	3,03	0,0126
<i>Enterobacteriales</i> (surowica) & Kwas octowy (surowica)	0,80	4,18	0,0019
<i>Enterobacteriales</i> (surowica) & Kwas propionowy (surowica)	-0,62	-2,52	0,0303

<i>Bacteroidales</i> (surowica) & Kwas masłowy (kał)	0,64	2,61	0,0261
--	------	------	--------

<i>Fusobacteriales</i> (surowica) & Kwas octowy (kał)	0,84	4,88	0,0006
<i>Fusobacteriales</i> (surowica) & Kwas propionowy (kał)	0,66	2,76	0,0202
<i>Fusobacteriales</i> (surowica) & Kwas mlekowy (surowica)	0,69	3,03	0,0126
<i>Fusobacteriales</i> (surowica) & Kwas octowy (surowica)	0,66	2,76	0,0202

Kwas octowy (kał) & Kwas propionowy (kał)	0,81	4,99	0,0002
Kwas octowy (kał) & Kwas mlekowy (surowica)	0,78	3,98	0,0026
Kwas octowy (kał) & Kwas octowy (surowica)	0,71	3,16	0,0102

Kwas propionowy (kał) & Kwas mlekowy (surowica)	0,63	2,56	0,0283
---	------	------	--------

Kwas mlekowy (surowica) & Kwas propionowy (surowica)	-0,62	-2,52	0,0303
Kwas mlekowy (surowica) & Kwas masłowy (surowica)	0,63	2,56	0,0283

Kwas octowy (surowica) & Kwas propionowy (surowica)	-0,66	-2,79	0,019
---	-------	-------	-------

**W grupie myszy myszy z nowotworem jelita grubego otrzymujących paszę ze zwiększoną  $\alpha$ -celulozą** wystąpiła dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem markerów *Enterobacteriales*, a markerami *Bacteroidales* i *Fusobacteriales* oraz kwasem masłowym w kale

- markery *Fusobacteriales* i *Bacteroidales* w kale ujemnie korelowały ze stężeniem markerów *Fusobacteriales* w surowicy oraz stężeniem kwasów octowego, propionowego i masłowego w kale
- markery *Fusobacteriales* w surowicy ujemnie korelowały ze stężeniem kwasu masłowego w kale
- wystąpiły liczne dodatnie korelacje stężenia krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) (Tab. 38).

Tabela 38 Korelacje dla bakterii wybranych rzędów i SCFAs w surowicy i próbkach kału dla grupy z nowotworem (MC38/EGFP) otrzymującej paszę z wysoką zawartością  $\alpha$ -celulozy (DW). Korelacja rangowa Spearmana,  $p < 0,05$

MC38-DW			
	R	t(N-2)	p
<i>Enterobacteriales</i> (kał) & <i>Bacteroidales</i> (kał)	0,73	3,84	0,0021
<i>Enterobacteriales</i> (kał) & <i>Fusobacteriales</i> (kał)	0,68	3,30	0,0058
<i>Enterobacteriales</i> (kał) & Kwas masłowy (kał)	0,69	3,29	0,0064
<i>Bacteroidales</i> (kał) & <i>Fusobacteriales</i> (kał)	0,98	15,82	0,0000
<i>Bacteroidales</i> (kał) & <i>Fusobacteriales</i> (surowica)	-0,59	-2,34	0,0415
<i>Bacteroidales</i> (kał) & Kwas mlekowy (kał)	-0,67	-3,13	0,0087
<i>Bacteroidales</i> (kał) & Kwas octowy (kał)	-0,73	-3,72	0,0029
<i>Bacteroidales</i> (kał) & Kwas propionowy (kał)	-0,59	-2,51	0,0274
<i>Fusobacteriales</i> (kał) & <i>Fusobacteriales</i> (surowica)	-0,59	-2,34	0,0415
<i>Fusobacteriales</i> (kał) & Kwas mlekowy (kał)	-0,69	-3,28	0,0065
<i>Fusobacteriales</i> (kał) & Kwas octowy (kał)	-0,74	-3,77	0,0027
<i>Fusobacteriales</i> (kał) & Kwas propionowy (kał)	-0,62	-2,72	0,0186
<i>Enterobacteriales</i> (surowica) & Kwas masłowy (kał)	-0,60	-2,36	0,0397
<i>Bacteroidales</i> (surowica) & Kwas mlekowy (kał)	0,69	3,03	0,0126
<i>Bacteroidales</i> (surowica) & Kwas propionowy (surowica)	0,73	3,35	0,0074
<i>Fusobacteriales</i> (surowica) & Kwas masłowy (kał)	-0,69	-3,02	0,0130
Kwas mlekowy (kał) & Kwas propionowy (kał)	0,52	2,39	0,0307
Kwas mlekowy (kał) & Kwas octowy (surowica)	0,59	2,45	0,0325
Kwas mlekowy (kał) & Kwas propionowy (surowica)	0,62	2,59	0,0252
Kwas octowy (kał) & Kwas propionowy (kał)	0,84	5,90	0,0000
Kwas octowy (kał) & Kwas mlekowy (surowica)	0,63	2,67	0,022
Kwas octowy (kał) & Kwas octowy (surowica)	0,63	2,70	0,0205
Kwas octowy (kał) & Kwas masłowy (surowica)	0,60	2,48	0,0306
Kwas propionowy (kał) & Kwas octowy (surowica)	0,61	2,55	0,0269
Kwas mlekowy (surowica) & Kwas octowy (surowica)	0,89	6,48	0,0000
Kwas mlekowy (surowica) & Kwas masłowy (surowica)	0,96	10,81	0,0000
Kwas octowy (surowica) & Kwas masłowy (surowica)	0,83	4,93	0,0005

#### 6.2.6. Bakterie w mikrobiomie jelitowym myszy z nowotworem jelita grubego MC38-EGFP - hodowla bezpośrednia i identyfikacja z zastosowaniem MALDI-TOF

W wyniku hodowli bezpośredniej próbek kału myszy uzyskano 23 izolaty, które występowały w wszystkich próbach kału (niezależnie od typu nowotworu, rodzaju paszy i etapu doświadczenia) lub były ograniczone do jednej grupy (Tab. 39). Szczepy zidentyfikowane w systemie Biotyper osiągnęły wartości punktowe od 2,000 do 2,299, wymagane do wiarygodnego rozpoznania rodzaju i prawdopodobnej identyfikacji na poziomie gatunku. U osobników otrzymujących paszę z wysoką zawartością  $\alpha$ -celulozy wykazano największą liczbę taksonów bakteryjnych, co świadczy o związku różnorodności mikrobiomu z większą podażą błonnika.



Tabela 39 Bakterie w mikrobiomie jelitowym myszy z nowotworem jelita grubego MC38-EGFP (hodowla bezpośrednia, identyfikacja MALDI-TOF)

	0. dzień	15. dzień	30. dzień	45. dzień
K-DS	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Lactobacillus murinus</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>
	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>
	<i>Lactobacillus murinus</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Lactobacillus murinus</i>
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Staphylococcus epidermis</i>	
	<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Lactobacillus murinus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>		
		<i>Delftia acidovorans</i>		
		<i>Staphylococcus cohnii</i>		

K-DW	<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>
	<i>Lactobacillus murinus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	<i>Lactobacillus murinus</i>	<i>Lactobacillus murinus</i>
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>	
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Acinetobacter pittii</i>	<i>Lactobacillus murinus</i>	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Delftia acidovorans</i>		
		<i>Lactobacillus gasseri</i>		
		<i>Lactobacillus murinus</i>		
		<i>Staphylococcus lentus</i>		
		<i>Acinetobacter ursingii</i>		
	<i>Staphylococcus warneri</i>			

MC38/EGFP-DS	<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
	<i>Lactobacillus murinus</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>
	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	<i>Lactobacillus murinus</i>	<i>Lactobacillus murinus</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lactobacillus murinus</i>
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Acinetobacter schindleri</i>
		<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>	

MC38/EGFP-DW	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Acinetobacter pittii</i>
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Acinetobacter pittii</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>
	<i>Staphylococcus cohnii</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Lactobacillus murinus</i>
	<i>Lactobacillus murinus</i>	<i>Acinetobacter pittii</i>	<i>Lactobacillus murinus</i>	<i>Acinetobacter pittii</i>
	<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Lactobacillus murinus</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>
	<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Acinetobacter schindleri</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>Corynebacterium xerosis</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Delftia acidovorans</i>
		<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>
			<i>Hydrogenophaga flava</i>	
			<i>Acinetobacter johnsonii</i>	
			<i>Staphylococcus pasteurii</i>	
		<i>Delftia acidovorans</i>		

### 6.3. Model nowotworu jelita grubego MC38/0 - model podskórny (P) i dojelitowy (DJ)

W doświadczeniu na modelu nowotworu jelita grubego MC38/0 po podskórnym (P) i dojelitowym (DJ) podaniu komórek nowotworowych grupy myszy otrzymywały paszę standardową (dieta standardowa, DS) lub z wysoką zawartością skrobi ziemniaczanej (błonnik) (dieta wysokobłonnikowa, DW).

#### 6.3.1. Wyniki sekwencjonowania NGS w modelu nowotworu jelita grubego

Eksperyment podzielono na etapy ze względu na czas pobierania materiału:

Etap 0: 0 dzień, rozpoczęcie eksperymentu

Etap I: 0-20 dzień eksperymentu

Etap II: 20-45 dzień eksperymentu.

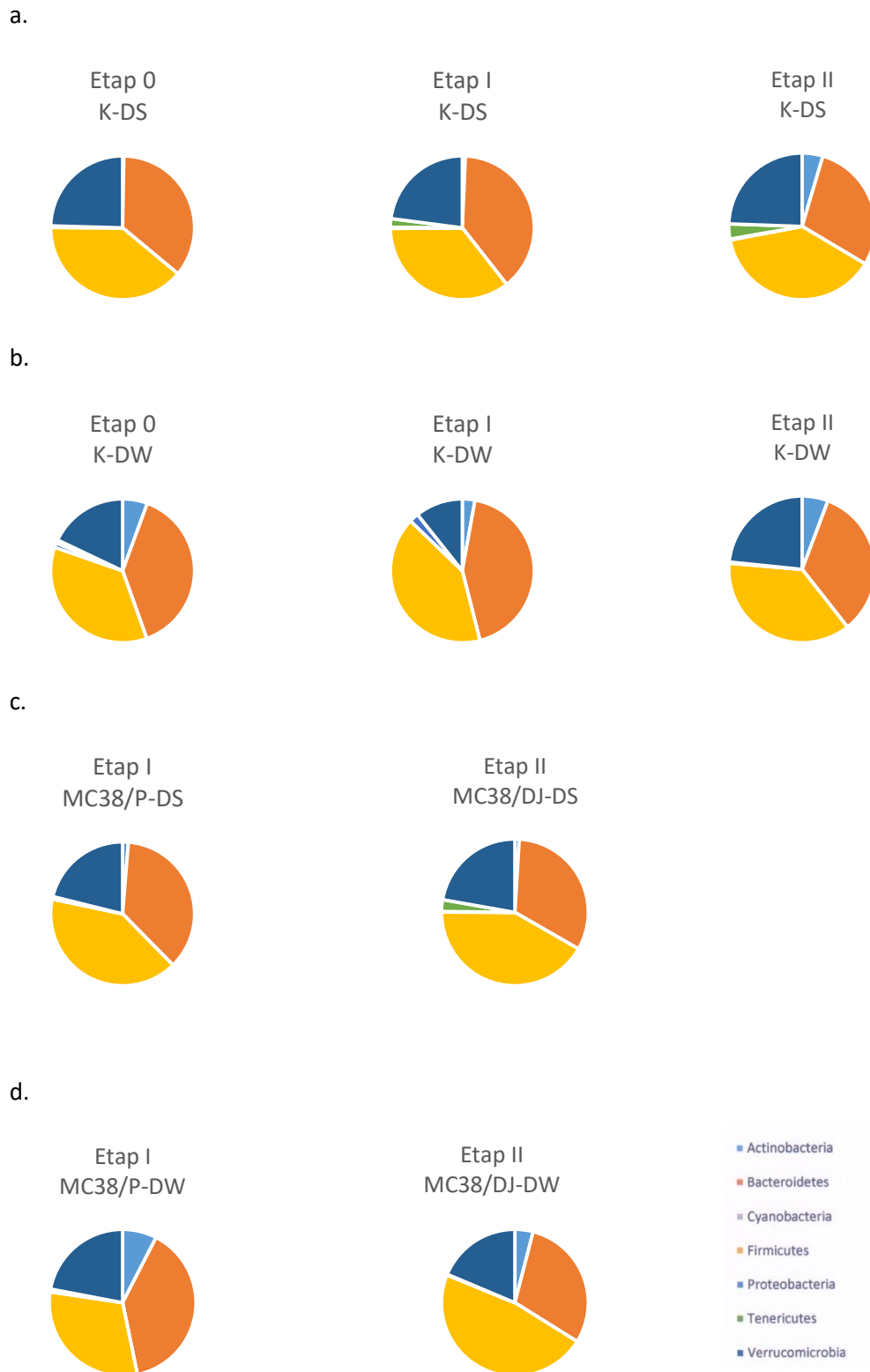
We wszystkich grupach myszy dominowały typy *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, następnie *Verrucomicrobia* i *Proteobacteria* (Rys. 45).

Analiza wyników NGS wykazała, że udział *Actinobacteria* i *Proteobacteria* jest w istotny sposób wyższy w grupach myszy otrzymujących paszę z wysoką zawartością skrobi i istotnie niższy dla *Tenericutes*. Najistotniejszą zmienną wpływającą na skład mikrobiomu jelitowego była 20-procentowa zawartość skrobi ziemniaczanej w paszy (Rys. 46).

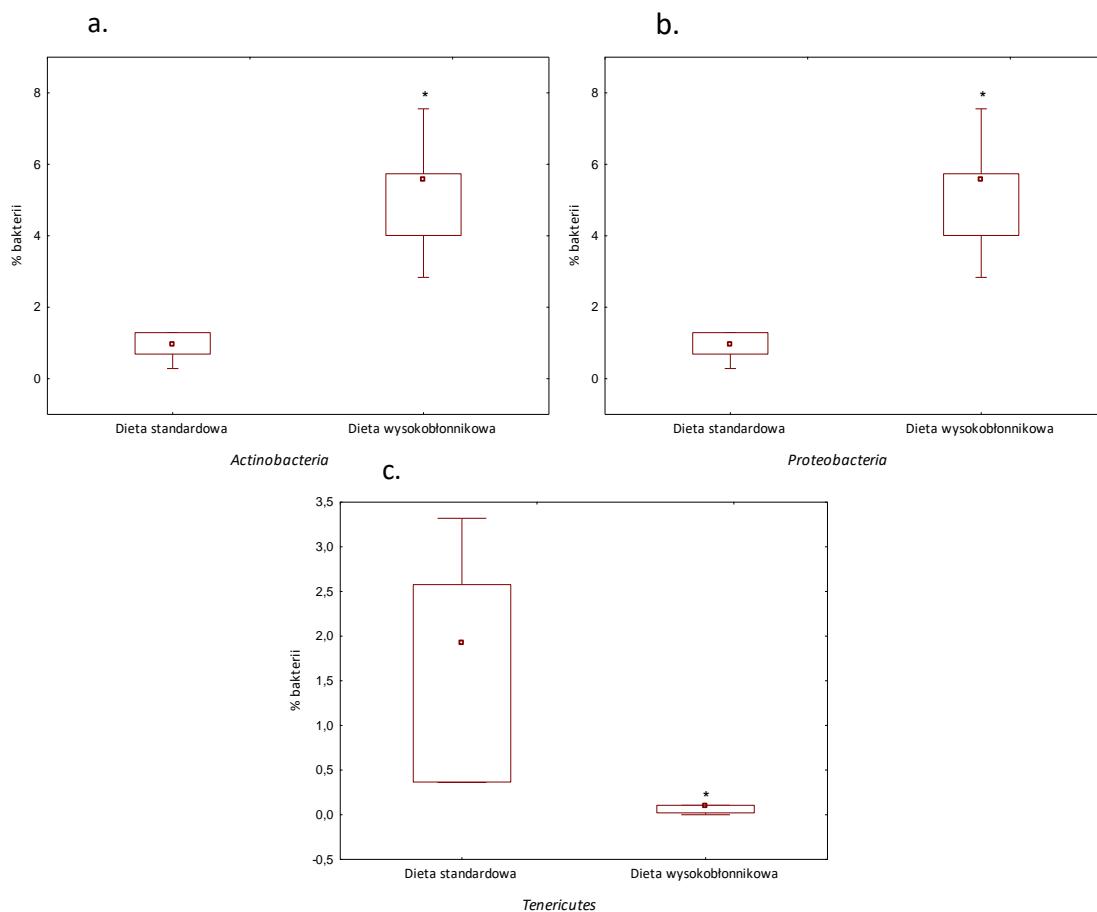
Wyniki sekwencjonowania NGS zestawiono na poziomie taksonomicznym rodzaju z uwzględnieniem grup z nowotworem wszczepionym dojelitowo (DJ) wobec grup myszy kontrolnych - bez nowotworu (K) (Tab. 40) oraz ze względu na paszę standardową (dieta standardowa, DS) bądź wzbogaconą w skrobię ziemniaczaną (dieta wysokobłonnikowa, DW) (Tab. 41, Rys. 47-48).

Odnotowano istotny wzrost ilości bakterii rzędu *Corynebacteriales* i rodzajów *Streptococcus*, *Romboutsia*, *GCA-900066225* (rodzina *Ruminococcaceae*) i *Pseudomonas*, oraz spadek *UCG-014* (rodzina *Ruminococcaceae*).

Największe zmiany w składzie mikrobiomu jelitowego wprowadziła obecność 20%-dodatku skrobi ziemniaczanej (błonnik). Istotny wzrost podczas zastosowania paszy wysokobłonnikowej odnotowano dla *Bifidobacterium*, *UCG-002* (*Coriobacteriaceae*), *Parvibacter*, *Faecalibacterium* sp. *UBA1819* (rodzina *Ruminococcaceae*), *Faecalibaculum* oraz rodziny *Clostridiales vadinBB60 group* i rzędu *Rhodospirillales*. Odnotowano spadek ilości rodzaju *Blautia*, *Peptococcus*, *Ruminococcus* *UCG-010* i *Anaeroplasma* oraz rodziny *Erysipelotrichaceae*.



Rysunek 45. Schematyczne zestawienie udziału typów bakterii w grupach myszy kontrolnych (K) i z nowotworem MC38/0 podanym podskórnie (P) lub dojelitowo (DJ); pasza (dieta) standardowa (DS) lub z wysoką zawartością skrobi (błonnika, DW). a. grupa kontrolna, pasza standardowa, b. grupa kontrolna, pasza z wysoką zawartością skrobi, c. porównanie modelu podskórnie i dojelitowo podanych komórek MC38/0, pasza standardowa; d. porównanie modelu podskórnie i dojelitowo podanych komórek MC38/0, pasza z wysoką zawartością skrobi.



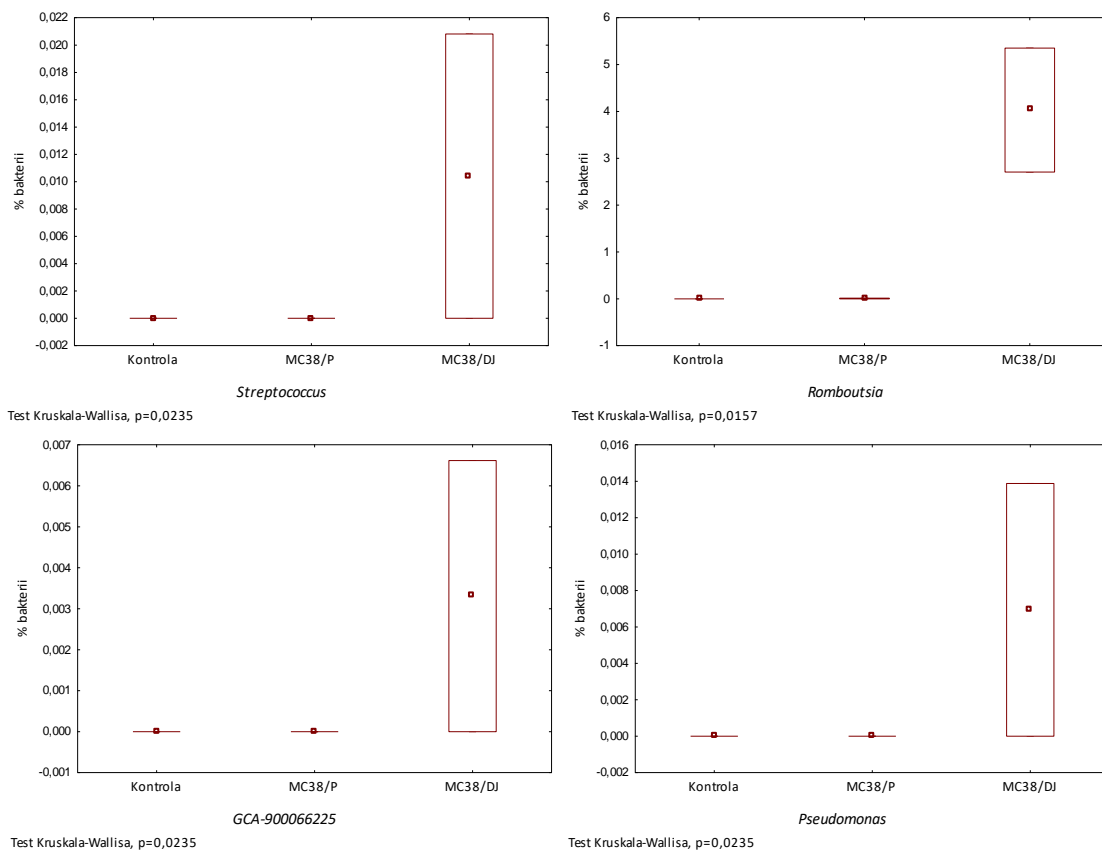
Rysunek 46 Udział procentowy bakterii na poziomie taksonomicznym typu w mikrobiomiejelita grubego, z uwzględnieniem zawartości skrobi w paszy; a. Actinobacteria; b. Proteobacteria; c. Tenericutes. (\*) Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS

Tabela 40 Mediana statystycznie istotnych ilości odczytów sekwencji DNA (NGS) w grupach, na poziomie rodzaju; K – kontrola, MC38 – nowotwór jelita grubego wszczepiony DOJELITOWO (DJ); test Manna-Whitneya,  $p < 0,05$

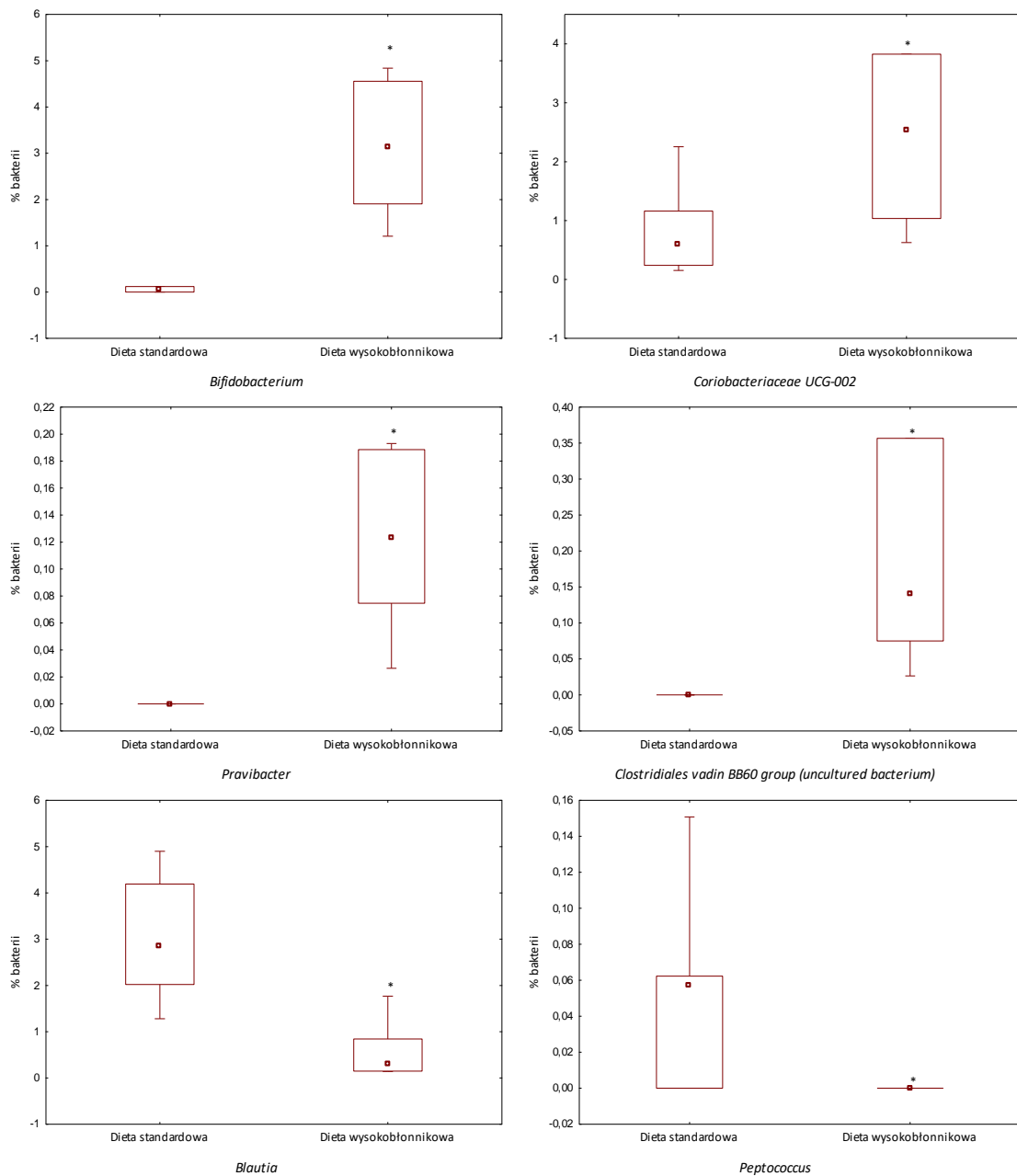
Rodzaj	Kontrola	MC38/DJ
	[mediana odczytów]	
D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Actinobacteria;D_3_Corynebacteriales;__;_	0	1,0↑
D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Bacilli;D_3_Lactobacillales;D_4_Streptococcaceae;D_5_Streptococcus	0	3,0↑
D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Peptostreptococcaceae;D_5_Romboutsia	0	1180,5↑
D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_GCA-900066225	0	1,0↑
D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae UCG-014	193,0	13,5↓
D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Gammaproteobacteria;D_3_Pseudomonadales;D_4_Pseudomonadaceae;D_5_Pseudomonas	0	2,0↑

Tabela 41 Mediana statystycznie istotnych ilości odczytów sekwencji DNA (NGS) w grupach, na poziomie rodzaju; pasza standardowa (DS), pasza z wysoką zawartością skrobi (wysokobłonnikowa); test Manna-Whitneya,  $p < 0,05$

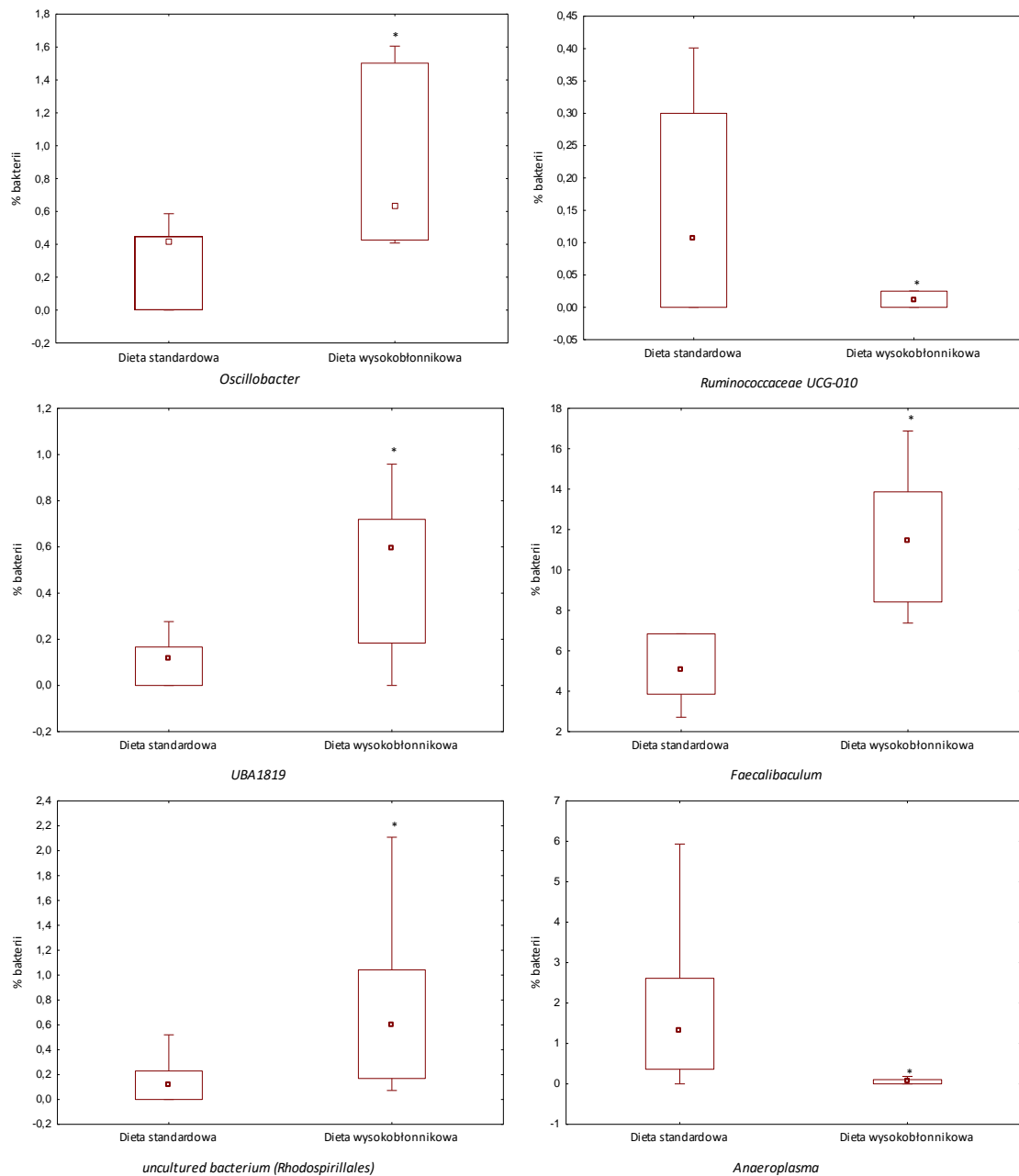
Rodzaj	Dieta standardowa	Dieta wysokobłonnikowa
	[mediana odczytów]	
D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Actinobacteria;D_3_Bifidobacteriales;D_4_Bifidobacteriaceae;D_5_Bifidobacterium	10,0	1018,0↑
D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Coriobacteriia;D_3_Coriobacteriales;D_4_Atopobiaceae;D_5_Coriobacteriaceae UCG-002	103,0	617,5↑
D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Coriobacteriia;D_3_Coriobacteriales;D_4_Eggerthellaceae;D_5_Parvibacter	0	37,5↑
D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Clostridiales vadinBB60 group;D_5_uncultured bacterium	0	57,0↑
D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae;D_5_Blautia	545,0	120,5↓
D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Peptococcaceae;D_5_Peptococcus	7,0	0,0↓
D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Oscillibacter	85,0	220,0↑
D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Ruminococcaceae UCG-010	32,0	3,0↓
D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae;D_5_Faecalibacterium sp. UBA1819	30,0	180,0↑
D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;__;_	64,0	7,5↓
D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Erysipelotrichia;D_3_Erysipelotrichales;D_4_Erysipelotrichaceae;D_5_Faecalibaculum	1810,0	4328,5↑
D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Erysipelotrichia;D_3_Erysipelotrichales;D_4_Erysipelotrichaceae;__;_	9,0	0↓
D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Alphaproteobacteria;D_3_Rhodospirillales;D_4_uncultured;__;_	28,0	201,0↑
D_0_Bacteria;D_1_Tenericutes;D_2_Mollicutes;D_3_Anaeroplasmatales;D_4_Anaeroplasmataceae;D_5_Anaeroplasma	389,0	26,0↓



**Rysunek 47** Udział procentowy bakterii na poziomie taksonomicznym rodzaju. K – grupa kontrolna; MC38 – grupa z nowotworem; DS – dieta standardowa; DW – dieta wysokobłonnikowa – wzbogacona skrobią oporną; P-model podskórny; DJ- model dojelitowy



Rysunek 48 Udział procentowy bakterii na poziomie taksonomicznym rodzaju w zależności od stosowanej diety; DS – dieta standardowa; DW – dieta wysokobłonnikowa – wzbogacona skrobią oporną; (\*) test Manna-Whitneya,  $p < 0,05$



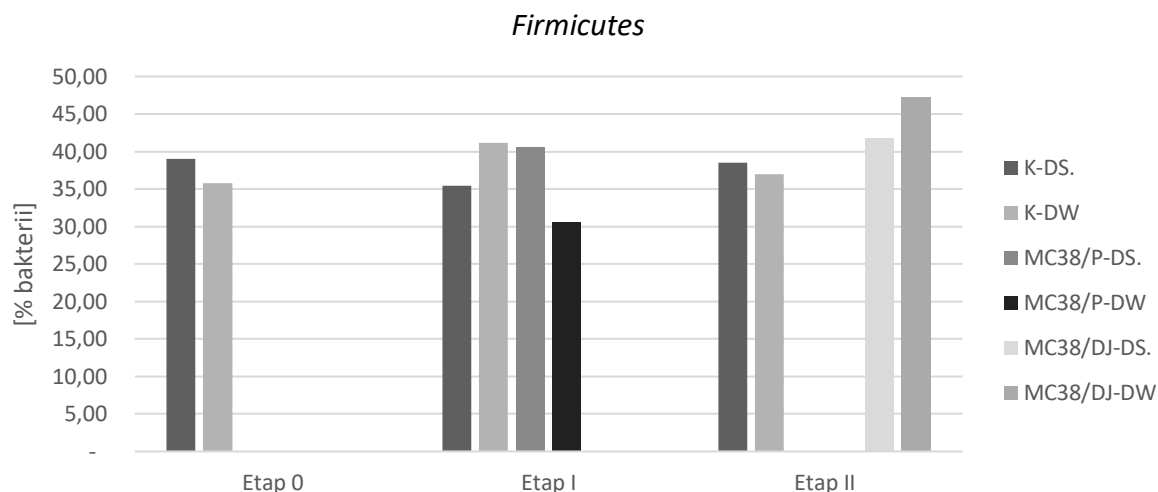
Rysunek 49 Udział procentowy bakterii na poziomie taksonomicznym rodzaju w zależności od stosowanej diety; DS – dieta standardowa; DW – dieta wysokobłonnikowa – wzbogacona skrobią oporną; (\*) test Manna-Whitneya,  $p < 0,0$



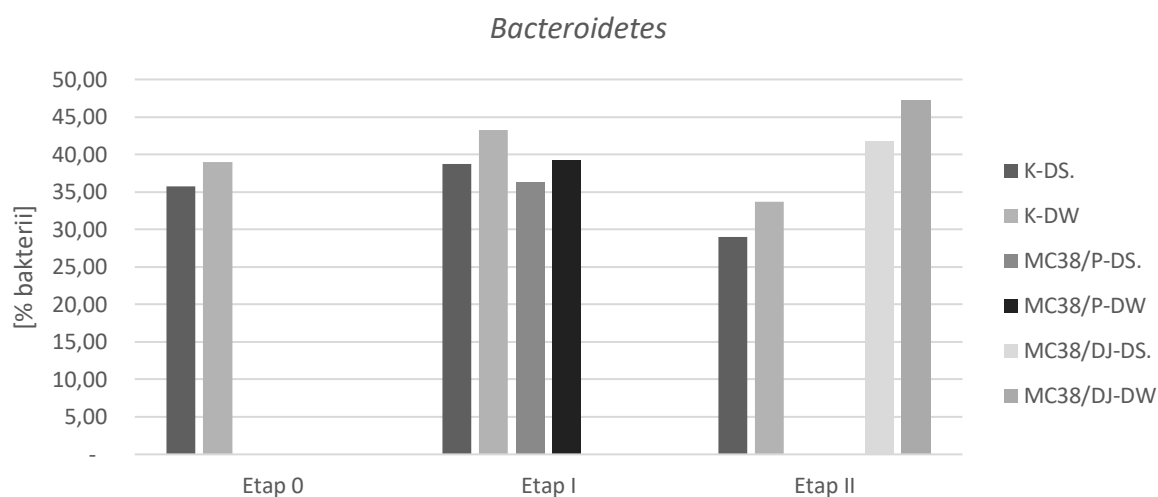
W większości przypadków proporcja bakterii typów *Firmicutes* i *Bacteroidetes* była wyższa w grupach myszy otrzymujących paszę standardową; wyjątkiem były myszy z dojelitowo wszczepionego nowotworu MC38, w której przy paszy z wysoką zawartością skrobi współczynnik *Firmicutes*:*Bacteroidetes* był wyższy i wiązał się z dominacją *Firmicutes* (Tab. 42, Rys. 50-52).

Tabela 42 Procentowa zawartość przedstawicieli *Firmicutes* i *Bacteroidetes* w mikrobiomie oraz stosunek w modelu nowotworu jelita grubego MC38/0; grupy myszy: kontrola (K); podanie nowotworu MC38/0 podskórnym (MC39/P) i dojelitowo (DJ); pasza standardowa (DS), pasza z wysoką zawartością skrobi opornej (DW)

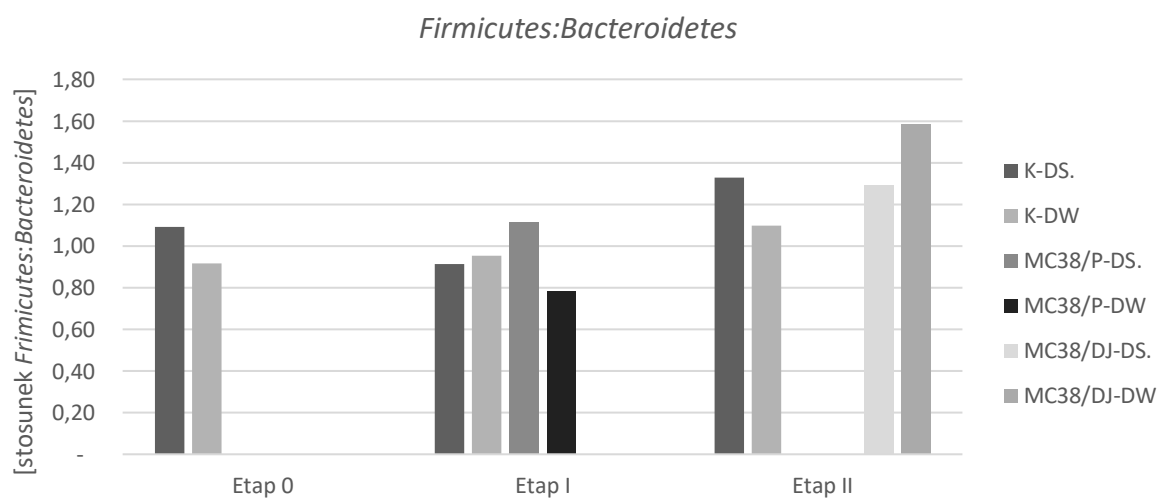
		Etap 0	Etap I	Etap II
K-DS	<i>Firmicutes</i>	39,05	35,43	38,47
	<i>Bacteroidetes</i>	35,75	38,73	28,98
	<i>Firmicutes</i> : <i>Bacteroidetes</i>	1,09	0,91	1,33
K-DW	<i>Firmicutes</i>	35,74	41,15	36,95
	<i>Bacteroidetes</i>	38,96	43,22	33,66
	<i>Firmicutes</i> : <i>Bacteroidetes</i>	0,92	0,95	1,10
MC38/P-DS	<i>Firmicutes</i>		40,63	
	<i>Bacteroidetes</i>		36,36	
	<i>Firmicutes</i> : <i>Bacteroidetes</i>		1,12	
MC38/P-DW	<i>Firmicutes</i>		30,59	
	<i>Bacteroidetes</i>		39,22	
	<i>Firmicutes</i> : <i>Bacteroidetes</i>		0,78	
MC38/DJ-DS	<i>Firmicutes</i>			41,75
	<i>Bacteroidetes</i>			32,33
	<i>Firmicutes</i> : <i>Bacteroidetes</i>			1,29
MC38/DJ-DW	<i>Firmicutes</i>			47,29
	<i>Bacteroidetes</i>			29,87
	<i>Firmicutes</i> : <i>Bacteroidetes</i>			1,58



Rysunek 50 Porównanie ilości bakterii typu *Firmicutes* w próbkach kału w modelu nowotworu jelita grubego MC38/0



Rysunek 51 Porównanie ilości bakterii typu *Bacteroidetes* w próbkach kału w modelu nowotworu jelita grubego MC38/0



Rysunek 52 Stosunek *Firmicutes:Bacteroidetes* w próbkach kału w modelu nowotworu jelita grubego MC38/0

### 6.3.2. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFAs) w grupach myszy z nowotworem jelita grubego MC38/0

Myszy otrzymujące paszę z wysoką zawartością skrobi odpornej charakteryzowało niższe stężenie **kwasu mlekowego** w kale w porównaniu do osobników otrzymujących paszę standardową. Istotne różnice obserwowano w 20. dniu eksperymentu u myszy chorych, zarówno w modelu podskórnym, jak dojelitowym (Rys. 53a).

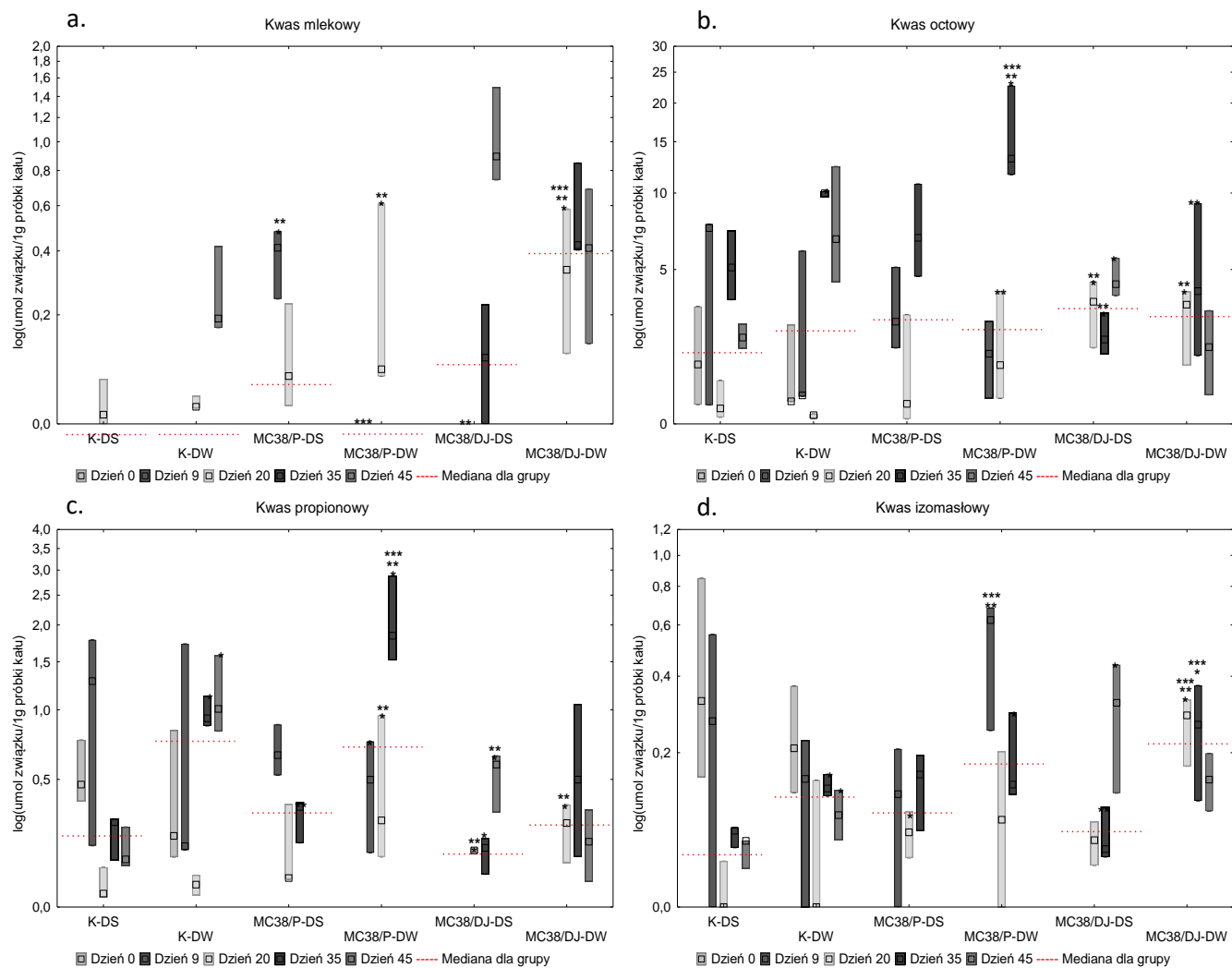
Stężenie **kwasu octowego** w kale nie odznaczało się zmiennością. Odnotować należy wzrost mediany stężenia kwasu octowego w grupach z nowotworem w 20. i 35. dniu eksperymentu, wyższy w grupie z nowotworem w modelu dojelitowym otrzymującej paszę z wysoką zawartością skrobi odpornej (Rys. 53b).

Stężenie **kwasu propionowego** w kale było wyższe we grupach otrzymujących paszę z 20% dodatkiem skrobi odpornej (w porównaniu myszy otrzymujących dietę standardową). Istotne zmiany wystąpiły w 20. i 35. dniu eksperymentu, gdy rozmiar guzów nowotworowych był największy. Myszy w grupach z nowotworem podanym podskórnym charakteryzowało wyższe stężenie kwasu propionowego w porównaniu do modelu dojelitowego (Rys. 53c).

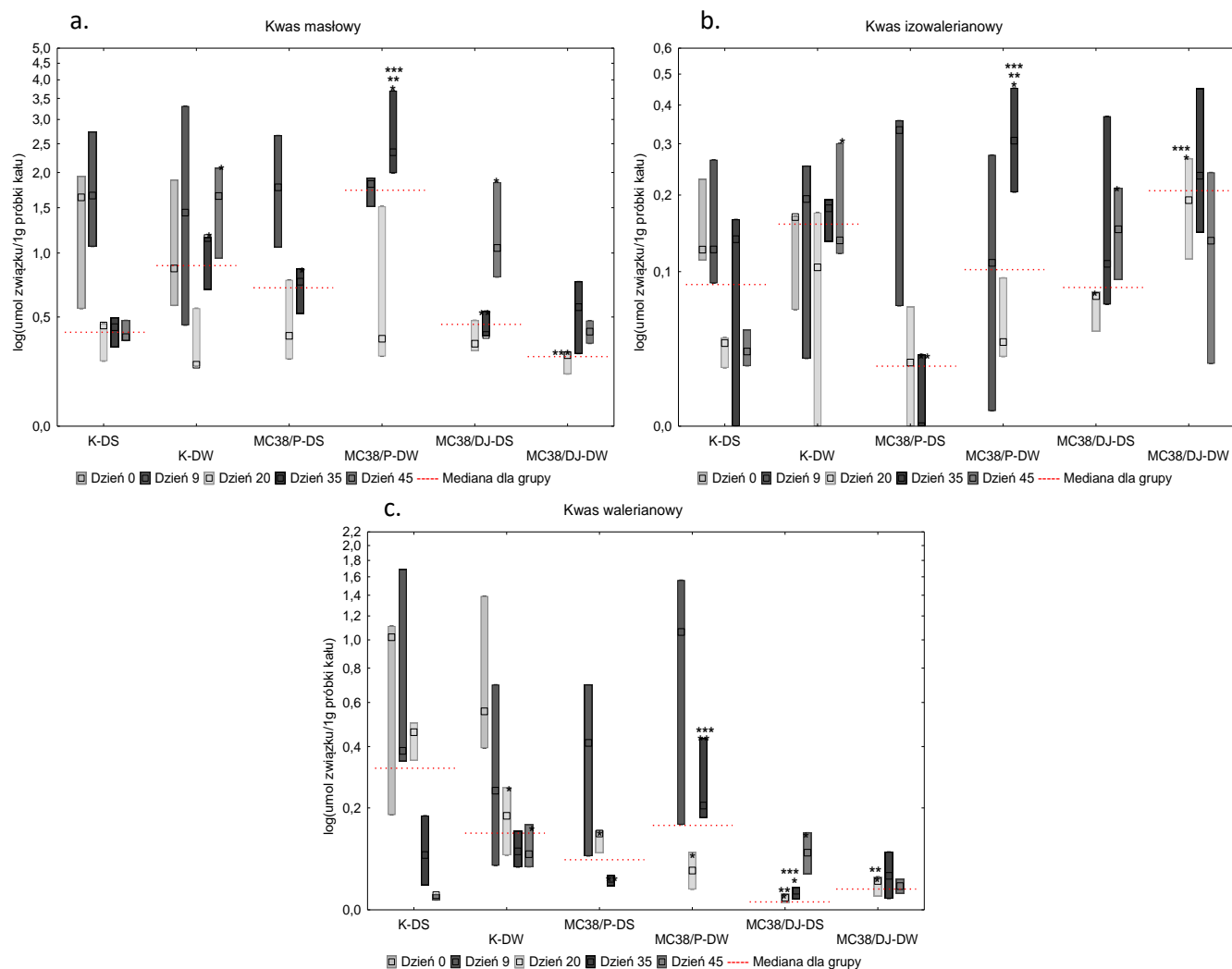
Podobne zależności wykazano dla **kwasu izomasłowego** (Rys. 53d) i **kwasu masłowego: wyższe stężenia występują** w grupach otrzymujących paszę z wysoką zawartością skrobi odpornej (w porównaniu grup otrzymujących paszę standardową) za wyjątkiem grupy o dojelitowym modelu podania nowotworu (Rys. 53d).

Stężenie **kwasu izowalerianowego** w kale powtarza zależności obserwowane w innych SCFA, i jest wyższe w w grupach otrzymujących paszę z wysoką zawartością skrobi odpornej, największe zmiany zaobserwowano w 20 i 35 dniu eksperymentu (Rys. 54b).

Stężenie **kwasu walerianowego** w kale zmieniało się w trakcie eksperymentu. Mediana stężenia kwasu walerianowego jest najniższa u myszy w modelu dojelitowym, a najwyższa u myszy grup kontrolnych. (Rys. 54c).



Rysunek 53 Stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w próbkach kału w grupach modelu nowotworu jelita grubego MC38/0 (\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-D-S.; \*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-D-W; \*\*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  MC38/EGFP-D-S względem MC38/EGFP-D-W)



Rysunek 54 Stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w próbkach kału w grupach modelu nowotworu jelita grubego MC38/0 (\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS.; \*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DW; \*\*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  MC38/EGFP-DS względem MC38/EGFP-DW)

U myszy z rozwijającym się nowotworem, zarówno w modelu podskórnym, jak dojelitowym, profil krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych różnił się od profilu u myszy zdrowych. Już od 9. dnia eksperymentu w grupach myszy z nowotworem MC38/P otrzymujących paszę standardową istotnie wzrosło stężenie kwasu mlekowego w kale oraz stężenie kwasu izomasłowego w grupie otrzymujących paszę z wysoką zawartością skrobi opornej w porównaniu do grup kontrolnych (Tab. 43).

W 20. dniu eksperymentu pojawiły się zmiany w profilu SCFAs: poziom kwasów mlekowego, octowego i propionowego w kale w grupach MC38/P otrzymujących paszę z wysoką zawartością skrobi odpornej był istotnie wyższy w porównaniu do grup kontrolnych. Podobną zależność obserwowano dla wszystkich badanych SCFA w grupie MC38/DJ (model dojelitowy) otrzymujących paszę o zwiększonej zawartości skrobi opornej.

W 35. dniu eksperymentu obserwowano podobną zależność: grupy myszy z podskórnie podanymi komórkami nowotworowymi (MC38/P), otrzymujące paszę z wysoką zawartością skrobi odpornej wykazywały istotnie wyższe stężenie wszystkich SCFAs (oprócz kwasu mlekowego) w porównaniu do grup kontrolnych, natomiast u myszy z grupy MC38/DJ-DW wykazano wyższy poziom kwasów mlekowego i propionowego. Grupy otrzymujące paszę standardową charakteryzowały się niżym stężeniem SCFAs w kale, co szczególnie dotyczyło grupy MC38/DJ, w której stężenia kwasów octowego, propionowego, izomasłowego i masłowego są istotnie niższe w porównaniu do grup kontrolnych (Tab. 43).

W 45. dniu eksperymentu u myszy zdrowych otrzymujących paszę z wysoką zawartością skrobi odpornej obserwowaliśmy istotnie wyższe stężenie SCFAs w porównaniu do zwierząt otrzymujących paszę standardową. Grupy z rozwiniętym nowotworem jelita grubego, otrzymujące paszę standardową, wykazywały wyższe stężenie SCFAs, w porównaniu do zwierząt kontrolnych (Tab. 43).

Podsumowując, profil krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych zmieniał się w czasie trwania eksperymentu: dodatek skrobi odpornej powodował istotne zmiany profilu SCFAs i w przypadku większości badanych kwasów (oprócz kwasu mlekowego i w ograniczonym stopniu kwasu octowego) był związany ze wzrostem ich stężenia w kale. W grupach z nowotworowymi myszy otrzymujące paszę ze zwiększoną zawartością skrobi odpornej charakteryzował wyższy poziom badanych SCFAs (oprócz kwasu mlekowego i w ograniczonym stopniu kwasu octowego) za wyjątkiem grupy modelu dojelitowego, w której poziom kwasu masłowego był niższy w porównaniu do grup kontrolnych, a także modelu podskórnego bez względu na skład paszy. Największa zmienność stężenia SCFAs wystąpiła między 20. a 35. dniem eksperymentu (Tab. 43).

Tabela 43 Profil SCFAs w próbkach kału w modelach nowotworu jelita grubego

		SCFA [ $\mu\text{mol/g}$ kału]						
		Kw. mlekowy	Kw. octowy	Kw. propionowy	Kw. izo-masłowy	Kw. masłowy	Kw. izo-walerianowy	Kw. walerianowy
<b>0. dzień</b>	K-DS	0	1,38	0,47	0,32	1,63	0,12	1,02
	K-DW	0	0,46	0,23	0,21	0,86	0,17	0,56
<b>9. dzień</b>	K-DS	0	7,41	1,28	0,27	1,66	0,12	0,38
	K-DW	0	0,6	0,19	0,15	1,44	0,19	0,25
	MC38/P-DS	0,41 <sup>*,**</sup>	2,74	0,65	0,13	1,78	0,33	0,42
	MC38/P-DW	0 <sup>***</sup>	1,69	0,5	0,62 <sup>**,***</sup>	1,83	0,11	1,06
<b>20. dzień</b>	K-DS	0,01	0,31	0,04	0	0,45	0,04	0,46
	K-DW	0,02	0,17	0,06	0	0,24	0,1	0,18 <sup>*</sup>
	MC38/P-DS	0,07	0,41	0,08	0,07 <sup>*</sup>	0,39	0,03	0,14 <sup>*</sup>
	MC38/P-DW	0,08 <sup>*,**</sup>	1,36 <sup>**</sup>	0,29 <sup>*,**</sup>	0,09	0,37	0,04	0,06 <sup>*</sup>
	MC38/DJ-DS	0 <sup>**</sup>	3,52 <sup>*,**</sup>	0,17 <sup>*,**</sup>	0,06	0,34	0,08 <sup>*</sup>	0,02 <sup>*,**</sup>
	MC38/DJ-DW	0,33 <sup>*,**</sup>	3,4 <sup>*,**</sup>	0,28 <sup>*,**</sup>	0,29 <sup>*,**,*</sup>	0,29 <sup>***</sup>	0,19	0,04 <sup>*,**</sup>
<b>35. dzień</b>	K-DS	0	5,1	0,29	0,08	0,44	0,14	0,09
	K-DW	0	9,98 <sup>*</sup>	0,93 <sup>*</sup>	0,14 <sup>*</sup>	1,15 <sup>*</sup>	0,18	0,1
	MC38/P-DS	0	6,79	0,36 <sup>**</sup>	0,16	0,75 <sup>*</sup>	0 <sup>**</sup>	0,05 <sup>**</sup>
	MC38/P-DW	0	13,18 <sup>*,**,*</sup>	1,84 <sup>*,**,*</sup>	0,14 <sup>*</sup>	2,34 <sup>*,**,*</sup>	0,31 <sup>*,**,*</sup>	0,21 <sup>*,**,*</sup>
	MC38/DJ-DS	0,11	2,13 <sup>*,**</sup>	0,18 <sup>**</sup>	0,05 <sup>**</sup>	0,39 <sup>**</sup>	0,11	0,03 <sup>*,**</sup>
	MC38/DJ-DW	0,42 <sup>*,**,*</sup>	3,98 <sup>**</sup>	0,5	0,26 <sup>*,**</sup>	0,56	0,23	0,05
<b>45. dzień</b>	K-DS	0	2,19	0,14	0,06	0,38	0,04	0,02
	K-DW	0,19 <sup>*</sup>	6,7 <sup>*</sup>	1,01 <sup>*</sup>	0,1 <sup>*</sup>	1,65 <sup>*</sup>	0,14 <sup>*</sup>	0,09 <sup>*</sup>
	MC38/DJ-DS	0,89 <sup>*,**</sup>	4,29 <sup>*</sup>	0,59 <sup>*,**</sup>	0,32 <sup>*</sup>	1,05 <sup>*</sup>	0,15 <sup>*</sup>	0,1 <sup>*</sup>
	MC38/DJ-DW	0,41	1,88	0,21	0,15	0,41	0,14	0,04

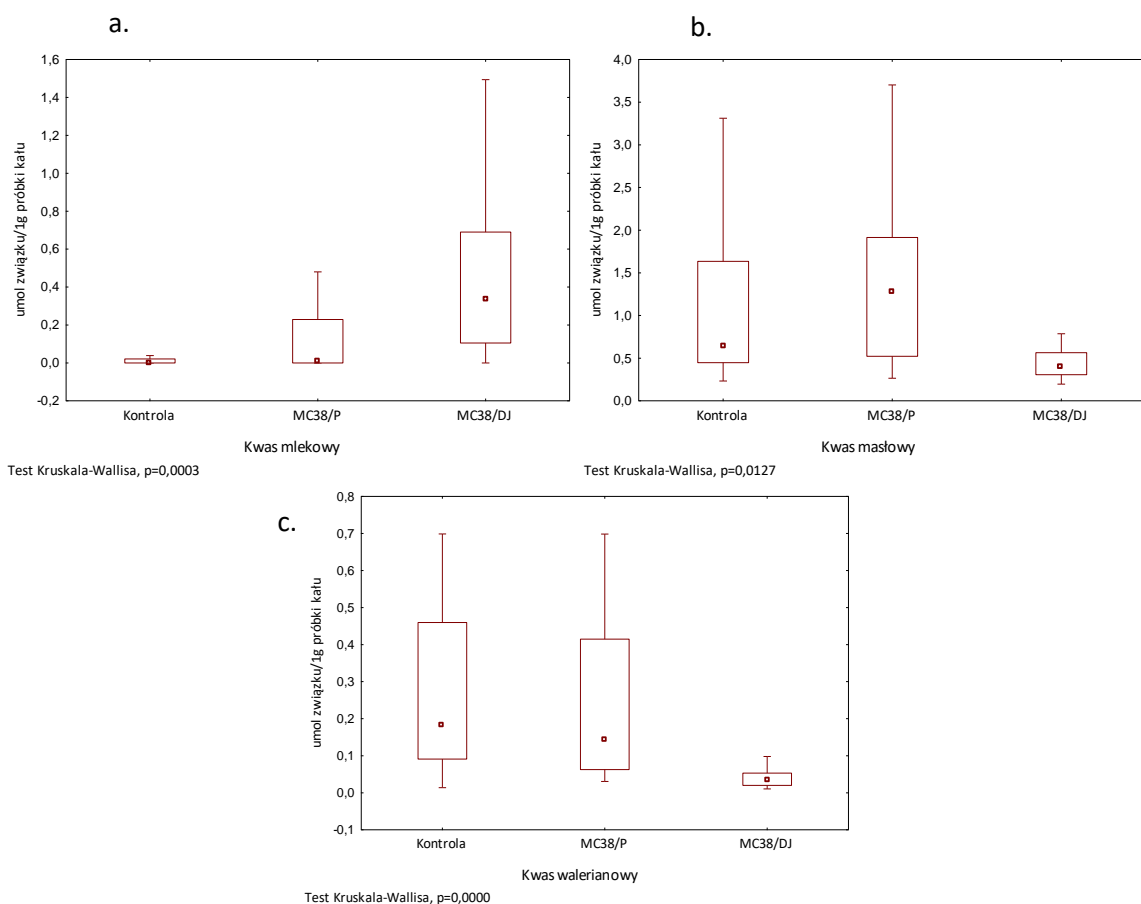
\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS

\*\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DW

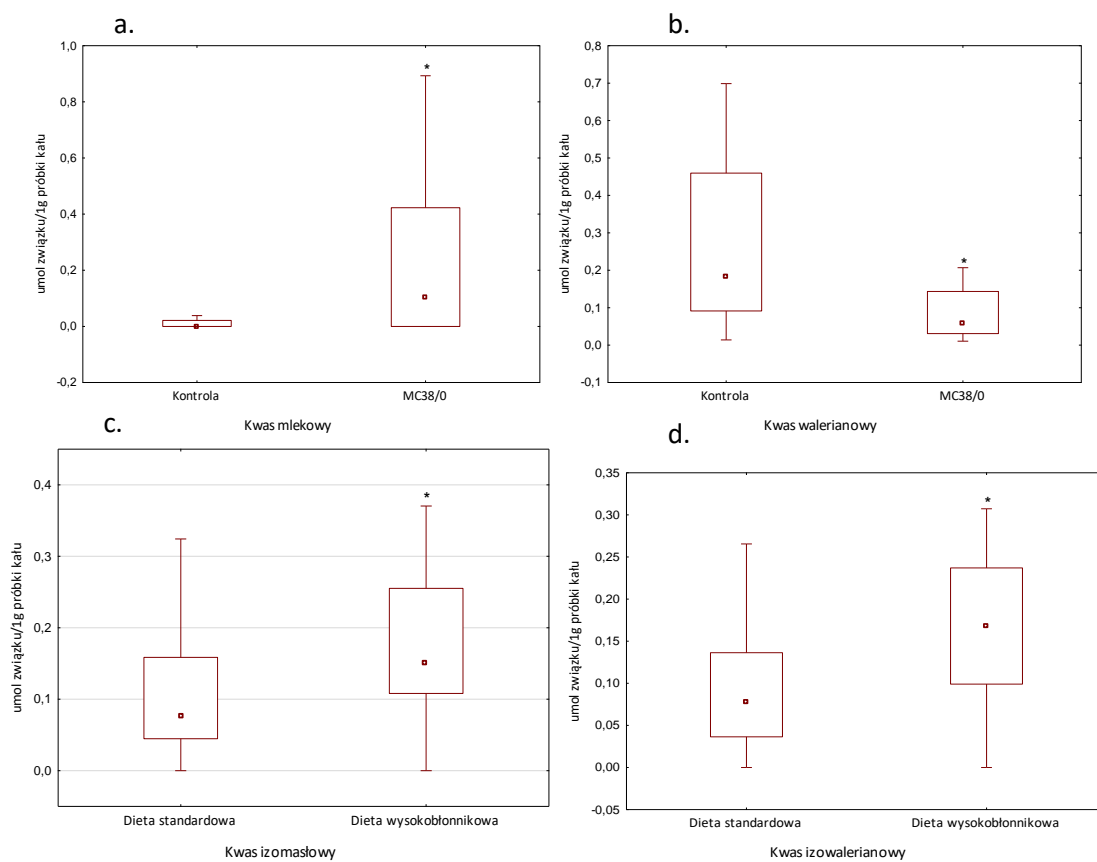
\*\*\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  MC38-DS względem MC38-DW

Wykazano istotne statystycznie różnice: stężenie kwasu masłowego i walerianowego w kale było niższe w grupach z dojelitowo wszczepionym nowotworem MC38/0, natomiast stężenie kwasu mlekowego było w tych grupach wyższe (Rys. 55).

U myszy zdrowych wykazano istotnie statystycznie niższe stężenie kwasu mlekowego i niższe kwasu walerianowego w kale. Zwiększona zawartość skrobi odpornej w paszy była związana ze wzrostem stężenia kwasów izomasłowego i izowalerianowego (Rys. 56).



Rysunek 55 SCFAs w próbkach kału w modelach nowotworu jelita grubego



Rysunek 56 SCFAs w próbkach kału w modelach nowotworu jelita grubego;

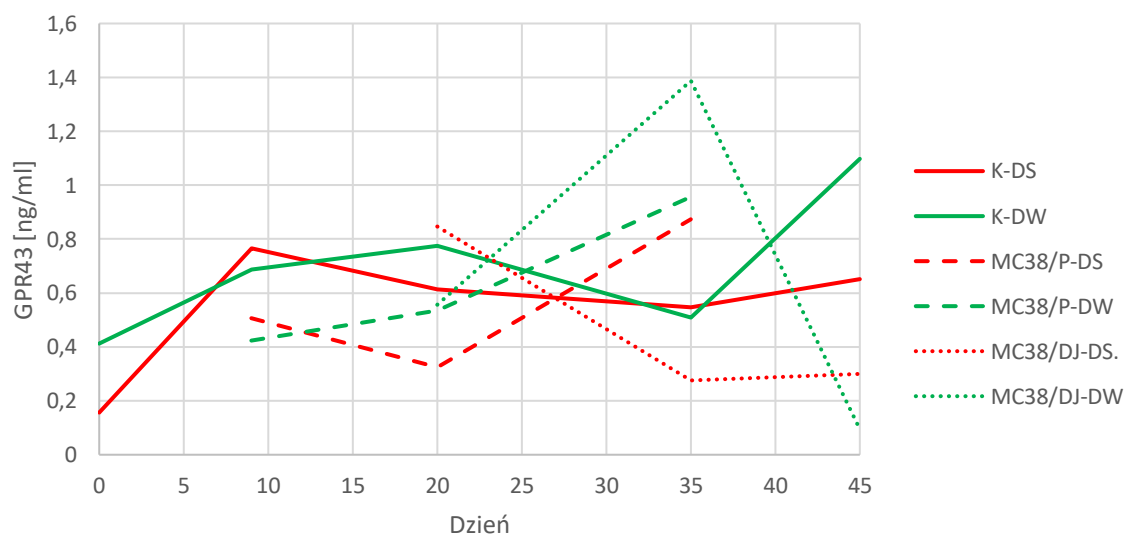
\* Test U Manna-Whitneya,  $p<0.05$  względem K-DS



### 6.3.3. Poziom receptorów krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych GPR43 w próbkach tkanek jelita w modelach nowotworu jelita grubego MC38/0

Stężenie receptorów GPR43 w jelicie było zmienne w zależności od grupy i czasu trwania eksperymentu. Grupy otrzymujące dietę z wysoką zawartością skrobi opornej charakteryzowały się wyższym stężeniem receptorów GPR43 w porównaniu do paszy standardowej (Rys. 57), szczególnie w grupach myszy z nowotworem, u których był istotnie wyższy, gdy otrzymywały paszę o zwiększonej ilości skrobi opornej. Między 25. i 35. dniem eksperymentu, gdy trwał równocześnie proces zapalny i nowotworowy poziom GPR43 był najwyższy, po 45. dniu eksperymentu różnice między grupami zmniejszały się (Tab. 44).

Obserwacja grupy modelu dojelitowo podanego nowotworu MC38/0 (DJ) wykazała znaczenie obecności skrobi opornej w paszy, ponieważ u osobników otrzymujących wersję standardową stężenie jelitowe receptorów GPR43 było istotnie niższe; dla modelu podskórnego (P) nowotworu tendencja była podobna. W grupach kontrolnych różnice w poziomie receptora GPR43 były nieznaczne (Rys. 57, Tab. 44).



Rysunek 57 Stężenie receptorów GPR43 w modelach nowotworu jelita grubego MC38/0. Kolor zielony – pasza ze zwiększoną (20%) zawartością skrobi opornej; kolor czerwony – pasza standardowa (5%). K-kontrola; P-model nowotworu MC38/0 podany podskórnie; DJ-model nowotworu MC38/0 podany dojelitowo; DS-pasza standardowa; DW-pasza z wysoką zawartością skrobi opornej

Tabela 44 Stężenie jelitowych receptorów GPR43 w próbkach jelita w modelu nowotworu jelita grubego MC38/0. K-kontrola; P-model nowotworu MC38/0 podany podskórnie; DJ-model nowotworu MC38/0 podany dojelitowo; DS-pasza standardowa; DW-pasza z wysoką zawartością skrobi opornej

	Grupa	GPR43 [ng/ml]
<b>0.dzień</b>	K-DS	0,16
	K-DW	0,41*
<b>9.dzień</b>	K-DS	0,77
	K-DW	0,69
	MC38/P-DS	0,51 <sup>*,**</sup>
	MC38/P-DW	0,42 <sup>*,**</sup>
<b>20.dzień</b>	K-DS	0,61
	K-DW	0,78*
	MC38/P-DS	0,32 <sup>*,**</sup>
	MC38/P-DW	0,53 <sup>*,**,*</sup>
	MC38/DJ-DS	0,85 <sup>*,**</sup>
	MC38/DJ-DW	0,56 <sup>*,**,*</sup>
<b>35.dzień</b>	K-DS	0,55
	K-DW	0,51*
	MC38/P-DS	0,87 <sup>*,**</sup>
	MC38/P-DW	0,96 <sup>*,**,*</sup>
	MC38/DJ-DS	0,28 <sup>*,**</sup>
	MC38/DJ-DW	1,39 <sup>*,**,*</sup>
<b>45.dzień</b>	K-DS	0,65
	K-DW	1,1*
	MC38/DJ-DS	0,3 <sup>*,**</sup>
	MC38/DJ-DW	0,1 <sup>*,**,*</sup>

\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS

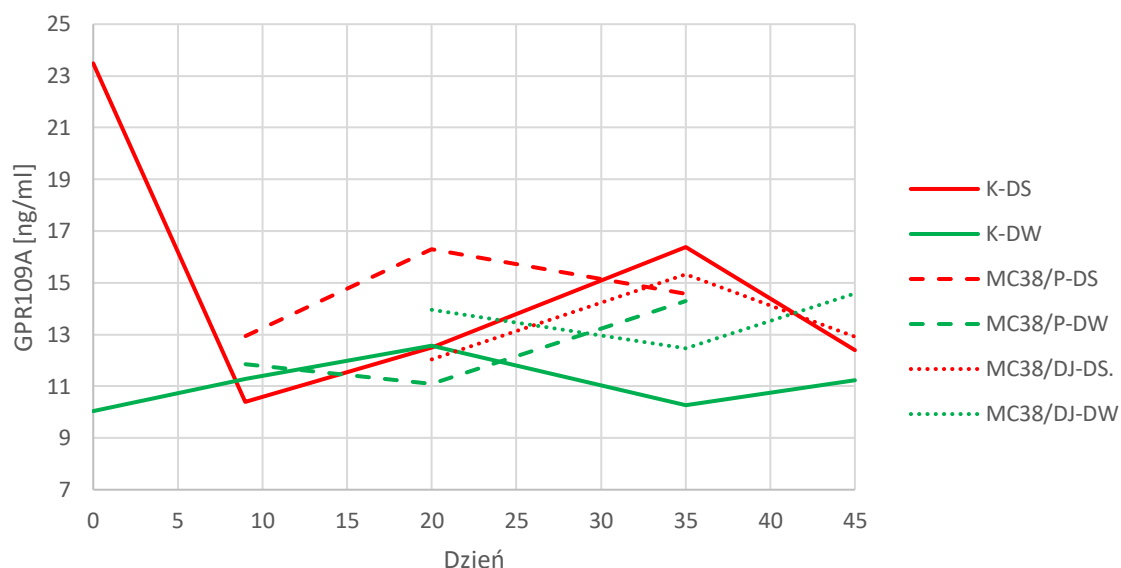
\*\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DW

\*\*\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  MC38-DS względem MC38-DW

#### 6.3.4. Poziom receptorów krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych GPR109A w próbkach tkanek jelita w modelach nowotworu jelita grubego MC38/0

Stężenie receptorów GPR109A w jelicie było zmienne w trakcie trwania eksperymentu.: między 9. a 25. dniem eksperymentu, podczas intensywnego wzrostu guzów, u myszy otrzymujących paszę standardową występowało wyższe stężenie receptorów GPR109A w porównaniu do grupy otrzymującej paszę z wysoką zawartością skrobi opornej; w miarę postępowania eksperymentu (i pogarszania się stanu myszy) poziomu receptorów wyrównywał się w obu grup (Rys. 58, Tab. 45).

Wykazaliśmy, że amplituda poziomu receptorów GPR109A między grupami otrzymującymi paszę z różną zawartością skrobi opornej jest podobna dla grup kontrolnych (K) i w modelu nowotworu podanego podskórnym (P), a mniejsza dla modelu nowotworu podanego dojelitowo (DJ) (Rys. 58, Tab. 45).



Rysunek 58 Stężenie receptorów GPR109A w modelach nowotworu jelita grubego MC38/0; Kolor zielony – pasza ze zwiększoną (20%) zawartością skrobi opornej; kolor czerwony – pasza standardowa (5%). K-kontrola; P-model nowotworu MC38/0 podany podskórnym; DJ-model nowotworu MC38/0 podany dojelitowo; DS-pasza standardowa; DW-pasza z wysoką zawartością skrobi opornej

Tabela 45 Stężenie jelitowe receptorów GPR109A w próbkach jelita w modelu nowotworu jelita grubego MC38/0. K-kontrola; P-model nowotworu MC38/0 podany podskórnice; DJ-model nowotworu MC38/0 podany dojelitowo; DS-pasza standardowa; DW-pasza z wysoką zawartością skrobi opornej

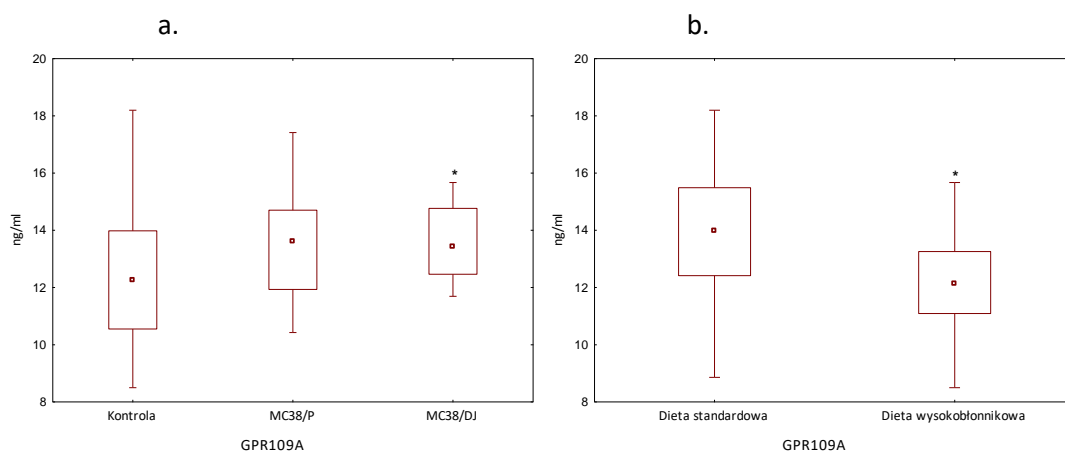
	Grupa	GPR109A [ng/ml]
<b>0.dzień</b>	K-DS	23,49
	K-DW	10,04*
<b>9.dzień</b>	K-DS	10,4
	K-DW	11,29
	MC38/P-DS	12,94
	MC38/P-DW	11,85***
<b>20.dzień</b>	K-DS	12,49
	K-DW	12,57
	MC38/P-DS	16,3*,**
	MC38/P-DW	11,09**,***
	MC38/DJ-DS	12,034
	MC38/DJ-DW	13,95***
<b>35.dzień</b>	K-DS	16,39
	K-DW	10,26*
	MC38/P-DS	14,57**
	MC38/P-DW	14,29**
	MC38/DJ-DS	15,33**
	MC38/DJ-DW	12,47*,**,***
<b>45.dzień</b>	K-DS	12,39
	K-DW	11,25
	MC38/DJ-DS	12,91
	MC38/DJ-DW	14,59**,***

\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS

\*\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DW

\*\*\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  MC38-DS względem MC38-DW

Myszy z nowotworem MC38/0 charakteryzowały się wyższym stężeniem receptorów GPR109A, zaś utrzymywanie na paszy o wyższej zawartości skrobi opornej było związane z obniżeniem poziomu receptorów GPR109A w tkankach jelita grubego (Rys. 59).



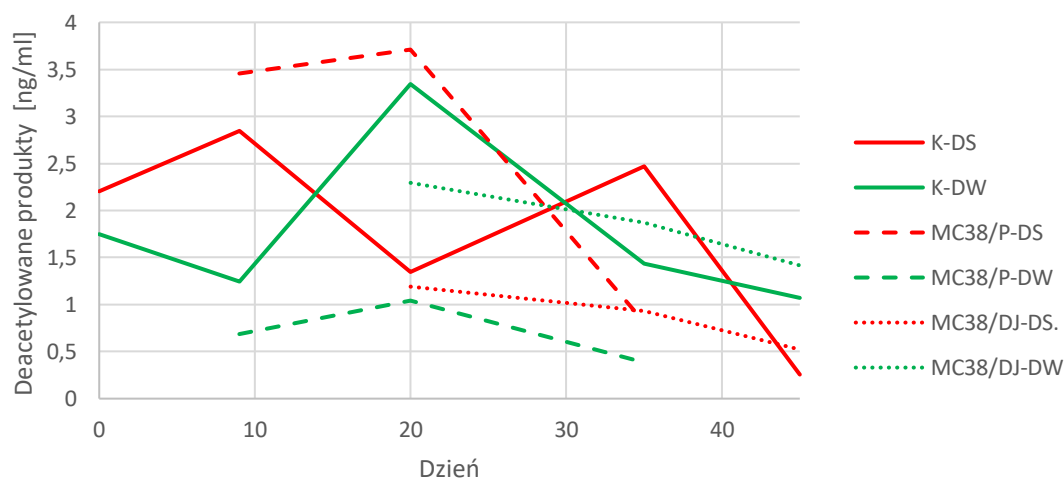
Rysunek 59 Poziom receptorów GPR109A w tkankach jelita grubego dla modeli nowotworu jelita grubego MC38/0. a. grupy z nowotworem MC38/0 wszczepionym podskórnym (P) i dojelitowo (DJ), kontrola (K) – myszy zdrowe; b. porównanie względem otrzymywanej paszy standardowej (DS) i z wyższą zawartością skrobi opornej (DW).

\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS.

### 6.3.5. Poziom deacetylowanych produktów, markerów aktywności deacetylazy histonów, w tkankach jelita na modelu nowotworu jelita grubego MC38/0

Stężenie deacetylowanych produktów, odnosi się do aktywności deacetylazy histonów. W grupach z nowotworem podanym podskórnym (P) wystąpił istotny wzrost stężenia deacetylowanych produktów w grupach otrzymujących paszę standardową, natomiast w modelu dojelitowym - w grupie myszy otrzymujących paszę z wysoką zawartością skrobi opornej.

Wzrost aktywności deacetylazy histonów oznacza słabszą inhibicję przez SCFAs; poziom deacetylowanych produktów malał w miarę postępu doświadczenia, co sugeruje słabnącą aktywność enzymu (Rys. 60, Tab. 46).



Rysunek 60 Stężenie deacetylowanych produktów w modelach nowotworu jelita grubego MC38/0; Kolor zielony – pasza ze zwiększoną (20%) zawartością skrobi opornej; kolor czerwony – pasza standardowa (5%). K-kontrola; P-model nowotworu MC38/0 podany podskórnym; DJ-model nowotworu MC38/0 podany dojelitowo; DS-pasza standardowa; DW-pasza z wysoką zawartością skrobi opornej

Tabela 46 Poziom deacetylowanych produktów w próbkach jelita w modelu nowotworu jelita grubego MC38/0; K-kontrola; P-model nowotworu MC38/0 podany podskórnym; DJ-model nowotworu MC38/0 podany dojelitowo; DS-pasza standardowa; DW-pasza z wysoką zawartością skrobi opornej

	Grupa	Produkty deacetylowane [ng/ml]
<b>0.dzień</b>	K-DS	2,21
	K-DW	1,75
<b>9.dzień</b>	K-DS	2,85
	K-DW	1,24*
	MC38/P-DS	3,45**
	MC38/P-DW	0,69 <sup>*,**,***</sup>
<b>20.dzień</b>	K-DS	1,35
	K-DW	3,34*
	MC38/P-DS	3,71*
	MC38/P-DW	1,04 <sup>*,**,***</sup>
	MC38/DJ-DS	1,19**
	MC38/DJ-DW	2,29
<b>35.dzień</b>	K-DS	2,47
	K-DW	1,44
	MC38/P-DS	0,81**
	MC38/P-DW	0,38 <sup>*,**,***</sup>
	MC38/DJ-DS	0,93
	MC38/DJ-DW	1,87 <sup>***</sup>
<b>45.dzień</b>	K-DS	0,26
	K-DW	1,07*
	MC38/DJ-DS	0,52**
	MC38/DJ-DW	1,42 <sup>*,**,***</sup>

\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS

\*\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DW

\*\*\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  MC38-DS względem MC38-DW

W początkowej fazie eksperymentu (0. dzień), zwierzęta otrzymujące paszę standardową wykazały niższe stężenie jelitowe receptorów GPR43, a wyższe GPR109A oraz deacetylowanych produktów, w porównaniu do stosowania paszy wysokobłonnikowej (Tab. 47).

W 9. dniu u myszy w modelu podskórnym nowotworu jelita grubego stężenie GPR43 było niższe, a GPR109A wyższe w odniesieniu do grup kontrolnych. W przypadku deacetylowanych produktów w grupach z nowotworem otrzymujących paszę standardową stężenie było wyższe, zaś

w grupie z paszą z wysoką zawartością skrobi niższe (w odniesieniu do grup kontrolnych).

W 20. dniu (intensywny wzrost guzów) w obu modelach grup myszy z nowotworem stężenie GPR43 było niższe (wyjątek: MC38/P-DS) w odniesieniu do grup kontrolnych. Poziom receptorów GPR109A oraz deacetylowanych produktów w grupach MC38/P-DS oraz MC38/DJ-DW był wyższy w odniesieniu do kontroli. W grupach MC38/P-DW i MC38/DJ-DS relacja ta jest odwrotna.

W 35. dniu eksperymentu guzy nowotworowe osiągnęły znaczne rozmiary; w grupach z nowotworem stężenie receptorów GPR43 było wyższe, a receptorów GPR109A oraz deacetylowanych produktów niższe w odniesieniu do kontroli, co stanowiło odwrócenie tendencji obserwowanej we wcześniejszych etapach. Z kolei w 45. dniu nastąpił spadek stężenia receptora GPR43 oraz wzrost receptora GPR109A i deacetylowanych produktów w grupie z nowotworem w modelu dojelitowym, w odniesieniu do grupy kontrolnej.

Podsumowując, poziom badanych receptorów i deacetylowanych produktów był zmienny w trakcie trawania eksperymentu, w większości przypadków osobniki z nowotworem charakteryzowało niższe stężenie GPR43, a wyższe GPR109A i deacetylowanych produktów w odniesieniu do grup kontrolnych. 35. dzień eksperymentu, stanowił punkt eksperymentu, w którym tendencja zmieniła się, co można wiązać z znacznie rozwiniętą chorobą nowotworową (Tab. 47).

Tabela 47 Zestawienie receptorów GPR oraz produktów deacetylowanych w próbkach jelita w modelach nowotworu jelita grubego MC38/0; K-kontrola; P-model nowotworu MC38/0 podany podskórnie; DJ-model nowotworu MC38/0 podany dojelitowo; DS-pasza standardowa; DW-pasza z wysoką zawartością skrobi odpornej

		Poziom receptorów GPR oraz produktów deacetylowanych [ng/ml]		
		GPR43	GPR109A	Deacetylowane produkty
<b>0.dzień</b>	K-DS	16	23,49	2,21
	K-DW	0,41*	10,04*	1,75
<b>9.dzień</b>	K-DS	0,77	10,4	2,85
	K-DW	0,69	11,29	1,24*
	MC38/P-DS	0,51 <sup>*,**</sup>	12,94	3,45 <sup>**</sup>
	MC38/P-DW	0,42 <sup>*,**</sup>	11,85 <sup>***</sup>	0,69 <sup>*,**,*</sup>
<b>20.dzień</b>	K-DS	0,61	12,49	1,34
	K-DW	0,78*	12,57	3,34*
	MC38/P-DS	0,32 <sup>*,**</sup>	16,3 <sup>*,**</sup>	3,71*
	MC38/P-DW	0,53 <sup>*,**,*</sup>	11,09 <sup>*,**,*</sup>	1,04 <sup>*,**,*</sup>
	MC38/DJ-DS	0,85	12,04	1,19 <sup>**</sup>
	MC38/DJ-DW	0,56	13,95 <sup>***</sup>	2,29
<b>35.dzień</b>	K-DS	0,55	16,39	2,47
	K-DW	0,51*	10,26*	1,44
	MC38/P-DS	0,87 <sup>*,**</sup>	14,57 <sup>**</sup>	0,81 <sup>**</sup>
	MC38/P-DW	0,96 <sup>*,**,*</sup>	14,29 <sup>**</sup>	0,38 <sup>*,**,*</sup>
	MC38/DJ-DS	0,28 <sup>*,**</sup>	15,33 <sup>**</sup>	0,93
	MC38/DJ-DW	1,39 <sup>*,**,*</sup>	12,47 <sup>*,**,*</sup>	1,87 <sup>***</sup>
<b>45.dzień</b>	K-DS	0,65	12,39	0,26
	K-DW	1,1*	11,25	1,07*
	MC38/DJ-DS	0,3 <sup>*,**</sup>	12,91	0,52 <sup>**</sup>
	MC38/DJ-DW	0,1 <sup>*,**,*</sup>	14,59 <sup>*,**,*</sup>	1,42 <sup>*,**,*</sup>

\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS

\*\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DW

\*\*\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  MC38-DS względem MC38-DW

#### 6.3.6. Poziom cytokin prozapalnych w surowicy myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38/0

Istotnie statystycznie wyniki badania stężenia cytokin prozapalnych w surowicy myszy dotyczyło interleukiny 17 i interleukiny 12/23 w grupach z nowotworem wszczepionym dojelitowo w 20 i 35. dniu eksperymentu, podobnie u osobników karmionych paszą standardową, jak i z wysoką zawartością skrobi odpornej. W przypadku innych oznaczanych cytokin nie odnotowano istotnych zmian między grupami (Tab. 48). Należy zauważyć, że interleukina 12/23 jest szczególnie



istotna podczas ekspansji i funkcjonalnej aktywności komórek Th17, ponieważ jej wydzielanie prowadzi do stymulacji produkcji IL-17. Obie cytokiny mają cechy prozapalne i wydzielane są podczas przewlekłego procesu zapalnego.

Tabela 48 Poziom cytokin w surowicy myszy w modelu nowotworu jelita grubego MC38/0; K-kontrola; P-model nowotworu MC38/0 podany podskórnie; DJ-model nowotworu MC38/0 podany dojelitowo; DS-pasza standardowa; DW-pasza z wysoką zawartością skrobi odpornej

		interleukina [pg/ml surowicy]					
		IL-6	IL-10	IL-17	IL-12/23	TNF- $\alpha$	INF- $\gamma$
0.dzień	K-DS	199	0	0	0	0	0
	K-DW	201	0	0	0	0	0
9.dzień	K-DS	5	38	0	0	0	0
	K-DW	139	858*	0	0	0	0
	MC38/P-DS	9	0	35	0	77	50*
	MC38/P-DW	0	0	0	0	0	62
20.dzień	K-DS	5	0	33,37	0	0	10
	K-DW	0	0,19	0	0	0	0
	MC38/P-DS	0	138	0	0	0	0
	MC38/P-DW	0	958	0	0	0	0
	MC38/DJ-DS	27	0	1232 <sup>*,**</sup>	575 <sup>*,**</sup>	0	6
	MC38/DJ-DW	9	178	1510 <sup>*,**</sup>	499 <sup>*,**</sup>	0	58
35.dzień	K-DS	47	0	137	0	0	42
	K-DW	0	1058	229	0	0	0
	MC38/P-DS	11	0	625	0	0	18
	MC38/P-DW	11	0	651 <sup>*,**</sup>	0	0	0
	MC38/DJ-DS	0	0	0	0	0	0
	MC38/DJ-DW	0	578	0	0	0	0
45.dzień	K-DS	0	318	10	0	0	0
	K-DW	5	538	25	0	0	0
	MC38/DJ-DS	15	938	24	0	0	0
	MC38/DJ-DW	0	458	0	0	0	0

\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS

\*\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DW

\*\*\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  MC38-DS względem MC38-DW

### 6.3.7. Profil 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OH FAs) w próbkach kału w modelach nowotworu jelita grubego MC38/0

W grupach myszy otrzymujących paszę z wysoką zawartością skrobi odpornej obserwowaliśmy wyższe stężenie 3-OH FAs w próbkach kału w porównaniu do osobników otrzymujących paszę standardową, zarówno w grupach myszy z nowotworem, jak i zdrowych. Intensywny wzrost stężenia markerów LPSu wystąpił od 20. do 35. dnia eksperymentu w grupach z nowotworem, co wiąże się z przewlekłym stanem zapalnym spowodowanym translokacją bakterii i LPSu do krwiobiegu (Tab. 49).

Od **20. dnia** eksperymentu wzrost stężenia wszystkich markerów LPSu dotyczył zarówno grupy myszy z nowotworem wszczepionym podskórnym (MC38/P), jak i dojelitowo (MC38/DJ, w mniejszym stopniu). Należy nadmienić, że rozwój nowotworu w modelu podskórnym był szybszy i na tym etapie guzy były większe niż w modelu podskórnym.

W **35. dniu myszy z nowotworem podanym podskórnym** charakteryzowało wyższe stężenie 3-OH FAs w porównaniu do grup kontrolnych, przy czym w grupie otrzymującej paszę standardową nastąpił wzrost stężenia markerów bakterii rzędu *Bacteroidetes* (3-OH iC15, 3-OH- aC15, 3-OH nC16, 3-OH iC17, 3-OH aC17, 3-OH nC17), natomiast w grupach otrzymujących paszę z wysoką zawartością skrobi odpornej nastąpił wzrost w poziomie markerów bakterii rzędu *Enterobacteriales* (3-OH nC14). zwierząt zdrowych karmionych paszą wysokobłonnikową.

W grupach **myszy z nowotworem podanym dojelitowo otrzymujących paszę standardową w 35. dniu** obserwowaliśmy spadek poziomu wszystkich markerów LPSu (z wyjątkiem 3-OH iC15, niewielki wzrost), podczas gdy w grupach otrzymujących paszę ze zwiększoną zawartością skrobi odpornej nastąpił wzrost markerów LPSu (z wyjątek 3-OH nC15).

W **45. dniu** eksperymentu profil 3-OH FAs ustabilizował się; osobniki z nowotworem charakteryzowało wyższe stężenie markerów bakterii Gram-ujemnych i LPSu w stosunku do grup kontrolnych (Tab. 49).

Podsumowując, największy wpływ na stężenie markerów LPSu w kale miała stosowana pasza, ponieważ zwiększone spożycie skrobi odpornej wiązało się ze wzrostem stężenia 3-OH FAs, w grupach myszy kontrolnych i z nowotworem.

Tabela 49 Profil bakteryjny (według markerów) w próbkach kału w modelu nowotworu jelita grubego z suplementacją skrobią

		3-OH FAs [nmol próbki/1g próbki kału]											
		nC13:0	nC14:0	iC15:0	aC15:0	nC15:0	iC16:0	nC16:0	iC17:0	aC17:0	nC17:0	iC18:0	nC18:0
0.dzień	K-DS	744	1857	6817	1390	8864	6396	29980	24108	5319	8145	823	357
	K-DW	505	4628	3278	4679	17873	15683	47656	29456	14733	17168	998	651
9.dzień	K-DS	242	1840	4043	783	11130	3713	26378	17055	2843	6488	984	335
	K-DW	0	6156	2426	4832	24095	14713	68686	43610	19183	20559	1085	747
	MC38/P-DS	355	1802	6878	1007	11127	4033	30494	20030	3626	6607	1497	377
	MC38/P-DW	705	7179	2638	4221	29999	13815	54820	38197	18518	21732	1101	725
20.dzień	K-DS	390	1299	2445	907	5919	3337	16485	14478	2547	4190	0	176
	K-DW	405	4805	1197	3012	19745	9051	30543	23812	13446	13890	0	543
	MC38/P-DS	623	2257	11042	2244	11129	6922	59493	37203	7002	8822	0	0
	MC38/P-DW	450	11079	5279	6235	67890	18901	145674	89709	43247	43768	0	389
	MC38/DJ-DS	469	1914	7974	898	8839	3384	21874	14885	3633	5258	1423	400
	MC38/DJ-DW	1030	8066	5050	4946	25401	13476	53848	37374	19134	19090	819	671
35.dzień	K-DS	810	4141	5397	2018	23779	5668	34216	25761	5128	10289	981	594
	K-DW	1559	13077	6771	5527	60895	19667	102493	75765	30624	33355	0	1408
	MC38/P-DS	0	3082	6246	2158	14376	8218	65564	41787	7979	10309	1662	0
	MC38/P-DW	738	5793	3701	4146	25139	12352	48950	35721	17329	19962	0	592
	MC38/DJ-DS	809	2581	7040	1250	15692	3734	30388	22843	4406	7301	0	470
	MC38/DJ-DW	785	4880	11709	3346	17427	10024	78084	46704	15360	13225	0	874
45.dzień	K-DS	611	2462	6758	1803	13805	6183	39840	32731	5922	9094	0	430
	K-DW	866	9957	4389	6306	36279	19385	79071	64910	27781	23550	0	907
	MC38/DJ-DS	1419	8548	9470	2658	39575	5309	53257	43510	7304	15139	1173	769
	MC38/DJ-DW	1098	6478	8902	2679	23678	8273	59804	34920	8256	13476	2236	1109

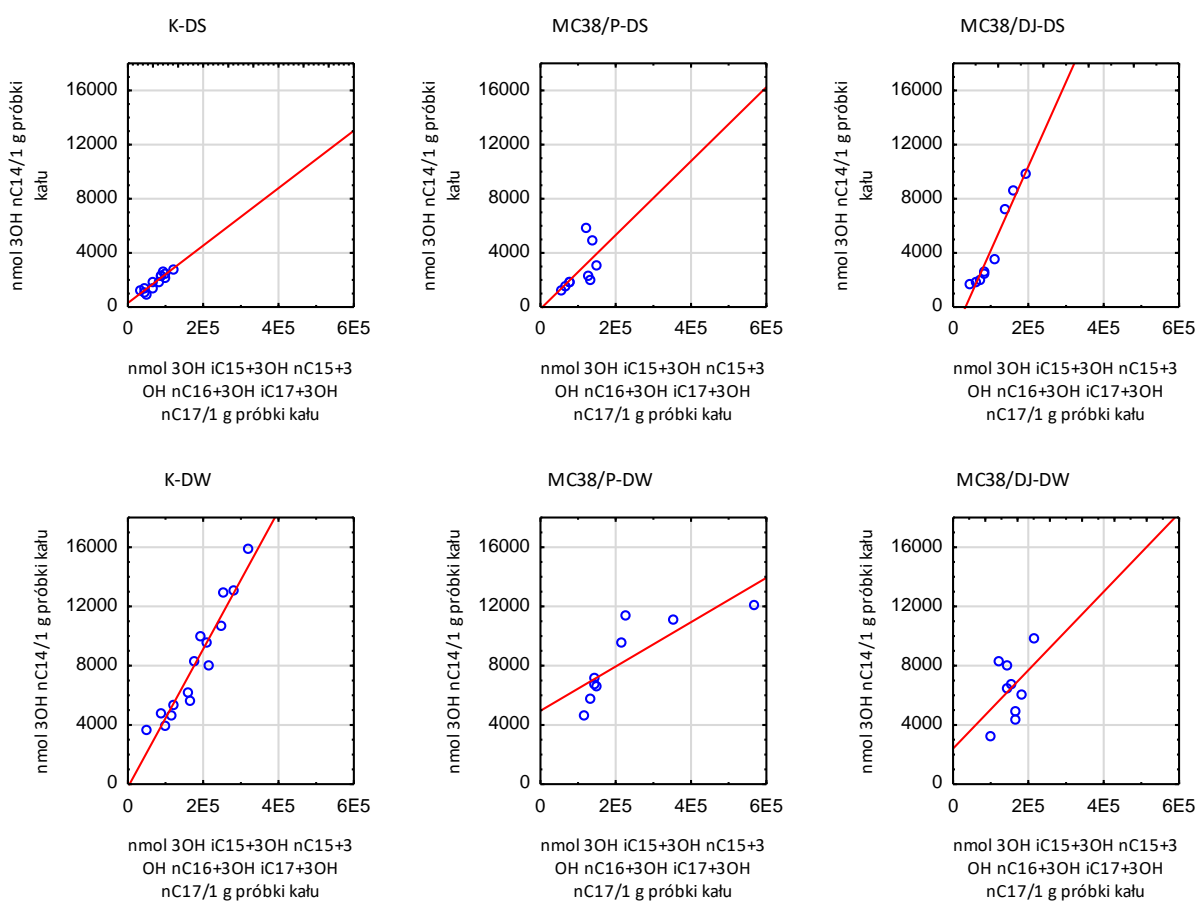
\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS

\*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DW

\*\*\* Test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  MC38-DS względem MC38-DW

Zależności między markerami LPSu rzędów *Enterobacteriales* i *Bacteroidales* były podobne w grupie kontrolnej otrzymującej paszę standardową oraz w grupach z nowotworem w modelu podskórnym (K-DS, MC38/P-DS, MC38/P-DW), ponieważ występowanie obu taksonów było dodatnio skorelowane (Rys. 61).

Z kolei w grupach kontrolnych myszy otrzymujących paszę z wysoką zawartością skrobi odpornej oraz w grupach z nowotworem w modelu dojelitowym (K-DW, MC38/DJ-DS, MC38/DJ-DW) obserwowaliśmy większą dynamikę wzrostu populacji *Enterobacteriales*, podczas gdy poziom *Bacteroidales* zmieniał się nieznacznie. Wskazuje to na intensywniejsze namnażanie patogennych *Enterobacteriales* w stosunku do wstrzymanego wzrostu *Bacteroidales*, typowych dla mikrobiomu jelitowego w jego homeostazie, co można wiązać z rozwojem nowotworu i towarzyszącym mu stanom zapalnym (Rys. 61).



Rysunek 61 Relacja między rzędami *Enterobacteriales* (marker:3-OH nC14) i *Bacteroidales* (markery: 3-OH (iC15+nC15+nC16+iC17+nC17)) w próbkach kału w grupach kontrolnych (K) i z nowotworem (MC38)

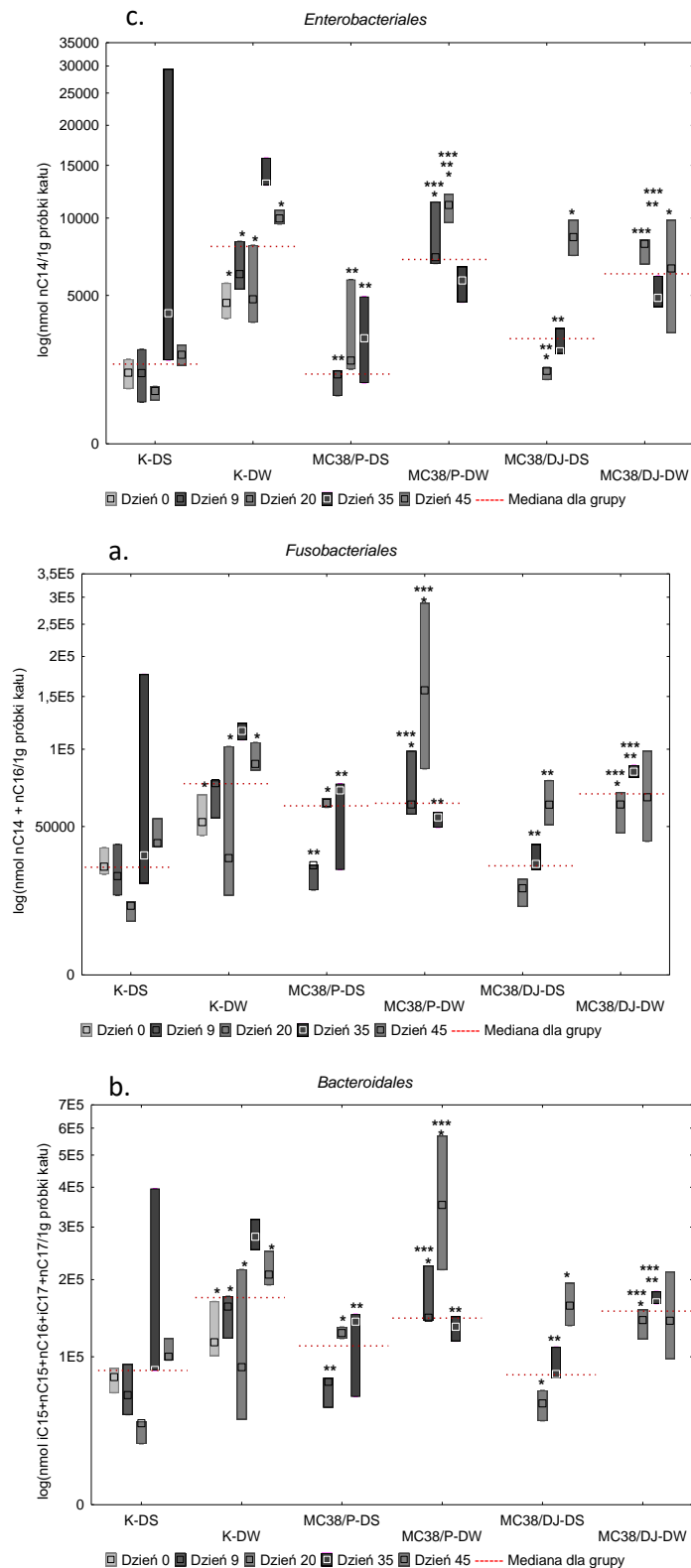
### 6.3.8. Profil 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OH FAs) w próbkach kału w modelach nowotworu jelita grubego MC38/0

Poziom markerów LPSu charakterystycznych dla *Enterobacteriales* zmieniał się w trakcie trwania eksperymentu, zwłaszcza w 20. – 35. dniu eksperymentu. W grupie z nowotworem MC38 w modelu podskórnym poziom markerów LPSu nie odbiegał od poziomu w grupach kontrolnych, natomiast w modelu dojelitowym wyższe stężenie markerów *Enterobacteriales* wykazywały myszy otrzymujące paszę standardową (DS) w odniesieniu do grupy kontrolnej K-DS, natomiast myszy otrzymujące paszę z wysoką zawartością skrobi odpornej (DW) wykazywały niższy poziom markerów *Enterobacteriales* w porównaniu do grupy kontrolnej DW. Wydaje się, że dieta w modelu dojelitowym miała mniejszy wpływ na poziom markerów charakterystycznych dla patogennych *Enterobacteriales* (Rys. 62a).

Stężenie markerów *Fusobacteriales* było wyższe w grupach otrzymujących paszę z wysoką zawartością skrobi odpornej (DW), a toczący się proces nowotworzenia na skład bakteryjny próbek nie miał znaczenia dla mikrobiomu za wyjątkiem nowotworu w modelu podskórnym, gdzie zarówno dla myszy spożywających standardowe ilości błonnika (DS), jak i zwiększone (DW), wystąpił istotnie wyższy poziom *Fusobacteriales* w porównaniu do zwierząt zdrowych otrzymujących paszę standardową (DS) (Rys. 62b).

Stężenie markerów *Bacteroidales* było istotnie wyższe we wszystkich grupach otrzymujących paszę wysokobłonnikową (DW) za wyjątkiem grupy myszy z nowotworem podanym podskórnym, u których poziom markerów *Bacteroidales* jest wyższy w przypadku paszy standardowej (MC38/P-DS) (Rys. 62c).

Podsumowując, występowanie *Enterobacteriales*, *Bacteroidales*, *Fusobacteriales* w jelicie u myszy z nowotworem MC38 podanym podskórnym lub dojelitowo było zależne od obecności skrobi odpornej (błonnika) w paszy.



Rysunek 62 Stężenie 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OH FAs) w próbkach kału w modelu nowotworu jelita grubego MC38/0. Markery reprezentują rzędy: a. Enterobacteriales; b. Fusobacteriales; c. Bacteroidales

\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS

\*\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DW

\*\*\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  MC38-DS względem MC38-DW

W grupach myszy otrzymujących paszę z wysoką zawartością skrobi odpornej wzrasta poziom markerów LPSu rzędów *Enterobacteriales*, *Bacteroidales* i *Fusobacteriales* (Tab. 50).

Tabela 50 Stężenie 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OH FAs) w próbkach kału w modelu nowotworu jelita grubego, z wyróżnieniem odpowiadających im rzędów

		3-OH FAs [nmol/g kału]		
		<i>Enterobacteriales</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Fusobacteriales</i>
0.dzień	K-DS	1857	80493	31837
	K-DW	4628*	115430*	52284*
9.dzień	K-DS	1840	65094	28218
	K-DW	6156*	159737*	75204*
	MC38/P-DS	1802**	76319**	32418**
	MC38/P-DW	7179*,***	144746*,***	61999*,***
20.dzień	K-DS	1299	44101	17924
	K-DW	4805*	89723*	35348*
	MC38/P-DS	2257*	125974*	62864*
	MC38/P-DW	11079*,***	352320*,***	156753*,***
	MC38/DJ-DS	1914**,**	58501*	23788
	MC38/DJ-DW	8066*,***	141842*,***	61914*,***
35.dzień	K-DS	8066	141842	61914
	K-DW	13077	279279	115570
	MC38/P-DS	3082**	139901**	70509**
	MC38/P-DW	5793**	133472**	54742**
	MC38/DJ-DS	2581**	83264**	32969**
	MC38/DJ-DW	4880**,***	165384**,***	82965**,***
45.dzień	K-DS	2462	100107	41937
	K-DW	9957*	208198*	88591*
	MC38/DJ-DS	8548*	160950*	61806**
	MC38/DJ-DW	6478*	140781	66283

\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DS

\*\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  względem K-DW

\*\*\* test U Manna-Whitneya,  $p < 0.05$  MC38-DS względem MC38-DW

6.3.9. Zależności pomiędzy metabolitami bakteryjnymi (SCFAs), markerami LPSu (3-OH FAs), poziomem receptorów GPR43 i GPR109A oraz cytokinami w modelu nowotworu jelita grubego MC38/0

Uzyskane wyniki zestawiliśmy znajdując następujące korelacje:

W grupie myszy kontrolnych otrzymujących paszę standardową (K-DS) wystąpiła ujemna korelacja pomiędzy stężeniem kwasów mlekowego i octowego oraz dodatnia pomiędzy kwasem octowym a propionowym i izomasłowym, pomiędzy kwasem propionowym a izomasłowym i masłowym, pomiędzy kwasem masłowym a izowalerianowym i walerianowym

- stężenie kwasu mlekowego ujemnie korelowało z poziomem *Enterobacteriales* i *Bacteroidetes*

- stężenie kwasu octowego dodatnio korelowało z poziomem *Bacteroidetes* (jeden z głównych producentów octanu) i *Fusobacteriales*

- stężenie kwasu walerianowego ujemnie koreluje ze stężeniem wszystkich badanych rodzin bakteryjnych

- poziom *Bacteroidetes* i *Fusobacteriales* dodatnio korelował ze stężeniem IL-6, cytokiny prozapalnej

- poziom receptorów GPR43 korelował ujemnie ze stężeniem receptorów GPR109A oraz IL-6; należy zauważyć, że receptor GPR43 wiąże głównie octan i propionian, natomiast receptor GPR109A wiąże głównie maślan (Tab. 51).



Tabela 51 Korelacje dla grupy K-DS w modelu nowotworu jelita grubego MC38/0. Korelacja porządku rang Spearmana

	K-DS		
	R	t(N-2)	p
Kwas mlekowy & Kwas octowy	-0,52	-2,20	0,047
Kwas mlekowy & <i>Enterobacteriales</i>	-0,57	-2,50	0,027
Kwas mlekowy & <i>Bacteroidetes</i>	-0,55	-2,37	0,034
Kwas octowy & Kwas propionowy	0,66	3,14	0,008
Kwas octowy & Kwas izomasłowy	0,62	2,85	0,014
Kwas octowy & <i>Bacteroidetes</i>	0,54	2,31	0,038
Kwas octowy & <i>Fusobacteriales</i>	0,53	2,22	0,045
Kwas propionowy & Kwas izomasłowy	0,90	7,59	0,000
Kwas propionowy & Kwas masłowy	0,83	5,34	0,000
Kwas propionowy & Kwas izowalerianowy	0,58	2,53	0,025
Kwas izomasłowy & Kwas masłowy	0,64	2,99	0,011
Kwas masłowy & Kwas izowalerianowy	0,54	2,31	0,038
Kwas masłowy & Kwas walerianowy	0,55	2,37	0,034
Kwas walerianowy & <i>Enterobacteriales</i>	-0,53	-2,27	0,041
Kwas walerianowy & <i>Bacteroidetes</i>	-0,64	-3,00	0,010
Kwas walerianowy & <i>Fusobacteriales</i>	-0,55	-2,35	0,035
<i>Enterobacteriales</i> & <i>Bacteroidetes</i>	0,86	6,00	0,000
<i>Enterobacteriales</i> & <i>Fusobacteriales</i>	0,75	4,09	0,001
<i>Bacteroidetes</i> & <i>Fusobacteriales</i>	0,96	13,13	0,000
<i>Bacteroidetes</i> & IL-6	0,59	2,61	0,022
<i>Fusobacteriales</i> & IL-6	0,68	3,31	0,006
GPR43 & GPR109A	-0,73	-3,80	0,002
GPR43 & IL-6	-0,59	-2,66	0,020

**W grupie kontrolnej myszy otrzymujących paszę z wysoką zawartością skrobi odpornej (DW)** stężenie kwasu mlekowego korelowało dodatnio ze stężeniem receptorów GPR109A oraz ujemnie ze stężeniem cytokiny prozapalnej IL-6

- korelacje dodatnie występowały pomiędzy kwasem octowym a kwasami propionowym, masłowym i izowalerianowym, pomiędzy kwasem propionowym a izowalerianowym i masłowym oraz pomiędzy kwasem masłowym, izowalerianowym

- stężenie kwasu octowego i propionowego dodatnio korelowało ze poziomem

*Enterobacteriales*, *Bacteroidetes* i wszystkimi badanym rodzinami bakteryjnymi

- poziom kwasu walerianowego ujemnie korelował z *Enterobacteriales*
- stężenie deacetylowanych produktów, czyli aktywność deacetylazy histonów, korelowała ujemnie ze stężeniem kwasu octowego i propionowego oraz z poziomem *Enterobacteriales*
- wystąpiła ujemna korelacja pomiędzy stężeniem receptora GPR109A i IL-6 (Tab. 52).

Tabela 52 Korelacje dla grupy K-DW w modelu nowotworu jelita grubego MC38/0. Korelacja porządku rang Spearmana

	K-DW		
	R	t(N-2)	p
Kwas mlekowy & GPR109A	0,85	5,84	0,000
Kwas mlekowy & il-6	-0,59	-2,61	0,022
Kwas octowy & Kwas propionowy	0,91	7,95	0,000
Kwas octowy & Kwas masłowy	0,68	3,36	0,005
Kwas octowy & Kwas izowalerianowy	0,55	2,35	0,035
Kwas octowy & <i>Enterobacteriales</i>	0,84	5,49	0,000
Kwas octowy & <i>Bacteroidetes</i>	0,75	4,04	0,001
Kwas octowy & <i>Fusobacteriales</i>	0,75	4,13	0,001
Kwas octowy & Deacetylowane produkty	-0,54	-2,29	0,040
Kwas propionowy & Kwas masłowy	0,83	5,26	0,000
Kwas propionowy & Kwas izowalerianowy	0,64	2,97	0,011
Kwas propionowy & <i>Enterobacteriales</i>	0,66	3,14	0,008
Kwas propionowy & <i>Bacteroidetes</i>	0,57	2,51	0,026
Kwas propionowy & <i>Fusobacteriales</i>	0,59	2,65	0,020
Kwas propionowy & Deacetylowane produkty	-0,53	-2,25	0,043
Kwas izomasłowy & GPR109A	-0,52	-2,19	0,048
Kwas masłowy & Kwas izowalerianowy	0,80	4,81	0,000
Kwas walerianowy & <i>Enterobacteriales</i>	-0,60	-2,70	0,018
Kwas walerianowy & IL-6	0,80	4,79	0,000
<i>Enterobacteriales</i> & <i>Bacteroidetes</i>	0,96	12,48	0,000
<i>Enterobacteriales</i> & <i>Fusobacteriales</i>	0,96	13,13	0,000
<i>Enterobacteriales</i> & Deacetylowane produkty	-0,52	-2,20	0,046
<i>Bacteroidetes</i> & <i>Fusobacteriales</i>	1,00	42,55	0,000
GPR109A & IL-6	-0,63	-2,94	0,012

W grupie myszy z nowotworem MC38/0 w modelu podskórnym otrzymujących paszę standardową (MC38/P-DS) wystąpiły dodatnie korelacje kwasu mlekowego z kwasami izowalerianowym i walerianowym oraz deacetylowanymi produktami i INF- $\gamma$

- wystąpiły ujemne korelacje pomiędzy stężeniem kwasu propionowego w kale a poziomem *Enterobacteriales*, *Bacteroidetes* i *Fusobacteriales*
- wystąpiły ujemne korelacje kwasu masłowego z *Bacteroidetes* i *Fusobacteriales*
- wystąpiły ujemne korelacje poziomu receptora GPR109A ze stężeniem kwasu masłowego, izowalerianowego oraz ze stężeniem IL-6 i INF- $\gamma$  (Tab. 53).

Tabela 53 Korelacje dla grupy MC38/P-DS w modelu nowotworu jelita grubego MC38/0. Korelacja porządku rang Spearmana

	MC38/P-DS		
	R	t(N-2)	p
Kwas mlekowy & Kwas izowalerianowy	0,78	3,25	0,014
Kwas mlekowy & Kwas walerianowy	0,73	2,82	0,026
Kwas mlekowy & Deacetylowane produkty	0,71	2,68	0,031
Kwas mlekowy & TNF- $\alpha$	0,74	2,94	0,022
Kwas octowy & Kwas izomasłowy	0,82	3,74	0,007
Kwas octowy & Kwas walerianowy	-0,78	-3,33	0,013
Kwas octowy & GPR43	0,78	3,33	0,013
Kwas propionowy & Kwas masłowy	0,73	2,85	0,025
Kwas propionowy & Kwas izowalerianowy	0,78	3,30	0,013
Kwas propionowy & <i>Enterobacteriales</i>	-0,80	-3,53	0,010
Kwas propionowy & <i>Bacteroidetes</i>	-0,70	-2,59	0,036
Kwas propionowy & <i>Fusobacteriales</i>	-0,75	-3,00	0,020
Kwas masłowy & <i>Bacteroidetes</i>	-0,80	-3,53	0,010
Kwas masłowy & <i>Fusobacteriales</i>	-0,70	-2,59	0,036
Kwas masłowy & GPR109A	-0,70	-2,59	0,036
Kwas masłowy & INF- $\gamma$	0,76	3,07	0,018
Kwas izowalerianowy & GPR109A	-0,68	-2,44	0,045
<i>Enterobacteriales</i> & <i>Bacteroidetes</i>	0,80	3,53	0,010
<i>Enterobacteriales</i> & <i>Fusobacteriales</i>	0,90	5,46	0,001
<i>Bacteroidetes</i> & <i>Fusobacteriales</i>	0,93	6,88	0,000
GPR43 & Deacetylowane produkty	-0,73	-2,85	0,025

GPR109A & IL-6	-0,71	-2,66	0,032
GPR109A & INF- $\gamma$	-0,89	-5,27	0,001
IL-6 & INF- $\gamma$	0,86	4,38	0,003

W grupie myszy z nowotworem MC38/0 w modelu podskórnym otrzymujących paszę z wysoką zawartością skrobi odpornej (MC38/P-DW) zaobserwowano liczne korelacje:

- stężenie kwasu mlekowego korelowało dodatnio z poziomem *Fusobacteriales* i *Bacteroides*
- stężenie kwasów octowego, propionowego, masłowego oraz izowalerianowego korelowało ujemnie z poziomem *Enterobacteriales*, *Bacteroides* i *Fusobacteriales*
- stężenia kwasów octowego, propionowego, masłowego korelowały dodatnio między sobą
- stężenie kwasów octowego, propionowego, masłowego i izowalerianowego dodatnio korelowały ze stężeniem receptorów GPR43 i GPR109A oraz ujemnie ze stężeniem deacetylowanych produktów
- *Enterobacteriales*, *Bacteroides* i *Fusobacteriales* dodatnio korelowały ze stężeniem deacetylowanych produktów
- poziom *Enterobacteriales* ujemnie korelował ze stężeniem receptorów GPR43 i GR109A

Warto zauważyć, że liczba korelacji znacznie wzrosła w grupie myszy otrzymujących paszę z wysoką zawartością skrobi odpornej, szczególnie w zakresie SCFA. Wydaje się, że ta obserwacja ma kluczowe znaczenie dla możliwości kontrolowania procesu zapalnego za pomocą diety bogatej w błonnik (Tab. 54).

Tabela 54 Korelacje dla grupy MC38/P-DW w modelu nowotworu jelita grubego MC38/0. Korelacja porządku rang Spearmana

	MC38/P-DW		
	R	t(N-2)	p
Kwas mlekowy & Kwas walerianowy	-0,78	-3,32	0,013
Kwas mlekowy & <i>Bacteroidetes</i>	0,67	2,41	0,047
Kwas mlekowy & <i>Fusobacteriales</i>	0,67	2,41	0,047
Kwas mlekowy & Deacetylowane produkty	0,79	3,36	0,012
Kwas octowy & Kwas masłowy	0,93	6,88	0,000
Kwas octowy & Kwas izowalerianowy	0,78	3,33	0,013
Kwas octowy & <i>Enterobacteriales</i>	-0,85	-4,27	0,004
Kwas octowy & <i>Bacteroidetes</i>	-0,75	-3,00	0,020
Kwas octowy & <i>Fusobacteriales</i>	-0,80	-3,53	0,010
Kwas octowy & GPR43	0,78	3,33	0,013
Kwas octowy & GPR109A	0,72	2,74	0,029

Kwas octowy & Deacetylowane produkty	-0,76	-3,11	0,017
--------------------------------------	-------	-------	-------

Kwas propionowy & Kwas masłowy	0,93	6,88	0,000
Kwas propionowy & Kwas izowalerianowy	0,78	3,33	0,013
Kwas propionowy & <i>Enterobacteriales</i>	-0,85	-4,27	0,004
Kwas propionowy & <i>Bacteroidetes</i>	-0,75	-3,00	0,020
Kwas propionowy & <i>Fusobacteriales</i>	-0,80	-3,53	0,010
Kwas propionowy & GPR43	0,78	3,33	0,013
Kwas propionowy & GPR109A	0,72	2,74	0,029
Kwas propionowy & Deacetylowane produkty	-0,76	-3,11	0,017

Kwas masłowy & Kwas izowalerianowy	0,87	4,60	0,003
Kwas masłowy & <i>Enterobacteriales</i>	-0,92	-6,07	0,001
Kwas masłowy & <i>Bacteroidetes</i>	-0,87	-4,60	0,003
Kwas masłowy & <i>Fusobacteriales</i>	-0,90	-5,46	0,001
Kwas masłowy & GPR109A	0,80	3,57	0,009
Kwas masłowy & Deacetylowane produkty	-0,90	-5,32	0,001

Kwas izowalerianowy & <i>Enterobacteriales</i>	-0,88	-4,99	0,002
Kwas izowalerianowy & <i>Bacteroidetes</i>	-0,77	-3,16	0,016
Kwas izowalerianowy & <i>Fusobacteriales</i>	-0,78	-3,33	0,013
Kwas izowalerianowy & GPR43	0,67	2,37	0,050
Kwas izowalerianowy & GPR109A	0,76	3,11	0,017
Kwas izowalerianowy & Deacetylowane produkty	-0,73	-2,81	0,026

<i>Enterobacteriales</i> & <i>Bacteroidetes</i>	0,93	6,88	0,000
<i>Enterobacteriales</i> & <i>Fusobacteriales</i>	0,97	9,99	0,000
<i>Enterobacteriales</i> & GPR43	-0,67	-2,37	0,050
<i>Enterobacteriales</i> & GPR109A	-0,69	-2,50	0,041
<i>Enterobacteriales</i> & Deacetylowane produkty	0,82	3,79	0,007
<i>Bacteroidetes</i> & <i>Fusobacteriales</i>	0,98	14,31	0,000
<i>Bacteroidetes</i> & Deacetylowane produkty	0,80	3,57	0,009
<i>Fusobacteriales</i> & Deacetylowane produkty	0,83	3,91	0,006

GPR109A & Deacetylowane produkty	-0,86	-4,40	0,003
GPR109A & IL-6	0,67	2,41	0,047

W grupie myszy z nowotworem MC38/0 w modelu dojelitowym otrzymujących paszę standardową (MC38/DJ-DS) wystąpiły wzajemne dodatnie korelacje pomiędzy SCFAs

- stężenie kwasów mlekowego, propionowego, masłowego i walerianowego dodatnio korelowało z poziomem *Enterobacteriales*, *Bacteroides* i *Fusobacteriales*

- stężenie deacetylowanych produktów ujemnie korelowało ze stężeniem kwasów

mlekowego, propionowego, izomasłowego, izowalerianowego i walerianowego oraz z poziomem *Enterobacteriales*, *Bacteroides* i *Fusobacteriales*

- stężenie prozapalnej IL-12/23 korelowało ujemnie z poziomem *Enterobacteriales*, *Bacteroides* i *Fusobacteriales* oraz dodanie ze stężeniem receptorów GPR43 (Tab. 55).

Tabela 55 Korelacje dla grupy MC38/DJ-DS w modelu nowotworu jelita grubego MC38/0. Korelacja porządku rang Spearmana

	MC38/DJ-DS		
	R	t(N-2)	p
Kwas mlekowy & Kwas propionowy	0,67	2,39	0,048
Kwas mlekowy & Kwas izomasłowy	0,81	3,65	0,008
Kwas mlekowy & Kwas masłowy	0,80	3,54	0,010
Kwas mlekowy & Kwas walerianowy	0,77	3,24	0,014
Kwas mlekowy & <i>Enterobacteriales</i>	0,80	3,54	0,010
Kwas mlekowy & <i>Bacteroidetes</i>	0,80	3,54	0,010
Kwas mlekowy & <i>Fusobacteriales</i>	0,80	3,54	0,010
Kwas mlekowy & Deacetylowane produkty	-0,73	-2,84	0,025
Kwas mlekowy & IL-12/23	-0,70	-2,58	0,037
Kwas octowy & Kwas propionowy	0,73	2,85	0,025
Kwas octowy & Kwas walerianowy	0,68	2,48	0,042
Kwas octowy & IL-10	0,75	2,99	0,020
Kwas octowy & IL-17	0,75	2,99	0,020
Kwas propionowy & Kwas izomasłowy	0,75	3,00	0,020
Kwas propionowy & Kwas masłowy	0,83	3,99	0,005
Kwas propionowy & Kwas izowalerianowy	0,73	2,85	0,025
Kwas propionowy & Kwas walerianowy	0,95	8,05	0,000
Kwas propionowy & <i>Enterobacteriales</i>	0,85	4,27	0,004
Kwas propionowy & <i>Bacteroidetes</i>	0,85	4,27	0,004
Kwas propionowy & <i>Fusobacteriales</i>	0,85	4,27	0,004
Kwas propionowy & Deacetylowane produkty	-0,80	-3,53	0,010
Kwas izomasłowy & Kwas masłowy	0,85	4,27	0,004
Kwas izomasłowy & Kwas walerianowy	0,83	3,99	0,005
Kwas izomasłowy & Deacetylowane produkty	-0,73	-2,85	0,025
Kwas masłowy & Kwas walerianowy	0,95	8,05	0,000
Kwas masłowy & <i>Enterobacteriales</i>	0,85	4,27	0,004
Kwas masłowy & <i>Bacteroidetes</i>	0,85	4,27	0,004
Kwas masłowy & <i>Fusobacteriales</i>	0,85	4,27	0,004
Kwas izowalerianowy & Kwas walerianowy	0,72	2,72	0,030

Kwas izowalerianowy & Deacetylowane produkty	-0,67	-2,37	0,050
--	-------	-------	-------

Kwas walerianowy & <i>Enterobacteriales</i>	0,87	4,60	0,003
Kwas walerianowy & <i>Bacteroidetes</i>	0,87	4,60	0,003
Kwas walerianowy & <i>Fusobacteriales</i>	0,87	4,60	0,003
Kwas walerianowy & Deacetylowane produkty	-0,72	-2,72	0,030

<i>Enterobacteriales</i> & Deacetylowane produkty	-0,77	-3,16	0,016
<i>Enterobacteriales</i> & IL-12/23	-0,84	-4,12	0,004
<i>Bacteroidetes</i> & Deacetylowane produkty	-0,77	-3,16	0,016
<i>Bacteroidetes</i> & IL-12/23	-0,84	-4,12	0,004
<i>Fusobacteriales</i> & Deacetylowane produkty	-0,77	-3,16	0,016
<i>Fusobacteriales</i> & IL-12/23	-0,84	-4,12	0,004

GPR43 & GPR109A	-0,77	-3,16	0,016
GPR43 & IL-12/23	0,78	3,32	0,013
Deacetylowane produkty & IL-6	0,69	2,54	0,038

W grupie myszy z nowotworem MC38/0 w modelu dojelitowym otrzymujących paszę z wysoką zawartością skrobi odpornej (MC38/DJ-DW) zaobserwowano dodatnie korelacje pomiędzy stężeniem kwasu octowego, propionowego, masłowego i izowalerianowego, a stężeniem kwasu walerianowego.

- stężenie kwasu octowego i propionowego dodatnio korelowało ze stężeniem kwasu izomasłowego i izowalerianowego

- wystąpiła ujemna korelacja pomiędzy stężeniem kwasu propionowego, masłowego, izowalerianowego, a poziomem *Enterobacteriales*

- stężenie receptorów GPR43 dodatnio korelowało ze stężeniem kwasu masłowego i poziomem *Fusobacteriales*, oraz ujemnie ze stężeniem receptorów GPR109A i IL-6

- wystąpiła ujemna korelacja pomiędzy stężeniem IL-12/23, a IL-10 i IL-17 oraz dodatnia z INF- $\gamma$  (Tab. 56).

Tabela 56 Korelacje dla grupy MC38/DJ-DW w modelu nowotworu jelita grubego MC38/0.  
Korelacja porządku rang Spearmana

	MC38/DJ-DW		
	R	t(N-2)	p
Kwas mlekowy & Kwas masłowy	0,77	3,16	0,016
Kwas octowy & Kwas propionowy	0,93	6,88	0,000
Kwas octowy & Kwas izomasłowy	0,88	4,99	0,002
Kwas octowy & Kwas izowalerianowy	0,90	5,46	0,001
Kwas octowy & Kwas walerianowy	0,92	6,07	0,001
Kwas propionowy & Kwas izomasłowy	0,83	3,99	0,005
Kwas propionowy & Kwas izowalerianowy	0,93	6,88	0,000
Kwas propionowy & Kwas walerianowy	0,85	4,27	0,004
Kwas propionowy & <i>Enterobacteriales</i>	-0,67	-2,37	0,050
Kwas izomasłowy & Kwas izowalerianowy	0,82	3,74	0,007
Kwas izomasłowy & Kwas walerianowy	0,80	3,53	0,010
Kwas masłowy & Kwas walerianowy	0,67	2,37	0,050
Kwas masłowy & <i>Enterobacteriales</i>	-0,67	-2,37	0,050
Kwas masłowy & GPR43	0,68	2,48	0,042
Kwas izowalerianowy & Kwas walerianowy	0,83	3,99	0,005
Kwas izowalerianowy & <i>Enterobacteriales</i>	-0,67	-2,37	0,050
<i>Bacteroidetes</i> & <i>Fusobacteriales</i>	0,98	14,31	0,000
<i>Fusobacteriales</i> & <i>Bacteroidetes</i>	0,98	14,31	0,000
<i>Fusobacteriales</i> & GPR43	0,70	2,59	0,036
<i>Fusobacteriales</i> & GPR109A	-0,72	-2,72	0,030
GPR43 & GPR109A	-0,73	-2,85	0,025
GPR43 & IL-6	-0,77	-3,23	0,015
Deacetylowane produkty & INF- $\gamma$	0,73	2,83	0,026
IL-10 & IL-12/23	-0,67	-2,38	0,049
IL-17 & IL-12/23	-0,67	-2,38	0,049
IL-12/23 & INF- $\gamma$	0,80	3,53	0,010



## 7. Dyskusja

### Nowotwór prostaty

Wstępne badania składu i aktywności metabolicznej mikrobioty jelitowej w warunkach rozwijającego się nowotworu prowadziliśmy na modelu mysiego indukowanego nowotworu prostaty. Homeostaza ekosystemu jelita była monitorowana za pomocą markerów chemicznych metabolitów bakteryjnych - krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) i markerów bakterii Gram-ujemnych i lipopolisacharydu - 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych (3-OHFAs) oraz z zastosowaniem tradycyjnej hodowli mikroorganizmów.

Dla rutynowo dziś stosowanych technik metagenomowych w badaniach mikrobioty jelitowym uzupełnieniem jest tradycyjna hodowla bakterii uzyskanych w wyniku izolacji z kału. Kulturomika, która odgrywa ważną rolę w badaniach patofizjologii licznych chorób i ma potencjalne znaczenie terapeutyczne (Diakite et al. 2020; Dubourg et al. 2018; Lagier et al. 2016), zastosowana w naszych badaniach nie wniosła istotnych informacji, ponieważ ilość uzyskanych szczepów bakteryjnych była niewielka mimo prowadzenia hodowli w różnych warunkach środowiska, a różnice pomiędzy grupami okazały się nieistotne statystycznie. Przyjęcie innych metod pozwoliło na lepsze zobrazowanie dynamicznych zmian zachodzących w obrębie mikrobiomu jelitowego, ponieważ wartościowe dane uzyskano analizując profil markerów lipopolisacharydu i metabolitów bakteryjnych, jak również (w kolejnych modelach nowotworów) wyniki sekwencjonowania NGS.

Analiza metabolitów bakteryjnych - krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) jako wyznacznika aktywności mikrobioty jelitowej na modelu mysiego nowotworu prostaty wykazała gwałtowny wzrost stężenia w kale w pierwszych dniach po operacji podania komórek nowotworowych (Tab. 53). Najprawdopodobniej był to obraz reakcji organizmu – i mikrobioty jelitowej - na stres spowodowany podaniem komórek nowotworowych (bądź roztworu soli). Zwiększona produkcja krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych nie była związana z występowaniem innych objawów, np. biegunki.

Intensywnemu wzrostowi guzów nowotworowych prostaty w 3. do 5. tygodnia eksperymentu towarzyszyły zmiany stężenia SCFA w kale: istotny statystycznie wzrost poziomu kwasu octowego i masłowego u myszy z nieprzerzutującym typem nowotworu prostaty (TRAMP-C1) (w porównaniu do zwierząt kontrolnych) oraz kwasu propionowego (który jednak nie był istotny statystycznie). Podobną reakcję obserwowano u myszy z przerzutującym typem nowotworu prostaty (TRAMP-C2), chociaż nieco później (5. tydzień).

Matsushita i wsp. (2021) podają, że u mężczyzn o wysokim prawdopodobieństwie

zachorowania na nowotwór prostaty (dodatknie biopsje) względna ilość *Rikenellaceae*, *Alistipes* i *Lachnospira* oraz bakterii produkujących SCFA była znacząco wyższa. Jest to zgodne z naszą obserwacją istotnego statystycznie wzrostu stężenia SCFA w kale, w szczególności kwasu octowego i propionowego. Jak wskazują Hayashi i wsp. (2018), profil mikrobioty jelitowej oraz jej metabolity mogłyby stać się markerem wykrywania nowotworu prostaty wysokiego ryzyka, ponieważ w badaniach na modelu zwierzęcym dieta wysokotłuszczowa i otyłość sprzyjały miejscowemu zapaleniu, a następnie rozwojowi nowotworu prostaty (Hayashi et al. 2018; 2019; Fujita et al. 2019; Hatano et al. 2020). SCFA promowały wzrost nowotworu prostaty poprzez szlak sygnałowy IGF-1, ponieważ wytwarzanie IGF-1 stymulowane przez SCFA, metabolitów drobnoustrojów jelitowych, wpływa na wzrost raka prostaty poprzez aktywację lokalnej sygnalizacji MAPK i PI3K. Wskazuje to na istnienie osi mikrobiota jelitowa-IGF-1-prostata (Matsushita et al. 2021).

W naszych badaniach u myszy po 21. dniu od podania komórek nowotworowych o charakterze nieprzerzutującym TRAMP-C1 odnotowano zmiany stężenia 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych, markerów LPS. Poziom LPSu zmienił się szybciej niż poziom SCFA: w 40. dniu nastąpił gwałtowny, istotny statystycznie spadek stężenia 3-OH FAs w kale, obejmujący markery bakterii rzędu *Bacteroidales*, zarówno w przerzutującym, jak i nieprzerzutującym modelu nowotworu prostaty.

Pomiędzy 3. i 5. tygodniem od podania komórek nowotworowych wystąpiły największe istotne statystycznie zmiany dotyczące stężenia markerów rzędów *Bacteroidales* i *Fusobacteriales* w próbkach kału dla grupy myszy z nowotworem prostaty. Wewnętrzne korelacje dotyczyły różnych rzędów bakterii i ich metabolitów: stężenie kwasu octowego dodatnio korelowało ze stężeniem kwasu propionowego, a kwas propionowy ujemnie korelował z bakteriami z rodziny *Enterobacteriales*.

Na przykładzie przerzutującego i nieprzerzutującego nowotworu prostaty myszy wykazaliśmy korelacje SCFA i markerów bakterii rodziny *Enterobacteriales*, *Bacteroidales* i *Fusobacteriales*. W grupie TRAMP-C1 wystąpiła dodatnia korelację między bakteriami z rodziny *Bacteroidales* a *Fusobacteriales* i kwasem octowym.

Związek zaburzeń homeostazy mikrobioty jelitowej potwierdzili Poutahidis i wsp. *in vivo* obserwacją nasilenia śródnabłonkowej neoplazji prostaty i rozwojem mikroinwazyjnego nowotworu prostaty (Poutahidis et al. 2013). Indukcja nowotworu była zniesiona przez neutralizację mediatora zapalenia (TNF- $\alpha$ ), co wskazuje na znaczenie, jakie odgrywa zapalenie indukowane przez drobnoustroje przewodu pokarmowego w powstawaniu i progresji

nowotworu. Znaczny wzrost prozapalnych gatunków *Streptococcus* spp. i *Bacteroides* spp. odnotowano w wymazach u mężczyzn, u których za pomocą biopsji przezodbytniczych zdiagnozowano raka prostaty (Liss et al. 2018).

Zapalenie jest związane z nowotworem, ponieważ powoduje uszkodzenia komórkowe i genomowe oraz uruchamia kaskadę naprawy komórek, angiogenezy i dalszej naprawy tkanek (Nakai and Nonomura 2013).

Podsumowując obserwacje mysiego modelu raka prostaty stwierdziliśmy, że markery lipopolisacharydu, w szczególności charakterystyczne dla rzędów *Bacteroidales* i *Fusobacteriales*, występowały w niższym, statystycznie istotnym, stężeniu u zwierząt chorych w porównaniu z grupą zwierząt zdrowych.

### **Nowotwór jelita grubego MC38/EGFP**

Związek bakterii zasiedlających przewód pokarmowy z występowaniem nowotworu jelita grubego dostrzeżono w latach 70. ubiegłego wieku obserwując szybszy rozwój gruczolaka okrężnicy u szczurów pozbawionych mikrobioty jelitowej w porównaniu do zwierząt konwencjonalnych (Weisburger et al. 1975). Z biegiem lat powstała hipoteza postulująca znaczącą rolę błonnika pokarmowego w ochronie przed nowotworem jelita grubego oraz związek mikrobioty jelitowej ze stanem zapalnym poprzedzającym neoplazję (Song M. et al 2020). Pojawiło się kluczowe pytanie o sposób wsparcia mikrobioty jelitowej przez podaż błonnika i wybór najodpowiedniejszych polisacharydów modulujących jej skład.

Genom ssaków nie koduje większości enzymów niezbędnych do degradacji struktury polisacharydów pochodzących z materii roślinnej, rozwinął się zatem kompleks mutualistycznych zależności pomiędzy gospodarzem - ssakiem, a mikroorganizmami symbiotycznymi, który pozwolił na wykorzystanie niestrawionych polisacharydów jako źródło energii dla bakterii (Flint et al. 2012). Pozwoliło to na uzyskanie około 10% energii niezbędnej gospodarzowi za pośrednictwem aktywności mikrobioty jelitowej.

Jednym z zadań niniejszej pracy była ocena wpływu suplementacji  $\alpha$ -celulozą na skład mikrobioty jelitowej w warunkach toczącego się procesu zapalnego, związanego z obecnością komórek nowotworowych. Ściana komórkowa roślin jest głównym źródłem nierozpuszczalnego błonnika w diecie, z najważniejszym składnikiem - celulozą, polimerem zbudowanym jest z liniowego łańcucha glukozy połączonego wiązaniami  $\beta(1\rightarrow4)$ . Długie, płaskie łańcuchy mogą ze sobą oddziaływać za pomocą wiązań wodorowych, tworząc prawie krystaliczny,

nierozpuszczalny materiał. Celuloza jest nierozpuszczalnym włóknem, odpornym na działanie enzymów trawiennych ssaków (poza przeżuwaczami), ale skraca czas tranzytu jelitowego i redukuje czas fermentacji przez bakterie jelitowe. Wysokokrystaliczna celuloza jest szczególnie oporna na degradację enzymatyczną przez bakterie jelitowe, podczas gdy formy amorficzne są bardziej dostępne (Flint et al. 2012).

Dla drobnoustrojów zasiedlających jelito źródłem energii są te składniki diety, które nie uległy działaniu enzymów gospodarza. Należą do nich przede wszystkim polisacharydy. Najważniejsze z nich to skrobia oporna i polisacharydy nieskrobiowe: celuloza, pektyna, ksylan i inulina. Szczepy celulolityczne, które udało się wyizolować z ludzkiego kału to *Ruminococcus* spp., *Clostridium* spp., *Eubacterium* spp. i *Bacteroides* spp. (Robert and Bernalier-Donadille 2003; Chassard et al. 2010). Uważa się, że struktura i aktywność mikroorganizmów degradujących celulozę jest uzależniona od stanu metagennego gospodarza, zatem wśród szczepów celulolitycznych rodzaju *Ruminococcus* będących głównymi producentami metanu (methane excretors) degradacja celulozy jest największa, natomiast rodzaj *Bacteroides* nie uwalnia go wcale (non-methane excretor), więc degradacja celulozy jest mniejsza. Podejrzewa się, że ta różnica może być powiązana z transferem wodoru pomiędzy bakteriami celulolitycznymi produkującymi wodór (*Ruminococcus* spp.) a metanogennymi archeonami (Chassard et al. 2010).

Wiele badań epidemiologicznych omawia związek pomiędzy zwiększonym spożyciem błonnika a zachorowalnością i przebiegiem nowotworów jelita grubego, np. metaanaliza, w której stwierdzono, że nie ma liniowego związku pomiędzy spożyciem błonnika a ryzykiem zachorowalności na CRC (Clinton et al. 2020). W naszym eksperymencie na modelu nowotworu jelita wszczepionego podskórnie suplementacja  $\alpha$ -celulozą podaną w paszy nie odgrywała większej roli, ponieważ wzrost guzów nowotworowych był podobny bez względu na ilość dostarczanej celulozy. Jak się wydaje, pozajelitowy rozwój guza przyczyniał się do braku obecności reakcji związanych z nim zmian mikrobioty jelitowej.

Nasze badania pozostają w zgodzie z wnioskami Clinton i wsp. (2020), ponieważ obecność  $\alpha$ -celulozy w paszy miała wpływ na wzrost stężenia krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w kale, z wyjątkiem kwasu mlekowego, którego stężenie wzrosło u osobników otrzymujących paszę wysokobłonnikową oraz u zwierząt z intensywnie postępującym procesem nowotworowym po dwóch tygodniach od rozpoczęcia eksperymentu. Stężenie kwasu octowego, propionowego i (w mniejszym stopniu) masłowego w kale było obniżone u zwierząt ze zwiększoną podażą  $\alpha$ -celulozy, natomiast w surowicy stężenie SCFA było istotnie różne u osobników otrzymujących dietę wysokobłonnikową w porównaniu do diety standardowej (wyższy poziom kwasów mlekowego, propionowego i masłowego, a niższy kwasu octowego). Wyniki te potwierdzają, że podaż błonnika

w postaci  $\alpha$ -celulozy w diecie jest czynnikiem modulującym stężenie SCFA w surowicy. Prawidłowości tej nie obserwowaliśmy w próbkach kału, prawdopodobnie z powodu wykorzystywania tych związków przez bakterie jelitowe jako źródła energii. Stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w kale jest stosunkowo stabilnym i wiarygodnym miernikiem kondycji mikrobioty jelitowej, szczególnie u osobników chorych.

Celuloza podlega fermentacji bakteryjnej w jelicie grubym, ale drugorzędowa produkcja SCFA w tym odcinku jelita jest ograniczona. Badając poziom SCFA podczas stosowania wysoko- i niskocelulozowej diety Kim i wsp. stwierdzili, że poziom SCFA był w obu przypadkach porównywalny (Kim Y. et al. 2020), a zwiększone spożycie celulozy nie wpływało znacząco na profil SCFA, w każdym razie nie rosło stężenie kwasu masłowego. Wydaje się jednak, że mimo niewielkiej zdolności mikrobiomu do fermentacji celulozy, pojawiają się zmiany w składzie mikrobiomu jelitowego (Cummins 1983), co uzasadnia potencjalne stosowanie celulozy jako prebiotyku w celu modulacji mikrobioty i poziomu jej metabolitów.

Badanie stężenia markerów LPSu w pozajelitowym modelu wszczepionych guzów nowotworowych MC38 dostarczyło wielu cennych informacji o zmienności mikrobiomu jelitowego. Dieta z wysoką zawartością celulozy sprzyjała obniżeniu ilości LPSu w kale, co wskazuje na zmniejszenie liczności jelitowych bakterii Gram-ujemnych w porównaniu do grupy pozostającej na diecie standardowej; jak wiadomo, dominacja bakterii Gram-dodatnich w jelicie grubym jest efektem zwiększonej podaży błonnika pokarmowego.

Spożycie błonnika w postaci  $\alpha$ -celulozy sprzyjało obniżeniu stężenia markerów bakterii Gram-ujemnych w kale, rzędów *Bacteroidales* oraz *Enterobacteriales*, natomiast w diecie wysokocelulozowej nawet nieznaczny wzrost stężenia *Bacteroidales* w kale nie wiązał się ze wzrostem obecności *Enterobacteriales*. Wykazaliśmy, że wraz ze zwiększoną podażą błonnika w końcowych odcinkach przewodu pokarmowego myszy zdrowych zmniejsza się występowanie bakterii Gram-ujemnych: *Enterobacteriales*, *Bacteroidales* i *Fusobacteriales*. Ten efekt, choć o mniejszej intensywności, widoczny jest u myszy z wszczepionym nowotworem MC38. Podobne zależności obserwujemy w stężeniu markerów LPSu w surowicy zwierząt utrzymywanych na diecie wysokobłonnikowej, przy czym w tym przypadku istotnie statystycznie zmiany dotyczyły kwasów 3-OH  $n$ C14 do 3-OH  $n$ C16 (markerów *Enterobacteriales*).

Na ciekawą zależność świadczącą o translokacji bakteryjnej wskazuje analiza stosunku markerów bakterii rzędów *Enterobacteriales* i *Bacteroidales* w surowicy: w grupie myszy z rozwijającym się nowotworem otrzymujących dietę standardową, zwiększało się stężenia kwasów 3-hydroksylowych w surowicy, co świadczy o translokacji (patogennych) przedstawicieli

*Enterobacteriales*; zastosowanie diety wysokobłonnikowej u myszy chorych niwelowało ten efekt. Wskazuje to na użyteczność markerów w obserwacji poziomu LPSu w surowicy, bo informuje o dysfunkcji bariery ochronnej nabłonka jelitowego, dysbiozie w obszarze jelit i w konsekwencji translokacji bakterii oraz czynników prozapalnych. Taki stan promuje proces nowotworowy w jelicie grubym, ponieważ zwiększona przepuszczalność jelita może prowadzić do systemowego zapalenia i przedostania się komórek i metabolitów bakteryjnych do krwioobiegu. Należy zauważyć, że nawet niewielki wzrost stężenia czynników prozapalnych, w tym LPSu, we krwi wyzwała cytokiny prozapalne i białka ostrej fazy (Kell and Pretorius 2018; de Waal et al. 2018). Poziom LPSu krążącego we krwi jest znacząco podwyższony w populacji chorych z CRC, a markery zapalenia i hiperkoagulacji również były istotnie wyższe w tej grupie, powodując chroniczny stan zapalny i indukując wzrostu guza (de Waal et al. 2020).

Potencjalne związki pomiędzy mikrobiotą jelitową a chorobami metabolicznymi były intensywnie badane z wykorzystaniem markerów (Delzenne i Cani 2011). Poziom lipopolisacharydu w surowicy jest podwyższony u osób cierpiących na otyłość, cukrzycę czy przebywających na diecie wysokotłuszczowej, a utrzymujące się wysokie stężenie LPSu, gdy podawana jest insulina, prowadziło do insulinooporności u zwierząt (Cani et al. 2007). Wzrost stężenia LPS jest spowodowany utratą funkcjonalności bariery jelitowej; podawanie fruktooligosacharydów jako prebiotyków poprawiało funkcjonalność bariery jelitowej i było silnie skorelowane z redukcją stężenia LPSu w surowicy. Podobny efekt wystąpił w naszych badaniach, ponieważ dieta wzbogacona celulozą korelowała z niższym stężeniem markerów LPSu.

W analizie mikrobioty jelitowej za pomocą sekwencjonowania NGS wykazaliśmy, że grupa myszy zdrowych otrzymujących paszę o zwiększonej zawartości  $\alpha$ -celulozy charakteryzowała się większą obecnością *Bacteroidetes* oraz *Verrucomicrobia* oraz obniżoną zawartością *Actinobacteria* i *Firmicutes*. Obserwacja ta powtórzyła się u zwierząt chorych, choć w nieco mniejszym stopniu.

Zwiększone (20%) spożycie celulozy w paszy korelowało z obniżoną ilością bakterii rodzajów *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Adlercreutzia*, *Lactobacillus*, *Allobaculum* i *Ralstonia* oraz bakterii z rodziny *Coriobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Peptostreptococcaceae* i *Mogibacteriaceae*, natomiast dieta bogata w celulozę sprzyjała wzrostowi bakterii rodzajów *Parabacteroides*, *Coprobacillus*, *Anaeroplasma* oraz *Akkermansia*.

W efekcie zastosowania przejściowej suplementacji celulożą w zapaleniu okrężnicy wywołanym siarczanem dekstranu sodu u myszy (Nagy-Szakal et al. 2013) następowała znaczna zmiana składu mikrobioty: obecność niektórych taksonów bakteryjnych istotnie spadała, np. *Coriobacteriaceae* (należące do *Actinobacteria*), a innych rosła, np. *Peptostreptococcaceae* i

*Clostridiaceae*. Podobne obserwacje w naszym eksperymencie były związane z przejściowymi efektami troficznymi 10 dni po zaprzestaniu suplementacji celulozą, jednak ten efekt zmniejszył się po upływie 40 dni po powrocie do diety niskocelulozowej.

Wysokobłonnikowa dieta u myszy miała wpływ na stosunek *Firmicutes: Bacteroidetes*. W grupach suplementowanych 20%  $\alpha$ -celulozą dominowały *Firmicutes* (*Firmicutes: Bacteroidetes* <1), a w grupach z 5% podażą celulozy dominowały *Bacteroidetes* (*Firmicutes: Bacteroidetes* 1,3<x<4,2). Dieta wysokobłonnikowa sprzyjała spadkowi poziomu *Firmicutes* i wzrostowi *Bacteroidetes*. Trend ten potwierdzają badania u ludzi, ponieważ zdrowe osoby w społeczeństwach zachodnich charakteryzują się stosunkiem bakterii (średnio) *Firmicutes: Bacteroidetes* 1:1, zaś skrajne proporcje (np. 20:1) silnie korelują z występowaniem otyłości (Arumugam et al. 2011; Costello et al. 2009).

Spożycie diety wzbogaconej o  $\alpha$ -celulozę wiązało się z trzykrotnym wzrostem obecności w kale bakterii rodzaju *Anaeroplasma*, o których wiadomo, że podnoszą poziom śluzówkowego IgA. Transfer *Anaeroplasma* zwiększa liczbę komórek B w kępkach Peyera oraz liczbę komórek plazmatycznych wydzielających IgA w błasce właściwej jelita cienkiego, co prowadzi do znacznego wzrostu poziomu IgA w błonie śluzowej. *Anaeroplasma* kontroluje ekspresję IgA, przypuszczalnie ma także zdolność do indukcji ekspresji regulatorowej cytokiny TGF- $\beta$  w komórkach T (Beller et al. 2019; 2020).

W naszych badaniach wykazaliśmy, że stosowanie diety wysokobłonnikowej w istotny sposób zwiększa występowanie bakterii *Akkermansia muciniphila*. Myszy z nowotworem charakteryzowały się wyższym poziomem *A. muciniphila* w porównaniu do myszy kontrolnych mimo otrzymywania takiej samej paszy. *Akkermansia muciniphila* może stanowić ogniwo łączące otyłość z CRC, jednak jej rola w karcynogenezie nowotworu jelita grubego nie jest dobrze poznana. Spadek masy ciała pacjentów korelowany był ze wzrostem poziomu *A. muciniphila*, których obecność wiązano z prawidłowymi parametrami metabolicznymi, w tym ze stężeniem glukozy i triglicerydów w surowicy oraz z lepszą odpowiedzią na insulinę (Shah et al. 2018; Louis et al. 2014).

Utrzymanie integralności nabłonka jelitowego (zależne od odpowiedniego składu mucyny) jest kluczowe, ponieważ anomalie w tym zakresie mogą prowadzić do rozwoju zapalenia. Białko MUC2 obecne w przewodzie pokarmowym to glikoproteina tworząca żel (Cockburn i Koropatkin 2016), którego brak u myszy transgenicznym z nokautem genu kodującego MUC2 predysponował do zapalenia okrężnicy (Pettersson et al. 2011; Sluis et al. 2006), zaś u ludzi anomalie O-glikozylacji białka MUC2 są skorelowane z ryzykiem wystąpienia wrzodziejącego zapalenia okrężnicy (Larsson et al. 2011). *Akkermansia muciniphila* jest pożądanym składnikiem prawidłowej mikrobioty

jelitowej, ponieważ degradowuje mucynę, a powstałe metabolity stymulują ekspansję komórek kubkowych wydzielających mucynę w jelitach (Shin et al. 2014). Występowanie *A. muciniphila* było niskie u osób otyłych i z cukrzycą typu 2 (Larsen et al. 2010), zaś u myszy otrzymujących oligofruktozę rosła populacja jelitowa *A. muciniphila*, jednocześnie poprawiała się funkcjonalność bariery jelitowej i następowała redukcja stanu zapalnego (Everard et al. 2013). Uzyskaliśmy podobne wyniki dla myszy otrzymujących dietę wzbogaconą w dodatek  $\alpha$ -celulozy.

Dieta niskocelulozowa nie wpłynęła na różnorodność mikrobiologiczną, ale obserwowano większą obecność *Oscillibacter* i mniejszą *Akkermansia*. Obecność *Akkermansia* w kale osobników utrzymywanych na diecie wysokocelulozowej była znacznie wyższa w porównaniu do osobników na diecie niskocelulozowej i wynosiła odpowiednio 39% i 19% po miesiącu stosowania suplementacji (Kim Y. et al. 2020), co pozostaje w zgodzie z naszymi wynikami: 30% i 15%. Badacze ci obserwowali porównywalny poziom SCFA w obu przypadkach (Kim Y. et al. 2020) oraz wyższe stężenie niacyny u myszy spożywających zwiększone ilość celulozy; niacyna poprzez różnicowanie komórek Treg i wydzielanie IL-18 na drodze zależnej od GPR109A zapobiega zapaleniu okrężnicy (Singh et al. 2014; Kim Y. et al. 2020).

W naszych badaniach ilość bakterii rodzaju *Lactobacillus*, szczególnie *L. reuteri*, była obniżona u osobników otrzymujących dietę wysokobłonnikową. Jak wykazali Arora i współpracownicy, przyjmowanie niektórych prebiotyków, np. suplementacja błonnikiem z siemienia lnianego, wzmagало wzrost *Lactobacillus* w układzie pokarmowym, a podawanie celulozy obniżało zawartość *L. reuteri* w kale. W naszych badaniach spożycie paszy zw zwiększoną ilością  $\alpha$ -celulozy powodowało zahamowanie wzrostu *Lactobacillus spp.* Arora i wsp. wiązali ten efekt z metabolizmem błonnika pokarmowego w jelitach (Arora et al. 2019; 2012).

Stosowanie u myszy diety wzbogaconej w celulozę wiązało się z istotnymi zmianami w mikrobiomie jelitowym, nie miało jednak wpływu na tempo wzrostu podskórnie rozwijającego się nowotworu MC38. Zwiększona obecność celulozy w diecie obniża stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (za wyjątkiem kwasu mlekowego) i markerów LPSu, zatem łagodzi rozwój procesu zapalnego i spowalnia translokację LPSu z jelita do krwioobiegu.

Zwiększone spożycie celulozy związane było ze zmianami w składzie mikrobioty jelitowej, w tym wzrostem poziomu *Bacteroidetes* i *Verrucomicrobia* oraz obniżeniem *Actinobacteria* i *Firmicutes* w kale. Obecność  $\alpha$ -celulozy w paszy promowała wzrost *Akkermansia muciniphila* i hamowała *Lactobacillus reuterii*. Stosunek *Firmicutes*:*Bacteroidetes* w kale był zbliżony do 1 u osobników utrzymywanych na diecie ze zwiększoną ilością celulozy, zaś niższe spożycie błonnika promowało rozwój *Firmicutes*.



## Nowotwór jelita grubego MC38/0

Liczne badania epidemiologiczne badały tezę o wyższym spożyciu błonnika pokarmowego jako ochronie przed zachorowaniem na nowotwór jelita grubego. W metaanalizie 21 eksperymentów (Clinton et al. 2020) autorzy stwierdzili, że nie ma liniowego związku pomiędzy spożyciem błonnika a ryzykiem zachorowalności na CRC, jednak opinie w tym zakresie są bardzo zróżnicowane: większość amerykańskich doniesień wskazuje na brak związku między wspomnianymi czynnikami (Kunzmann et al. 2015; He et al. 2019), natomiast grupa prowadząca „Europejski plan walki z rakiem” potwierdza związek pomiędzy przyjmowaniem błonnika a mniejszym ryzykiem zachorowania na nowotwór jelita grubego (Parracho et al. 2005; Murphy et al. 2012). Prawdopodobnie kluczem do właściwej oceny tego problemu jest pogłębiona analiza źródeł błonnika w diecie Europejczyków (głównie zboża) i Amerykanów (owoce i warzywa).

Znaczenie spożycia błonnika pokarmowego w zapobieganiu CRC polega na skróceniu tranzytu przez jelito oraz zwiększaniu masy kałowej, zmniejszając prawdopodobieństwo interakcji pomiędzy nabłonkiem jelitowym i mikrobiomem a karcynogenami (Gensollen et al. 2016). Skrobia oporna rozkładana przez bakterie do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, zwłaszcza do maślanu, obniża pH w jelicie grubym i powoduje zahamowanie wzrostu wielu mikroorganizmów patogennych, pojawianie się uszkodzeń DNA, zwiększa apoptozę i zapobiega proliferacji komórek nowotworowych (Hm et al. 2008). Stosowana długoterminowo dieta bogata w błonnik pokarmowy preferencyjnie wpływa na wzrost ilości *Firmicutes* o właściwościach immunomodulacyjnych i przeciwzapalnych (Fung et al. 2012; Neish 2009).

W naszym kolejnym eksperymencie zastosowaliśmy suplementację paszy skrobią oporną typu 2, czyli surową skrobię ziemniaczaną, w znacznym stopniu odporną na trawienie przez amylazy ssaków. Zwierzęta z grupy kontrolnej otrzymywały paszę standardową, natomiast pasza wysokobłonnikowa zawierała 20-procentowy dodatek skrobi ziemniaczanej. Negatywną kontrolą w naszych badaniach była skrobia kukurydziana, całkowicie trawiona przez  $\alpha$ -amylazę w jelicie cienkim, zatem nie wpływająca na mikrobiom jelita grubego. Trzy grupy myszy: kontrolna, z komórkami nowotworowymi MC38/0 podanymi podskórnie w zawieszynie oraz z guzami MC38/0 wszczepionymi w jelito ślepe (gdyż u myszy jest to pierwszy odcinek jelita grubego, w którym następuje fermentacja niestrawionych składników pożywienia; u ludzi jelito ślepe jest znacznie mniejsze, a fermentacja ta przebiega w dalszych częściach jelita grubego) (Nguyen et al. 2015). Ze względu na różnice w tempie rozwoju nowotworu w zależności od umiejscowienia w jelicie grubym umownie podzielono je na prawą (jelito ślepe, okrężnica wstępująca oraz poprzeczna) i lewą stronę (zagięcie śledzionowe okrężnicy, okrężnica zstępująca, okrężnica esowata, odbytnica). Metaanaliza 66

badania, obejmująca ponad 1,4 miliona pacjentów wykazała, że prawa strona jelita grubego jest związana z wyższym ryzykiem śmierci, niezależnie od roku badania, liczby uczestników badania, stadium nowotworu czy stosowanej chemioterapii (Petrelli et al. 2017). Korzystając z tej wskazówki w naszych badaniach wykorzystaliśmy wszczepienie guzów nowotworowych MC38/0 w prawą stronę jelita grubego, czyli generującą słabsze rokowania co do przeżycia.

Analiza profilu SCFA wykazała, że myszy na diecie wzbogaconej skrobią ziemniaczaną charakteryzowały się niższym stężeniem kwasu mlekowego w kale w porównaniu do myszy otrzymujących paszę standardową. Największe różnice wystąpiły w grupach z nowotworem, zarówno w modelu podskórnym, jak dojelitowym. Profil krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych był zmienny w trakcie trwania całego eksperymentu. Skrobia ziemniaczana wprowadzała istotne zmiany, ponieważ poziom większości badanych SCFA w kale wzrastał (oprócz kwasu mlekowego i w mniejszym stopniu kwasu octowego) w grupach z nowotworem. Wyjątkiem była grupa z modelem nowotworu podanego dojelitowo, u której wykazano obniżony poziom kwasu masłowego, oraz grupy z modelem podskórnym, utrzymywane na diecie standardowej oraz diecie wzbogaconej skrobią ziemniaczaną, w których obserwowaliśmy zmienne wyniki, szczególnie pomiędzy 20. a 35. dniem eksperymentu, gdy przyrost guzów nowotworowych był największy. Zwiększone spożycie skrobi ziemniaczanej miało wpływ na wzrost stężenia krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych u myszy zdrowych i chorych, co potwierdza ich znaczenie w utrzymaniu homeostazy nabłonka jelita grubego.

SCFA odpowiadają za utrzymanie równowagi odpowiedzi przeciw- i prozapalnej, stanowiąc swoiste komunikatory między komensalnym konsorcjum jelitowym a układem odpornościowym gospodarza. Metabolity te mogą bezpośrednio promować różnicowanie komórek T wytwarzających IL-17, IFN- $\gamma$  i IL-10 w zależności od środowiska cytokinowego. Wpływ krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych na komórki T jest pośrednio zależny od ekspresji receptorów GPR41 i GPR43, ale bezpośrednio zależy od inhibicji aktywności deacetylazy histonowej (HDAC), co stymuluje różnicowanie komórek T do komórek efektorowych i regulatorowych, promując w zależności od środowiska immunologicznego odpowiedź prozapalną lub przeciwzapalną (Park et al. 2015).

Maślan indukuje produkcję IL-18 w obrębie jelitowych komórek nabłonka poprzez aktywację receptora GPR109A. IL-18 stymuluje naprawę nabłonka poprzez regulację produkcji i dostępności IL-22 (Salcedo et al. 2010). U myszy nieobecność IL-18 wiąże się z dysbiozą, ze zmianami w odpowiedzi zapalnej oraz z deregulacją homeostazy i odbudowy nabłonka jelitowego (Vaishnava et al. 2009; Dupaul-Chicoine et al. 2010), co w konsekwencji zwiększa podatność na rozwój nowotworu. W niektórych eksperymentach niezdolność odpowiedzi na IL-18 zwiększała u

myszki przypadki dysbiozy i prawdopodobieństwo wystąpienia (chemicznie indukowanego) nowotworu (Salcedo i in. 2010; Elinav i in. 2011).

Na podstawie badań wykazaliśmy na modelu nowotworu MC38/0 liczne istotne statystycznie różnice dotyczące stężenia krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Stężenie kwasu mlekowego było wyższe u myszy z nowotworem jelita grubego wszczepionym dojelitowo. Uważa się, że mleczan jest jednym z onkometabolitów, czyli produktem przejściowym podlegającym akumulacji w środowisku guza, zazwyczaj nadprodukowanym przed (L-2-hydroksyglutaran, bursztynian, fumaran) lub po (D-2-hydroksyglutaran, mleczan) wystąpieniu defektów metabolicznych (Collins et al. 2017). Wykazano także, że kwas mlekowy może stanowić źródło energii dla komórek nowotworowych (de la Cruz-López et al. 2019).

Stężenie kwasu masłowego i walerianowego było znacząco niższe u zwierząt z nowotworem MC38/0 wszczepionym dojelitowo. Gomes i wsp. (2020) wykazali, że wzrost stężenia SCFA w przebiegu nowotworu jelita grubego zwykle wiąże się z lepszym rokowaniem, co potwierdzili Wu i współ. (2018) doniesieniem o hamowaniu rozwoju guzów nowotworowych przez mikroorganizmy produkujące maślan (Wu et al. 2018; Gomes et al. 2020). Mechanizm tego działania polega na hamowaniu przez maślan genów prozapalnych oraz czynników wzrostu przez inhibicję deacetylazy histonów, co osłabia onkogenne ścieżki sygnałowe (Wu et al. 2018). Zależnie od stężenia *in situ* maślan może także brać udział we wzroście nowotworu hamując proliferację zdrowych progenitorowych komórek jelitowych (Kaiko et al. 2016).

Porównanie wyników uzyskanych dla myszy zdrowych z grupami z nowotworem wykazało wyższe, istotnie statystycznie stężenie kwasu mlekowego, a niższe kwasu walerianowego w kale. Zwiększenie spożycia skrobi odpornej wiązało się ze wzrostem poziomu kwasu izomasłowego i izowalerianowego.

Na podstawie powyższych wyników i doniesień można uznać, że suplementacja SCFA jest przydatnym narzędziem w walce z nowotworem jelita grubego. Mechanizm korzystnego działania SCFA w przypadku chorych z nowotworami jelita grubego, ale także u osób zdrowych, wydaje się dwutorowy, gdyż w badaniach z wykorzystaniem metod proteomicznych i transkryptomicznych wykazano właściwości proapoptotyczne maślanu. W aspekcie spadku proliferacji komórek w przypadku nowotworu jelita grubego oraz promocji zróżnicowanego fenotypu w transformowanych komórkach nabłonka jelita grubego jest to obiecująca obserwacja (Fung K. Y. C. et al. 2011; Tan H. T. et al. 2008; Xiao et al. 2014). Z drugiej strony, w środowisku bardzo bogatym w maślan pojawia się rodzaj odporności na jego działanie, a subpopulacja komórek nowotworowych omija proces apoptozy indukowanej maślanem na rzecz formowania guza (Fung

K. Y. C. et al. 2011; Olmo et al. 2007).

W randomizowanych badaniach prowadzonych w celu porównania produkcji maślanu ze skrobi opornej u osób zdrowych uzyskano interesującą zależność: u większości uczestników zanotowano wzrost stężenia maślanu w kale, ale w przypadkach bardzo wysokiego spożycia skrobi opornej następował jego spadek, pytanie o rolę maślanu w promowaniu nowotworu jelita grubego pozostaje zatem otwarte. Przykładem niejednoznacznej roli maślanu jest zaobserwowana proliferacja komórek, wzrost rozszczępienia krypt jelitowych oraz wzrost całkowitego obciążenia nowotworem w modelu raka jelita myszy u osobników karmionych paszą bogatą w skrobię oporną (otręby pszenne, wytlaki z jabłek) (Mandir et al. 2008). Wydaje się, że kluczowe jest odpowiednie dobranie źródła błonnika do składu oznaczonego, wyjściowego mikrobiomu jelitowego gospodarza.

Badając mechanizmy działania maślanu na komórki nowotworowe oraz sposób, w jaki następuje indukcja apoptozy przy jego udziale, wykazano zmienioną ekspresję HDAC w przypadku nowotworów jelita grubego, żołądka, prostaty oraz gruczołu sutkowego (Zhu et al. 2004; Song J. et al. 2005; Fraga et al. 2005), co wskazuje na pierwszorzędowy mechanizm odpowiedzialny za obniżenie proliferacji komórek nowotworowych - regulację ekspresji genów poprzez inhibicję aktywności HDAC spowodowaną obecnością maślanu. Za pomocą transportera SCL5A8 sprzężonego z Na<sup>+</sup> maślan jest transportowany do komórek, gdzie następuje inhibicja HDAC, a następnie supresja nowotworu (Paroder i in. 2006; Ganapathy i in. 2008).

W naszych badaniach na modelu podskórnym nowotworu MC38 zanotowaliśmy wyższy, statystycznie istotny poziom deacetylowanych produktów u myszy karmionych paszą standardową, natomiast w przypadku modelu dojelitowego poziom ten był wyższy u myszy otrzymujących paszę wysokobłonnikową, co sugeruje wyższą aktywność deacetylazy histonów, a co za tym idzie słabszą inhibicję przez SCFA. Wydaje się, że zastosowanie diety bogatej w błonnik nie zawsze wiąże się z silniejszą inhibicją HDAC. Inną przyczyną jest istotnie niższe niż w grupie kontrolnej stężenie kwasu masłowego w kale myszy z grupy MC38/DJ. W konsekwencji poziom zablokowania enzymu HDAC przez maślan był znacznie mniejszy, zaś dieta w tym przypadku nie miała znaczenia.

Należy zauważyć, że istnieje mechanizm oddziaływania SCFA niezależny od inhibicji HDAC, polegający na jego regulacji przez receptory GPR, w tym GPR43 i GPR109A. Spadek ekspresji GPR43 występuje w nowotworach okrężnicy oraz w przeroście jelita grubego, jak również w początkowych fazach chorób jelita grubego (polipy), jednak na dziewięć badanych linii komórkowych nowotworów jelita grubego tylko dla jednej zaobserwowano ekspresję receptora

GPR43 (linia HT29) (Tang et al. 2011). Taka dysregulacja dotyczy także ekspresji receptora GPR109a w komórkach nowotworowych jelita grubego (Thangaraju et al. 2009).

Znaczenie receptorów GPR potwierdziły obserwacje pozbawionych receptorów GPR43 myszy, które wykazywały wadliwą odpowiedź układu odpornościowego i rozwijały niekontrolowane, chroniczne zapalenie prowadzące do uszkodzeń nabłonka jelitowego. Karcynogeneza w obrębie jelita była silniejsza u myszy z deficytem receptorów GPR43, a jego ekspresja była obniżona w komórkach nowotworowych. Prawidłowe funkcjonowanie GPR43 zapewniało supresję nowotworu. Podaż błonnika pokarmowego i SCFA hamowała jelitowy proces zapalny oraz karcynogenezę pośrednio i bezpośrednio (Kim M. et al. 2018; Sivaprakasam et al. 2016).

W naszych badaniach myszy otrzymujące paszę z wysoką zawartością błonnika wykazywały wyższą ekspresję receptorów GPR43 w porównaniu do grup otrzymujących paszę standardową, szczególnie w grupach myszy chorych, u których jelitowy poziom receptorów GPR43 jest istotnie wyższy. Tendencja ta była widoczna w okresie największego przyrostu guza, gdy zachodzą zmiany immunologiczne, zarówno na modelu podskórnym, jak i dojelitowym.

Drugi receptor wiążący maślan to GPR109A. Greten i wsp. (2004) stwierdzili, że u ludzi i u myszy z nowotworem jelita grubego, a także *in vitro* w linii komórkowej nowotworu jelita grubego ekspresja genu *GPR109A* była wyciszona. Aktywacja NF- $\kappa$ B należy do niezbędnych czynników odpowiedzi zapalnej związanej z karcynogenezą i w warunkach chronicznego zapalenia, w tym w przebiegu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (Greten et al. 2004), a maślan poprzez GPR109A hamuje aktywację NF- $\kappa$ B w komórkach zdrowych i w komórkach nowotworowych jelita grubego. Aktywacja tego receptora w komórkach zdrowych nie prowadzi do ich apoptozy, kiedy jednak ma miejsce taka sama aktywacja za pomocą maślanu, receptor jest ektopowo ekspresjonowany w komórkach nowotworowych jelita grubego, co prowadzi do ich apoptozy.

Za ten mechanizm odpowiada prawdopodobnie zatrzymanie metylacji DNA, które w komórkach nowotworowych jelita grubego indukuje ekspresję receptorów GPR109A i apoptozę tych komórek. Zastosowanie GPR109A skojarzone z maślanem jako ligandem może okazać się skutecznym narzędziem w leczeniu nowotworu jelita grubego przez hamowanie metylacji DNA. Oprócz udziału w supresji nowotworu, receptor ten uczestniczy w hamowaniu aktywacji NF- $\kappa$ B w odpowiedzi indukowanej przez LPS (Thangaraju et al. 2009). W komórkach nabłonka jelitowego maślan może modulować zapalenie poprzez redukcję ekspresji IL-8 (Huang et al. 1997) i hamowanie ekspresji indukowanej syntazy NO (Stempelj et al. 2007).

W naszych badaniach stężenie receptorów GPR109A w jelicie było zmienne. Inaczej niż w

przypadku receptorów GPR43, w okresie największego przyrostu guzów zwierzęta z nowotworem otrzymujące paszę standardową charakteryzowały się wyższym stężeniem receptorów GPR109A niż grupy karmione paszą wysokobłonnikową. W miarę pogarszania się stanu zdrowia myszy następowało wyrównanie poziomu receptorów w obu grupach myszy.

Analizując cały eksperyment wykazaliśmy, że myszy z nowotworem jelita grubego charakteryzowały się wyższym stężeniem jelitowym receptorów GPR109A, szczególnie grupa z nowotworem wszczepionym dojelitowo. Przyjmowanie diety o zwiększonej zawartości skrobi ziemniaczanej było związane z niższym poziomem receptorów GPR109A, co sugeruje, że stan zapalny obejmujący jelito grube wyraża się istotnym statystycznie wzrostem stężenia GPR109A, który obniża się podczas zastosowania diety wysokobłonnikowej.

Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe jako metabolity bakteryjne mają wpływ na utrzymanie homeostazy w obrębie jelita grubego, gdy działają jako czynniki przeciwzapalne, a w szczególnych przypadkach prozapalne. Z tego powodu stanowią swego rodzaju marker, który w powiązaniu z danymi metagenomowymi może dostarczać informacji o stanie zdrowia gospodarza. Markerem uzupełniającym charakterystykę homeostazy jelitowej, a w szczególności dysbiozę spowodowaną stanem zapalnym w środowisku układu pokarmowego, jest lipopolisacharyd. Za pomocą unikalnych kwasów 3-hydroksylowych - jego składników, można opisać zmieniający się ekosystem bakterii Gram-ujemnych w przebiegu procesu zapalnego. W naszych badaniach wykorzystywaliśmy oznaczanie markerów LPSu (kwasów 3-hydroksylowych, 3-OHFAs).

Całkowity LPS pochodzący z mikrobiomu jelitowego w olbrzymiej większości nie jest immunogeny i zasadniczo hamuje produkcję cytokin w szklaku zależnym od TLR4. Najbardziej immunogeny jest lipid A w formie heksaacylowanej, promujący najsilniejszą reakcję poprzez związanie z TLR4 (Munford and Varley 2006). Antagonistyczne formy LPSu pochodzące z mikrobioty jelitowej wyciszają odpowiedź prozapalną wobec całego konsorcjum jelitowego (d’Hennezel et al. 2017). Jelitowy LPS pochodzi głównie z bakterii rzędu *Bacteroidales* i stanowi aż 79% (zdrowi wolontariusze) do 92,4% (próbki w projekcie HMP1) całego LPSu. Dla porównania, *Proteobacteria* (dokładnie *E. coli*) odpowiadają za 5,2% (próbki w projekcie HMP1) do 14% (zdrowi wolontariusze) całkowitego jelitowego LPSu. Średni stosunek LPSu pochodzącego od *Bacteroidetes* w stosunku do *E. coli* wynosi 6:1 (zdrowi wolontariusze) i 18:1 (próbki w projekcie HMP1) (d’Hennezel et al. 2017).

Zwiększona obecność LPS w surowicy może być spowodowane utratą funkcjonalności bariery jelitowej. Cani i współ. wykazali, że podawanie prebiotyków (fruktooligosacharydów) poprawiało funkcjonalność bariery jelitowej, co korelowało z redukcją poziomu LPS w surowicy w

związku z aktywacją jelitowego peptydu glukagonopodobnego typu 2 (Cani et al. 2007).

W naszych badaniach profil 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych umożliwił obserwację zmiany mikrobioty w zakresie typu LPS indukującego bądź wyciszającego odpowiedź prozapalną. Największe zmiany pojawiały się w okresie najszybszego przyrostu guzów nowotworowych (dzień 20.-35.), znaczny wpływ na stężenie markerów LPSu w kale miała także dieta, ponieważ zwiększone spożycie skrobi wiązało się ze wzrostem całkowitego poziomu 3-OHFAs, zarówno u myszy chorych, szczególnie dla modelu podskórnego, jak i zdrowych.

W modelu nowotworu wszczepionego dojelitowo u myszy otrzymujących dietę wysokobłonnikową zwiększa się stężenie markerów 3-OH nC14 charakterystycznych dla bakterii patogennych (rząd *Enterobacteriales*) i znacznie wzrasta w ilości markerów 3-OH nC17 i 3-OH nC16 charakterystycznych dla bakterii komensalnych (rząd *Bacteroidales*). Zmiany zależą od rodzaju stosowanej diety: im wyższe było spożycie skrobi, tym większe było stężenie markerów LPSu charakterystycznych dla rzędów *Enterobacteriales*, *Bacteroidales*, *Fusobacteriales*. Istotne różnice dotyczą bakterii *Enterobacteriales* i *Fusobacteriales*. Zastanawiający jest wzrost stężenia LPSu (i bakterii Gram-ujemnych) u zwierząt pozostających na diecie z wysoką zawartością skrobi. Obserwacja ta jest tym bardziej zaskakująca, że w odniesieniu do badań Klingbeil i współ. nad dietą wysokotłuszczową, w której zastosowano suplementację skrobią oporną (uzyskaną z ziemniaków) autorzy obserwowali poprawę funkcji bariery nabłonkowej przewodu pokarmowego oraz niższy poziom markerów stanu zapalnego, a poziom LPSu w surowicy był niższy u zwierząt spożywających zwiększone ilości błonnika w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Suplementacja skrobią oporną zapobiegała dysbiozie i ogólnoustrojowemu zapaleniu (Klingbeil et al. 2019).

Stężenie LPSu w kale jest elementem wiążącym mikrobiom jelitowy z progresją innych chorób, w tym chorób układu krążenia. W analizie danych 92 pacjentów (Yoshida et al. 2020) stwierdzono, że występowanie bakterii rodzaju *Bacteroides* było znacząco negatywnie skorelowane z poziomem LPSu w kale (mierzonego za pomocą testu LAL). W grupie kontrolnej odnotowano zwiększoną obecność *Bacteroides*. Poziom LPS charakterystycznego dla *Bacteroides* był znacząco niższy od LPSu charakterystycznego dla *Escherichia coli*. Warto przypomnieć, że w przeciwieństwie do *Enterobacteriales*, LPS pochodzący od *Bacteroidetes* indukuje słabą odpowiedź układu immunologicznego i nie stymuluje znacznej produkcji cytokin prozapalnych u myszy.

Jest wiele mikroorganizmów związanych z promowaniem występowania nowotworu jelita grubego, wliczając w to niektóre gatunki *Bacteroides* (*B. vulgatus* i *B. sterocoris*), *Bifidobacterium* spp. (*B. longum* i *B. angulatum*), *Eubacterium* spp. (*E. rectale* 1 i 2, *E. eligines* 1 i 2 i *E. cylindroides*),

*Ruminococcus* spp. (*R. torques*, *R. albus* i *R. gnavus*), *Streptococcus hansenii*, *Fusobacterium prausnitzii* i *Peptostreptococcus products 1* (Genua et al. 2021).

Obrwano zwięszoną ilość *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis* i *Escherichia coli* oraz *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus* oraz *Parvimonas micra*, charakterystycznych dla chorób przyzębia w środowisku guza jelita grubego, co sugeruje związek pomiędzy chorobami przyzębia a ryzykiem powstania nowotworu jelita grubego (Vogtmann et al. 2016; Momen-Heravi et al. 2017; Shah et al. 2018)

Analizując dane metagenomowe uzyskane za pomocą sekwencjonowania NGS wykazaliśmy, że na skład mikrobiomu głównie wpływa model nowotworu, ponieważ w naszym eksperymencie na modelu guzów podanych dojelitowo odnotowaliśmy wzrost ilości bakterii rzędu *Corynebacteriales* oraz rodzajów *Streptococcus*, *Romboutsia*, *GCA-900066225* (rodzina *Ruminococcaceae*) i *Pseudomonas*. Występowaniu nowotworu towarzyszył spadek ilości bakterii rodzaju *Ruminococcaceae UCG-014*.

Środowisko mikrobiologiczne jelita jest dynamiczne, zmienia się pod wpływem diety, chorób i innych czynników środowiskowych, w tym stresu. Toczący się stan zapalny w obrębie układu pokarmowego negatywnie wpływa na homeostazę mikrobiomu. Mangifest i współ. wykazali, że mikrobiologiczne środowisko polipów jelitowych koreluje z występowaniem *Faecalibacterium*, *Bacteroides* i *Rombustia*, także w polipach gruczolakowatych, z tego względu taksony te uznane zostały za biomarkery drobnoustrojowe związane z wczesnym powstawaniem guza (Mangifesta et al. 2018). W naszych badaniach występowanie rodzaju *Romboutsia* było istotnie statystycznie wyższe w przypadku zwierząt z dojelitowo wszczepionymi guzami nowotworowymi, nie był on więc markerem związanym z wczesnym stadium powstawania polipów/nowotworu, ale pojawiał się w pełnym stadium choroby.

Największą zmienność mikrobiomu jelitowego generowała zmiana diety, tj. zwiększone spożycie skrobi. Istotny wzrost poziomu bakterii związany z zastosowaniem diety wysokobłonnikowej odnotowano dla *Bifidobacterium*, *Coriobacteriaceae UCG-002*, *Parvibacter*, *UBA1819* (rodzina *Ruminococcaceae*), *Faecalibaculum* oraz rodziny *Clostridiales vadin BB60 group* i rzędu *Rhodospirillales*. Odnotowano spadek liczebności rodzajów *Blautia*, *Peptococcus*, *Ruminococcus UCG-010* i *Anaeroplasma* oraz rodziny *Erysipelotrichaceae*.

W naszych badaniach wzrost ilości *Bifidobacterium* przy zastosowaniu diety wzbogaconej o skrobię był wynikiem oczekiwanym, ponieważ bakterie te mają zdolność rozkładu skrobi o wysokiej zawartości amylozy (Leitch et al. 2007), co wyjaśnia zwiększone występowanie przedstawicieli *Bifidobacterium* w próbkach kału zwierząt otrzymujących paszę bogatą w skrobię.



Rozwojowi bifidobakterii w grupie zwierząt z dietą wysokobłonnikową sprzyja zdolność do degradacji i fermentacji skrobi odpornej *in vitro* stwierdzona u *B. adolescentis* (Belenguer et al. 2006).

Obecność pewnych gatunków bakterii jelitowych wiąże się z efektywną degradacją skrobi odpornej. Należą do nich *Bifidobacterium adolescentis* i *Ruminococcus bromii* (typ *Firmicutes*) (Ze et al. 2015) oraz *Eubacterium rectale*, które również posiadają zdolność wzrostu na pożywkach zwierających skrobię oporną, ale ich wzrost jest lepszy, gdy hodowane są w towarzystwie *R. bromii* (Cockburn et al. 2018). Zarówno *B. adolescentis*, jak i *R. bromii* dysponują aparatem enzymatycznym odpowiednim do degradacji skrobi. W przypadku *R. bromii* jest on zorganizowany w multienzymatyczny kompleks nazywany amylosomem (Mukhopadhyaya et al. 2018), analogicznie do celulosomu przetwarzającego celulozę u bakterii beztlenowych. *B. adolescentis* produkuje octan, mleczan i etanol (Amaretti et al. 2007), zaś *R. bromii* wytwarza octan, etanol i mrówczan (Crost et al. 2018).

Baxter i współ. (2019) obserwowali wzrost produkcji maślanu u 174 zdrowych osób stosujących przez okres 2 tygodni dietę zawierającą skrobię oporną z ziemniaków bądź kukurydzy o wysokiej zawartości amylozy lub inuliny z korzenia cykorii, dietą kontrolną była skrobia kukurydziana. U osób otrzymujących skrobię oporną występował wzrost względnej ilości bifidobakterii podobnie jak w naszych badaniach, natomiast wzrostowi poziomu *Ruminococcus bromii* lub *Clostridium chartatabidum* towarzyszyło wyższe stężenie maślanu, zapewne związane z obecnością *Eubacterium rectale* (Baxter et al. 2019). Bifidobakterie promują produkcję maślanu poprzez unikalną ścieżkę fermentacji nazywaną *Bifid shunt* (ścieżka fruktoza-6-fosforanowa) (Scardovi 1965), podczas której powstaje zarówno mleczan, jak i octan, przetwarzane następnie przez inne bakterie (*Eubacterium hallii*, *Anaerostipes caccae* i *Anaerostipes hadrus*) do maślanu (Allen-Vercoe et al. 2012; Duncan et al. 2004).

Karcynogenezie towarzyszą zmiany mikrobioty oraz składu śluzu wytwarzanego przez komórki nabłonka jelitowego. Zagato i wsp. (2020) wykazali, że poziom *Faecalibaculum rodentium* (u myszy) i *Holdemanella bioformis* (u ludzi) podczas karcynogenezy silnie się obniża, a podanie *F. rodentium* lub jego metabolitów myszom *Apc<sup>Min/+</sup>* lub AOM/DSS powodowało redukcję poziomu czynników wzrostu guza. Nasze badania potwierdziły tę obserwację, dieta wysokobłonnikowa wiązała się ze wzrostem poziomu bakterii rodzaju *Faecalibaculum*. *F. rodentium* wytwarza znaczące ilości SCFA, co przyczynia się do kontroli acetylacji białek (inhibicja HDAC) oraz zahamowania proliferacji komórek nowotworowych poprzez inhibicję aktywacji klacynuryny/NFATc3 (Zagato et al. 2020). Obecność mleczanu w środowisku guzów nowotworowych potwierdziły także nasze badania, w szczególności w grupie z nowotworem

wszczepionym dojelitowo.

Zespół Zagato i wsp. obserwował redukcję stężenia mleczanu w kale myszy, którym podawano *Faecalibaculum rodentium* (Zagato et al. 2020). Wyniki te nie były zaskakujące, ponieważ *F. rodentium* w warunkach *in vitro* produkuje znaczne ilości mleczanu wykorzystywanego następnie przez komórki nowotworowe (San-Millán and Brooks 2017; Faubert et al. 2017). Redukcja stężenia mleczanu mimo suplementacji *F. rodentium* mogła być spowodowana przez słabszą proliferację komórek guza bądź przez zwiększone jego wykorzystanie przez inne bakterie jako substratu i źródła energii (Duncan et.al. 2004). Dodanie supernatantu hodowli bakteryjnej *F. rodentium*, jak też podanie innych bakterii produkujących maślan (*L. lactis*) lub samego maślanu komórkom nowotworu jelita grubego *in vitro* wywoływało efekt antyproliferacyjny, co wskazuje na metabolity bakteryjne jako kluczowe dla redukcji wzrostu guza na drodze inhibicji HDAC (Zagato et al. 2020).

## 8. Wnioski

1. Największą zmienność mikrobiomu jelitowego generowała zmiana diety, tj. zwiększone spożycie skrobi odpornej bądź  $\alpha$ -celulozy.
2. Największe zmiany mikrobiomu jelitowego w zakresie składu taksonomicznego, poziomu metabolitów SCFA, markerów 3-OH FAs i receptorów GPR43 oraz GPR109A miały miejsce podczas etapu ekspansywnego wzrostu guzów we wszystkich zastosowanych modelach nowotworów.
3. W modelu nowotworu prostaty stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych oznaczane w kale było istotnie wyższe w grupie z nowotworem w porównaniu do grupy kontrolnej.
4. Zwiększona zawartość błonnika ( $\alpha$ -celulozy) w paszy korelowała z obniżonym stężeniem krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych i markerów LPSu; sugeruje to łagodzenie procesu zapalnego i spowolnienie translokacji LPSu z jelita do krwioobiegu. Zwiększone spożycie  $\alpha$ -celulozy było związane ze zmianami w składzie mikrobioty jelitowej, m. in. wzrostem poziomu *Bacteroidetes* i *Verrucomicrobia* oraz obniżeniem *Actinobacteria* i *Firmicutes*.
5. Obecność  $\alpha$ -celulozy w paszy promowała wzrost *Akkermansia muciniphila* i hamowała *Lactobacillus reuterii*.
6. Zwiększona zawartość błonnika (skrobi ziemniaczanej) w paszy korelowała ze wzrostem stężenia krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych u myszy zdrowych i myszy z nowotworem MC38, wskazując na ich znaczenie w utrzymaniu homeostazy jelita grubego. Spożycie paszy wysokobłonnikowej było związane ze wzrostem poziomu *Bifidobacterium*, *Parvibacter*, przedstawicieli *Coriobacteriaceae* i *Ruminococcaceae*, *Faecalibaculum* oraz rodziny *Clostridiales vadin BB60 group* i rzędu *Rhodospirillales*.
7. Zwiększona zawartość błonnika (skrobi ziemniaczanej) w paszy korelowała ze wzrostem całkowitego stężenia 3-OHFAs u myszy z nowotworem, szczególnie w modelu podskórnym, jak też u myszy zdrowych.
8. Otrzymane korelacje składu taksonomicznego, stężenia metabolitów bakteryjnych i markerów LPSu potwierdziły wartość tych oznaczeń w badaniach mikrobiomu jelitowego jako uzupełnienie sekwencjonowania NGS w badaniu interakcji zachodzących w mikrobiomie jelitowym podczas rozwijającego się procesu nowotworowego.

## 9. Literatura

1. Aagaard, Kjersti, Joseph Petrosino, Wendy Keitel, Mark Watson, James Katancik, Nathalia Garcia, Shital Patel, et al. 2013. "The Human Microbiome Project Strategy for Comprehensive Sampling of the Human Microbiome and Why It Matters." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27 (3): 1012–22. <https://doi.org/10.1096/fj.12-220806>.
2. Agus, Allison, Jérémy Denizot, Jonathan Thévenot, Margarita Martinez-Medina, Sébastien Massier, Pierre Sauvanet, Annick Bernalier-Donadille, et al. 2016. "Western Diet Induces a Shift in Microbiota Composition Enhancing Susceptibility to Adherent-Invasive *E. Coli* Infection and Intestinal Inflammation." *Scientific Reports* 6 (January): 19032. <https://doi.org/10.1038/srep19032>.
3. Ahmad, R., B. Kumar, Z. Chen, X. Chen, D. Müller, S. M. Lele, M. K. Washington, S. K. Batra, P. Dhawan, and A. B. Singh. 2017. "Loss of Claudin-3 Expression Induces IL6/Gp130/Stat3 Signaling to Promote Colon Cancer Malignancy by Hyperactivating Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling." *Oncogene* 36 (47): 6592–6604. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.259>.
4. Akaza, Hideyuki. 2012. "Prostate Cancer Chemoprevention by Soy Isoflavones: Role of Intestinal Bacteria as the 'Second Human Genome.'" *Cancer Science* 103 (6): 969–75. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02257.x>.
5. Al-Lahham, Sa'ad H., Maikel P. Peppelenbosch, Han Roelofsen, Roel J. Vonk, and Koen Venema. 2010. "Biological Effects of Propionic Acid in Humans; Metabolism, Potential Applications and Underlying Mechanisms." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1801 (11): 1175–83. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2010.07.007>.
6. Allen-Vercoe, Emma, Michelle Daigneault, Aaron White, Remo Panaccione, Sylvia H. Duncan, Harry J. Flint, Lindsey O'Neal, and Paul A. Lawson. 2012. "Anaerostipes Hadrum Comb. Nov., a Dominant Species within the Human Colonic Microbiota; Reclassification of *Eubacterium Hadrum* Moore et al. 1976." *Anaerobe* 18 (5): 523–29. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.09.002>.
7. Amaretti, Alberto, Tatiana Bernardi, Elena Tamburini, Simona Zanoni, Mariella Lomma, Diego Matteuzzi, and Maddalena Rossi. 2007. "Kinetics and Metabolism of *Bifidobacterium Adolescentis* MB 239 Growing on Glucose, Galactose, Lactose, and Galactooligosaccharides." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (July): 3637–44. <https://doi.org/10.1128/AEM.02914-06>.
8. Ang, Zhiwei, Jun Zhi Er, and Jeak Ling Ding. 2015. "The Short-Chain Fatty Acid Receptor GPR43 Is Transcriptionally Regulated by XBP1 in Human Monocytes." *Scientific Reports* 5 (January): 8134. <https://doi.org/10.1038/srep08134>.
9. Arora, Tulika, Ruey Leng Loo, Jelena Anastasovska, Glenn R. Gibson, Kieran M. Tuohy, Raj Kumar Sharma, Jonathan R. Swann, et al. 2012. "Differential Effects of Two Fermentable Carbohydrates on Central Appetite Regulation and Body Composition." *PLOS ONE* 7 (8): e43263. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043263>.
10. Arora, Tulika, Olga Rudenko, Kristoffer Lihme Egerod, Anna Sofie Husted, Petia Kovatcheva-Datchary, Rozita Akrami, Mette Kristensen, Thue W. Schwartz, and Fredrik Bäckhed. 2019. "Microbial Fermentation of Flaxseed Fibers Modulates the Transcriptome of GPR41-Expressing Enteroendocrine Cells and Protects Mice against Diet-Induced Obesity." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 316 (3): E453–63. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00391.2018>.
11. Arpaia, Nicholas, Clarissa Campbell, Xiyang Fan, Stanislav Dikiy, Joris van der Veeken, Paul

- deRoos, Hui Liu, et al. 2013. "Metabolites Produced by Commensal Bacteria Promote Peripheral Regulatory T-Cell Generation." *Nature* 504 (7480): 451–55. <https://doi.org/10.1038/nature12726>.
12. Arpaia, Nicholas, and Alexander Y. Rudensky. 2014. "Microbial Metabolites Control Gut Inflammatory Responses." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (6): 2058–59. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323183111>.
  13. Arumugam, Manimozhiyan, Jeroen Raes, Eric Pelletier, Denis Le Paslier, Takuji Yamada, Daniel R. Mende, Gabriel R. Fernandes, et al. 2011. "Enterotypes of the Human Gut Microbiome." *Nature* 473 (7346): 174–80. <https://doi.org/10.1038/nature09944>.
  14. Atarashi, Koji, Takeshi Tanoue, Kenshiro Oshima, Wataru Suda, Yuji Nagano, Hiroyoshi Nishikawa, Shinji Fukuda, et al. 2013. "Treg Induction by a Rationally Selected Mixture of Clostridia Strains from the Human Microbiota." *Nature* 500 (7461): 232–36. <https://doi.org/10.1038/nature12331>.
  15. Atarashi, Koji, Takeshi Tanoue, Tatsuichiro Shima, Akemi Imaoka, Tomomi Kuwahara, Yoshika Momose, Genhong Cheng, et al. 2011a. "Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species." *Science (New York, N.Y.)* 331 (6015): 337–41. <https://doi.org/10.1126/science.1198469>.
  16. Aune, Dagfinn, Deborah A. Navarro Rosenblatt, Doris S. M. Chan, Ana Rita Vieira, Rui Vieira, Darren C. Greenwood, Lars J. Vatten, and Teresa Norat. 2015. "Dairy Products, Calcium, and Prostate Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies." *The American Journal of Clinical Nutrition* 101 (1): 87–117. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.067157>.
  17. Bansal, Tarun, Robert C. Alaniz, Thomas K. Wood, and Arul Jayaraman. 2010. "The Bacterial Signal Indole Increases Epithelial-Cell Tight-Junction Resistance and Attenuates Indicators of Inflammation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (1): 228–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906112107>.
  18. Bartlett, John G., and Dale N. Gerding. 2008. "Clinical Recognition and Diagnosis of *Clostridium Difficile* Infection." *Clinical Infectious Diseases* 46 (s1): S12–18. <https://doi.org/10.1086/521863>.
  19. Bauer, Heinz, Richard E. Horowitz, Stanley M. Levenson, and Hans Popper. 1963. "The Response of the Lymphatic Tissue to the Microbial Flora. Studies on Germfree Mice." *The American Journal of Pathology* 42 (4): 471–83.
  20. Baxter, Nielson T., Alexander W. Schmidt, Arvind Venkataraman, Kwi S. Kim, Clive Waldron, and Thomas M. Schmidt. 2019. "Dynamics of Human Gut Microbiota and Short-Chain Fatty Acids in Response to Dietary Interventions with Three Fermentable Fibers." *MBio* 10 (1): e02566-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02566-18>.
  21. Belenguer, Alvaro, Sylvia H. Duncan, A. Graham Calder, Grietje Holtrop, Petra Louis, Gerald E. Lobley, and Harry J. Flint. 2006. "Two Routes of Metabolic Cross-Feeding between Bifidobacterium Adolescentis and Butyrate-Producing Anaerobes from the Human Gut." *Applied and Environmental Microbiology* 72 (5): 3593–99. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3593-3599.2006>.
  22. Beller, Alexander, Andrey Kruglov, Pawel Durek, V Goetze, Ute Hoffmann, R Maier, K Heiking, et al. 2019. "P104 Anaeroplasma, a Potential Anti-Inflammatory Probiotic for the Treatment of Chronic Intestinal Inflammation." In , 78:A45.2-A46. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-EWRR2019.92>.
  23. Beller, Alexander, Andrey Kruglov, Pawel Durek, Victoria Goetze, Katharina Werner, Gitta

- Anne Heinz, Justus Ninnemann, et al. 2020. "Specific Microbiota Enhances Intestinal IgA Levels by Inducing TGF- $\beta$  in T Follicular Helper Cells of Peyer's Patches in Mice." *European Journal of Immunology* 6 (50): 783–94. <https://doi.org/10.1002/eji.201948474>.
24. Bindels, Laure B., Audrey M. Neyrinck, Nuria Salazar, Bernard Taminiau, Céline Druart, Giulio G. Muccioli, Emmanuelle François, et al. 2015. "Non Digestible Oligosaccharides Modulate the Gut Microbiota to Control the Development of Leukemia and Associated Cachexia in Mice." *PLoS ONE* 10 (6): e0131009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131009>.
  25. Borchert, Konstantin B. L., Rahma Boughanmi, Berthold Reis, Philipp Zimmermann, Christine Steinbach, Peter Graichen, Anastasiya Svirepa, et al. 2021. "Removal of Lead, Cadmium, and Aluminum Sulfate from Simulated and Real Water with Native and Oxidized Starches." *Polysaccharides* 2 (2): 429–53. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2020027>.
  26. Bourriaud, C., R. J. Robins, L. Martin, F. Kozłowski, E. Tenailleau, C. Cherbut, and C. Michel. 2005. "Lactate Is Mainly Fermented to Butyrate by Human Intestinal Microfloras but Inter-Individual Variation Is Evident." *Journal of Applied Microbiology* 99 (1): 201–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02605.x>.
  27. Brändstedt, Johan, Martin Almquist, Jonas Manjer, and Johan Malm. 2016. "Vitamin D, PTH, and Calcium in Relation to Survival Following Prostate Cancer." *Cancer Causes & Control: CCC* 27 (5): 669–77. <https://doi.org/10.1007/s10552-016-0740-7>.
  28. Brown, Andrew J., Susan M. Goldsworthy, Ashley A. Barnes, Michelle M. Eilert, Lili Tcheang, Dion Daniels, Alison I. Muir, et al. 2003. "The Orphan G Protein-Coupled Receptors GPR41 and GPR43 Are Activated by Propionate and Other Short Chain Carboxylic Acids." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (13): 11312–19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211609200>.
  29. Buléon, Alain, Paul Colona, V Planchot, and Steven Ball. 1998. "Starch Granules: Structure and Biosynthesis." *International Journal of Biological Macromolecules* 23 (September): 85–112. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(98\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(98)00040-3).
  30. Bullman, Susan, Chandra S. Pedamallu, Ewa Sicinska, Thomas E. Clancy, Xiaoyang Zhang, Diana Cai, Donna Neuberg, et al. 2017. "Analysis of Fusobacterium Persistence and Antibiotic Response in Colorectal Cancer." *Science (New York, N.Y.)* 358 (6369): 1443–48. <https://doi.org/10.1126/science.aal5240>.
  31. Caesar, Robert, Valentina Tremaroli, Petia Kovatcheva-Datchary, Patrice D. Cani, and Fredrik Bäckhed. 2015. "Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling." *Cell Metabolism* 22 (4): 658–68. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.07.026>.
  32. Cai, Tommaso, Raffaella Santi, Irene Tamanini, Ilaria Camilla Galli, Gianpaolo Perletti, Truls E. Bjerklund Johansen, and Gabriella Nesi. 2019. "Current Knowledge of the Potential Links between Inflammation and Prostate Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (15). <https://doi.org/10.3390/ijms20153833>.
  33. Cajka, Tomas, and Oliver Fiehn. 2016. "Toward Merging Untargeted and Targeted Methods in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics." *Analytical Chemistry* 88 (1): 524–45. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04491>.
  34. Cani, Patrice D., Jacques Amar, Miguel Angel Iglesias, Marjorie Poggi, Claude Knauf, Delphine Bastelica, Audrey M. Neyrinck, et al. 2007. "Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance." *Diabetes* 56 (7): 1761–72. <https://doi.org/10.2337/db06-1491>.

35. Cantarel, Brandi L., Vincent Lombard, and Bernard Henrissat. 2012. "Complex Carbohydrate Utilization by the Healthy Human Microbiome." *PLOS ONE* 7 (6): e28742. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028742>.
36. Caroff, Martine, and Doris Karibian. 2003. "Structure of Bacterial Lipopolysaccharides." *Carbohydrate Research* 338 (23): 2431–47. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.07.010>.
37. Castellarin, Mauro, René L. Warren, J. Douglas Freeman, Lisa Dreolini, Martin Krzywinski, Jaclyn Strauss, Rebecca Barnes, et al. 2012. "Fusobacterium Nucleatum Infection Is Prevalent in Human Colorectal Carcinoma." *Genome Research* 22 (2): 299–306. <https://doi.org/10.1101/gr.126516.111>.
38. Chan, June M., Amy K. Darke, Kathryn L. Penney, Catherine M. Tangen, Phyllis J. Goodman, Gwo-Shu Mary Lee, Tong Sun, et al. 2016. "Selenium- or Vitamin E-Related Gene Variants, Interaction with Supplementation, and Risk of High-Grade Prostate Cancer in SELECT." *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, May. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-16-0104>.
39. Chang, Pamela V., Liming Hao, Stefan Offermanns, and Ruslan Medzhitov. 2014. "The Microbial Metabolite Butyrate Regulates Intestinal Macrophage Function via Histone Deacetylase Inhibition." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (6): 2247–52. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322269111>.
40. Chang, S. K., A. F. Dohrman, C. B. Basbaum, S. B. Ho, T. Tsuda, N. W. Toribara, J. R. Gum, and Y. S. Kim. 1994. "Localization of Mucin (MUC2 and MUC3) Messenger RNA and Peptide Expression in Human Normal Intestine and Colon Cancer." *Gastroenterology* 107 (1): 28–36. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(94\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0016-5085(94)90057-4).
41. Chassard, Christophe, Eve Delmas, Céline Robert, and Annick Bernalier-Donadille. 2010. "The Cellulose-Degrading Microbial Community of the Human Gut Varies According to the Presence or Absence of Methanogens." *FEMS Microbiology Ecology* 74 (1): 205–13. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00941.x>.
42. Clinton, Steven K., Edward L. Giovannucci, and Stephen D. Hursting. 2020. "The World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Third Expert Report on Diet, Nutrition, Physical Activity, and Cancer: Impact and Future Directions." *The Journal of Nutrition* 150 (4): 663–71. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz268>.
43. Cockburn, Darrell W., and Nicole M. Koropatkin. 2016. "Polysaccharide Degradation by the Intestinal Microbiota and Its Influence on Human Health and Disease." *Journal of Molecular Biology* 428 (16): 3230–52. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.06.021>.
44. Cockburn, Darrell W., Carolyn Suh, Krizia Perez Medina, Rebecca M. Duvall, Zdzislaw Wawrzak, Bernard Henrissat, and Nicole M. Koropatkin. 2018. "Novel Carbohydrate Binding Modules in the Surface Anchored  $\alpha$ -Amylase of Eubacterium Rectale Provide a Molecular Rationale for the Range of Starches Used by This Organism in the Human Gut." *Molecular Microbiology* 107 (2): 249–64. <https://doi.org/10.1111/mmi.13881>.
45. Collier-Hyams, L. S., and A. S. Neish. 2005. "Innate Immune Relationship between Commensal Flora and the Mammalian Intestinal Epithelium." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 62 (12): 1339–48. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5038-y>.
46. Collins, Rebecca R. J., Khushbu Patel, William C. Putnam, Payal Kapur, and Dinesh Rakheja. 2017. "Oncometabolites: A New Paradigm for Oncology, Metabolism, and the Clinical Laboratory." *Clinical Chemistry* 63 (12): 1812–20. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.267666>.

47. Corbett, T. H., D. P. Griswold, B. J. Roberts, J. C. Peckham, and F. M. Schabel. 1975. "Tumor Induction Relationships in Development of Transplantable Cancers of the Colon in Mice for Chemotherapy Assays, with a Note on Carcinogen Structure." *Cancer Research* 35 (9): 2434–39.
48. Costello, Elizabeth K., Christian L. Lauber, Micah Hamady, Noah Fierer, Jeffrey I. Gordon, and Rob Knight. 2009. "Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time." *Science (New York, N.Y.)* 326 (5960): 1694–97. <https://doi.org/10.1126/science.1177486>.
49. Cousens, L. S., D. Gallwitz, and B. M. Alberts. 1979. "Different Accessibilities in Chromatin to Histone Acetylase." *The Journal of Biological Chemistry* 254 (5): 1716–23.
50. Cronin, Peter, Susan A. Joyce, Paul W. O'Toole, and Eibhlís M. O'Connor. 2021. "Dietary Fibre Modulates the Gut Microbiota." *Nutrients* 13 (5): 1655. <https://doi.org/10.3390/nu13051655>.
51. Crost, Emmanuelle H., Gwenaëlle Le Gall, Jenny A. Laverde-Gomez, Indrani Mukhopadhyaya, Harry J. Flint, and Nathalie Juge. 2018. "Mechanistic Insights Into the Cross-Feeding of *Ruminococcus Gnavus* and *Ruminococcus Bromii* on Host and Dietary Carbohydrates." *Frontiers in Microbiology* 9: 2558. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02558>.
52. Cruz-López, Karen G. de la, Leonardo Josué Castro-Muñoz, Diego O. Reyes-Hernández, Alejandro García-Carrancá, and Joaquín Manzo-Merino. 2019. "Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches." *Frontiers in Oncology* 9: 1143. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01143>.
53. Cummings, J. H. 1983. "Fermentation in the Human Large Intestine: Evidence and Implications for Health." *Lancet (London, England)* 1 (8335): 1206–9. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(83\)92478-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(83)92478-9).
54. Cummings, J. H., E. W. Pomare, W. J. Branch, C. P. Naylor, and G. T. Macfarlane. 1987. "Short Chain Fatty Acids in Human Large Intestine, Portal, Hepatic and Venous Blood." *Gut* 28 (10): 1221–27. <https://doi.org/10.1136/gut.28.10.1221>.
55. De Vos, Willem M. 2009. "Mining the Microbes – the Human Microbiome as Model." *Microbial Biotechnology* 2 (2): 153–54. [https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00090\\_20.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00090_20.x).
56. Deda, Olga, Helen G. Gika, Ian D. Wilson, and Georgios A. Theodoridis. 2015. "An Overview of Fecal Sample Preparation for Global Metabolic Profiling." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 113 (September): 137–50. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.006>.
57. Dejea, Christine M., Payam Fathi, John M. Craig, Annemarie Boleij, Rahwa Taddese, Abby L. Geis, Xinqun Wu, et al. 2018. "Patients with Familial Adenomatous Polyposis Harbor Colonic Biofilms Containing Tumorigenic Bacteria." *Science (New York, N.Y.)* 359 (6375): 592–97. <https://doi.org/10.1126/science.aah3648>.
58. Delzenne, Nathalie M., and Patrice D. Cani. 2011. "Gut Microbiota and the Pathogenesis of Insulin Resistance." *Current Diabetes Reports* 11 (3): 154–59. <https://doi.org/10.1007/s11892-011-0191-1>.
59. Desai, Mahesh, Anna Seekatz, Nicole Koropatkin, Nobuhiko Kamada, Christina Hickey, Mathis Wolter, Nicholas A Pudlo, et al. 2016. "A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility." *Cell* 167 (November): 1339-1353.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.043>.
60. Diakite, Ami, Grégory Dubourg, Niokhor Dione, Pamela Afouda, Sara Bellali, Issa Isaac



- Ngom, Camille Valles, Mamadou Iamine Tall, Jean-Christophe Lagier, and Didier Raoult. 2020. "Optimization and Standardization of the Culturomics Technique for Human Microbiome Exploration." *Scientific Reports* 10 (June): 9674. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66738-8>.
61. Donohoe, Dallas R., Leonard B. Collins, Aminah Wali, Rebecca Bigler, Wei Sun, and Scott J. Bultman. 2012. "The Warburg Effect Dictates the Mechanism of Butyrate-Mediated Histone Acetylation and Cell Proliferation." *Molecular Cell* 48 (4): 612–26. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.033>.
  62. Dubourg, Grégory, Sophie Baron, Frédéric Cadoret, Carine Couderc, Pierre-Edouard Fournier, Jean-Christophe Lagier, and Didier Raoult. 2018. "From Culturomics to Clinical Microbiology and Forward." *Emerging Infectious Diseases* 24 (9): 1683–90. <https://doi.org/10.3201/eid2409.170995>.
  63. Duncan, Sylvia H., Alvaro Belenguer, Grietje Holtrop, Alexandra M. Johnstone, Harry J. Flint, and Gerald E. Lobley. 2007. "Reduced Dietary Intake of Carbohydrates by Obese Subjects Results in Decreased Concentrations of Butyrate and Butyrate-Producing Bacteria in Feces." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (4): 1073–78. <https://doi.org/10.1128/AEM.02340-06>.
  64. Duncan, Sylvia H., Grietje Holtrop, Gerald E. Lobley, A. Graham Calder, Colin S. Stewart, and Harry J. Flint. 2004. "Contribution of Acetate to Butyrate Formation by Human Faecal Bacteria." *The British Journal of Nutrition* 91 (6): 915–23. <https://doi.org/10.1079/BJN20041150>.
  65. Duncan, Sylvia H., Petra Louis, and Harry J. Flint. 2004. "Lactate-Utilizing Bacteria, Isolated from Human Feces, That Produce Butyrate as a Major Fermentation Product." *Applied and Environmental Microbiology* 70 (10): 5810–17. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5810-5817.2004>.
  66. Dupaul-Chicoine, Jeremy, Garabet Yeretssian, Karine Doiron, Kirk S. B. Bergstrom, Christian R. McIntire, Philippe M. LeBlanc, Charles Meunier, et al. 2010. "Control of Intestinal Homeostasis, Colitis, and Colitis-Associated Colorectal Cancer by the Inflammatory Caspases." *Immunity* 32 (3): 367–78. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.02.012>.
  67. Elinav, Eran, Till Strowig, Andrew L. Kau, Jorge Henao-Mejia, Christoph A. Thaiss, Carmen J. Booth, David R. Peaper, et al. 2011. "NLRP6 Inflammasome Regulates Colonic Microbial Ecology and Risk for Colitis." *Cell* 145 (5): 745–57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.022>.
  68. Everard, Amandine, Clara Belzer, Lucie Geurts, Janneke P. Ouwerkerk, Céline Druart, Laure B. Bindels, Yves Guiot, et al. 2013. "Cross-Talk between *Akkermansia muciniphila* and Intestinal Epithelium Controls Diet-Induced Obesity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (22): 9066–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219451110>.
  69. Faubert, Brandon, Kevin Y. Li, Ling Cai, Christopher T. Hensley, Jiyeon Kim, Lauren G. Zacharias, Chendong Yang, et al. 2017. "Lactate Metabolism in Human Lung Tumors." *Cell* 171 (2): 358–371.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.019>.
  70. Ferlay, J., M. Colombet, I. Soerjomataram, C. Mathers, D. M. Parkin, M. Piñeros, A. Znaor, and F. Bray. 2019. "Estimating the Global Cancer Incidence and Mortality in 2018: GLOBOCAN Sources and Methods." *International Journal of Cancer* 144 (8): 1941–53. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>.
  71. Flint, Harry J., Karen P. Scott, Sylvia H. Duncan, Petra Louis, and Evelyne Forano. 2012. "Microbial Degradation of Complex Carbohydrates in the Gut." *Gut Microbes* 3 (4): 289–

306. <https://doi.org/10.4161/gmic.19897>.
72. Foster, Barbara A., Jeffrey R. Gingrich, Eugene D. Kwon, Christopher Madias, and Norman M. Greenberg. 1997. "Characterization of Prostatic Epithelial Cell Lines Derived from Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP) Model." *Cancer Research* 57 (16): 3325–30.
73. Fraga, Mario F., Esteban Ballestar, Ana Villar-Garea, Manuel Boix-Chornet, Jesus Espada, Gunnar Schotta, Tiziana Bonaldi, et al. 2005. "Loss of Acetylation at Lys16 and Trimethylation at Lys20 of Histone H4 Is a Common Hallmark of Human Cancer." *Nature Genetics* 37 (4): 391–400. <https://doi.org/10.1038/ng1531>.
74. Frost, Gary, Michelle L. Sleeth, Meliz Sahuri-Arisoylu, Blanca Lizarbe, Sebastian Cerdan, Leigh Brody, Jelena Anastasovska, et al. 2014. "The Short-Chain Fatty Acid Acetate Reduces Appetite via a Central Homeostatic Mechanism." *Nature Communications* 5 (1): 3611. <https://doi.org/10.1038/ncomms4611>.
75. Fujita, Kazutoshi, Takuji Hayashi, Makoto Matsushita, Motohide Uemura, and Norio Nonomura. 2019. "Obesity, Inflammation, and Prostate Cancer." *Journal of Clinical Medicine* 8 (2): 201. <https://doi.org/10.3390/jcm8020201>.
76. Fung, Kim Y. C., Gemma V. Brierley, Steve Henderson, Peter Hoffmann, Shaun R. McColl, Trevor Lockett, Richard Head, and Leah Cosgrove. 2011. "Butyrate-Induced Apoptosis in HCT116 Colorectal Cancer Cells Includes Induction of a Cell Stress Response." *Journal of Proteome Research* 10 (4): 1860–69. <https://doi.org/10.1021/pr1011125>.
77. Fung, Teresa T., Frank B. Hu, Matthias Schulze, Michael Pollak, Tianying Wu, Charles S. Fuchs, and Edward Giovannucci. 2012. "A Dietary Pattern That Is Associated with C-Peptide and Risk of Colorectal Cancer in Women." *Cancer Causes & Control : CCC* 23 (6): 959–65. <https://doi.org/10.1007/s10552-012-9969-y>.
78. Furusawa, Yukihiro, Yuuki Obata, Shinji Fukuda, Takaho A. Endo, Gaku Nakato, Daisuke Takahashi, Yumiko Nakanishi, et al. 2013. "Commensal Microbe-Derived Butyrate Induces the Differentiation of Colonic Regulatory T Cells." *Nature* 504 (7480): 446–50. <https://doi.org/10.1038/nature12721>.
79. Gagnière, Johan, Jennifer Raisch, Julie Veziat, Nicolas Barnich, Richard Bonnet, Emmanuel Buc, Marie-Agnès Bringer, Denis Pezet, and Mathilde Bonnet. 2016. "Gut Microbiota Imbalance and Colorectal Cancer." *World Journal of Gastroenterology* 22 (2): 501–18. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.501>.
80. Galipeau, Heather J, and Elena F Verdu. 2014. "Gut Microbes and Adverse Food Reactions: Focus on Gluten Related Disorders." *Gut Microbes* 5 (5): 594–605. <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.969635>.
81. Ganapathy, Vadivel, Muthusamy Thangaraju, Elangovan Gopal, Pamela M. Martin, Shiro Itagaki, Seiji Miyauchi, and Puttur D. Prasad. 2008. "Sodium-Coupled Monocarboxylate Transporters in Normal Tissues and in Cancer." *The AAPS Journal* 10 (1): 193–99. <https://doi.org/10.1208/s12248-008-9022-y>.
82. Ganapathy, Vadivel, Muthusamy Thangaraju, Puttur D. Prasad, Pamela M. Martin, and Nagendra Singh. 2013. "Transporters and Receptors for Short-Chain Fatty Acids as the Molecular Link between Colonic Bacteria and the Host." *Current Opinion in Pharmacology* 13 (6): 869–74. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.08.006>.
83. Gensollen, Thomas, Shankar S. Iyer, Dennis L. Kasper, and Richard S. Blumberg. 2016. "How Colonization by Microbiota in Early Life Shapes the Immune System." *Science (New York, N.Y.)* 352 (6285): 539–44. <https://doi.org/10.1126/science.aad9378>.

84. Genua, Flavia, Vedhika Raghunathan, Mazda Jenab, William M. Gallagher, and David J. Hughes. 2021. "The Role of Gut Barrier Dysfunction and Microbiome Dysbiosis in Colorectal Cancer Development." *Frontiers in Oncology* 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.626349>.
85. Gernat, C., S. Radosta, G. Damaschun, and F. Schierbaum. 1990. "Supramolecular Structure of Legume Starches Revealed by X-Ray Scattering." *Starch - Staerke (Germany, F.R.)*. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Supramolecular+structure+of+legume+starches+revealed+by+x-ray+scattering&author=Gernat%2C+C.+%28Zentralinst.+fuer+Enaehrung%2C+Bergholz-Rehbruecke+%28Germany%29%29&publication\\_year=1990](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Supramolecular+structure+of+legume+starches+revealed+by+x-ray+scattering&author=Gernat%2C+C.+%28Zentralinst.+fuer+Enaehrung%2C+Bergholz-Rehbruecke+%28Germany%29%29&publication_year=1990).
86. Geuking, Markus B., Julia Cahenzli, Melissa A. E. Lawson, Derek C. K. Ng, Emma Slack, Siegfried Hapfelmeier, Kathy D. McCoy, and Andrew J. Macpherson. 2011. "Intestinal Bacterial Colonization Induces Mutualistic Regulatory T Cell Responses." *Immunity* 34 (5): 794–806. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.021>.
87. Giannakou, Christina, Kukka Aimonen, Louis van Bloois, Julia Catalán, Robert E. Geertsma, Eric R. Gremmer, Wim H. de Jong, et al. 2019. "Sensitive Method for Endotoxin Determination in Nanomedicinal Product Samples." *Nanomedicine (London, England)* 14 (10): 1231–46. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0339>.
88. Gibson, Glenn R., Robert Hutkins, Mary Ellen Sanders, Susan L. Prescott, Raylene A. Reimer, Seppo J. Salminen, Karen Scott, et al. 2017. "Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics." *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 14 (8): 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>.
89. Gopal, Elangovan, Seiji Miyauchi, Pamela M. Martin, Sudha Ananth, Penny Roon, Sylvia B. Smith, and Vadivel Ganapathy. 2007. "Transport of Nicotinate and Structurally Related Compounds by Human SMCT1 (SLC5A8) and Its Relevance to Drug Transport in the Mammalian Intestinal Tract." *Pharmaceutical Research* 24 (3): 575–84. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9176-1>.
90. Graff, Rebecca E., Andreas Pettersson, Rosina T. Lis, Thomas U. Ahearn, Sarah C. Markt, Kathryn M. Wilson, Jennifer R. Rider, et al. 2016. "Dietary Lycopene Intake and Risk of Prostate Cancer Defined by ERG Protein Expression." *The American Journal of Clinical Nutrition* 103 (3): 851–60. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.118703>.
91. Greten, Florian R., Lars Eckmann, Tim F. Greten, Jin Mo Park, Zhi-Wei Li, Laurence J. Egan, Martin F. Kagnoff, and Michael Karin. 2004. "IKKbeta Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer." *Cell* 118 (3): 285–96. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.013>.
92. Grootaert, Charlotte, Pieter Van den Abbeele, Massimo Marzorati, Willem F. Broekaert, Christophe M. Courtin, Jan A. Delcour, Willy Verstraete, and Tom Van de Wiele. 2009. "Comparison of Prebiotic Effects of Arabinoxylan Oligosaccharides and Inulin in a Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem." *FEMS Microbiology Ecology* 69 (2): 231–42. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00712.x>.
93. Guilloteau, P., L. Martin, V. Eeckhaut, R. Ducatelle, R. Zabielski, and F. Van Immerseel. 2010. "From the Gut to the Peripheral Tissues: The Multiple Effects of Butyrate." *Nutrition Research Reviews* 23 (2): 366–84. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000247>.
94. Halestrap, Andrew P. 2012. "The Monocarboxylate Transporter Family--Structure and Functional Characterization." *IUBMB Life* 64 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1002/iub.573>.
95. Hatano, Koji, Kazutoshi Fujita, and Norio Nonomura. 2020. "Application of Anti-

- Inflammatory Agents in Prostate Cancer.” *Journal of Clinical Medicine* 9 (8): 2680. <https://doi.org/10.3390/jcm9082680>.
96. Hayashi, Takuji, Kazutoshi Fujita, Makoto Matsushita, and Norio Nonomura. 2019. “Main Inflammatory Cells and Potentials of Anti-Inflammatory Agents in Prostate Cancer.” *Cancers* 11 (8): 1153. <https://doi.org/10.3390/cancers11081153>.
  97. Hayashi, Takuji, Kazutoshi Fujita, Satoshi Nojima, Yujiro Hayashi, Kosuke Nakano, Yu Ishizuya, Cong Wang, et al. 2018. “High-Fat Diet-Induced Inflammation Accelerates Prostate Cancer Growth via IL6 Signaling.” *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 24 (17): 4309–18. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0106>.
  98. He, Xiaosheng, Kana Wu, Xuehong Zhang, Reiko Nishihara, Yin Cao, Charlie S. Fuchs, Edward L. Giovannucci, Shuji Ogino, Andrew T. Chan, and Mingyang Song. 2019. “Dietary Intake of Fiber, Whole Grains and Risk of Colorectal Cancer: An Updated Analysis According to Food Sources, Tumor Location and Molecular Subtypes in Two Large US Cohorts.” *International Journal of Cancer* 145 (11): 3040–51. <https://doi.org/10.1002/ijc.32382>.
  99. Hennezel, Eva d’, Sahar Abubucker, Leon O. Murphy, and Thomas W. Cullen. 2017. “Total Lipopolysaccharide from the Human Gut Microbiome Silences Toll-Like Receptor Signaling.” *MSystems* 2 (6). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00046-17>.
  100. Hm, Hamer, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost Fj, and Brummer Rj. 2008. “Review Article: The Role of Butyrate on Colonic Function.” *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 27 (2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x>.
  101. Huang, N., J. P. Katz, D. R. Martin, and G. D. Wu. 1997. “Inhibition of IL-8 Gene Expression in Caco-2 Cells by Compounds Which Induce Histone Hyperacetylation.” *Cytokine* 9 (1): 27–36. <https://doi.org/10.1006/cyto.1996.0132>.
  102. Huda-Faujan, N., A. S. Abdulmir, A. B. Fatimah, O. Muhammad Anas, M. Shuhaimi, A. M. Yazid, and Y. Y. Loong. 2010. “The Impact of the Level of the Intestinal Short Chain Fatty Acids in Inflammatory Bowel Disease Patients Versus Healthy Subjects [Abstract].” *The Open Biochemistry Journal* 4 (1). <https://doi.org/10.2174/1874091X01004010053>.
  103. Huszczyński, Steven M., Joseph S. Lam, and Cezar M. Khursigara. 2019. “The Role of Pseudomonas Aeruginosa Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology.” *Pathogens* 9 (1): 6. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010006>.
  104. Huttenhower, Curtis, Dirk Gevers, Rob Knight, Sahar Abubucker, Jonathan Badger, Asif Chinwalla, Heather Huot Creasy, et al. 2012. “The Human Microbiome Project (HMP) Consortium. Structure, Function and Diversity of the Healthy Human Microbiome. Nature 486: 207-214.” *Nature* 486 (June): 207–14. <https://doi.org/10.1038/nature11234>.
  105. Imaoka, A., S. Matsumoto, H. Setoyama, Y. Okada, and Y. Umesaki. 1996. “Proliferative Recruitment of Intestinal Intraepithelial Lymphocytes after Microbial Colonization of Germ-Free Mice.” *European Journal of Immunology* 26 (4): 945–48. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260434>.
  106. Iwanaga, Toshihiko, Kumiko Takebe, Ikuo Kato, Shin-Ichiro Karaki, and Atsukazu Kuwahara. 2006. “Cellular Expression of Monocarboxylate Transporters (MCT) in the Digestive Tract of the Mouse, Rat, and Humans, with Special Reference to Slc5a8.” *Biomedical Research (Tokyo, Japan)* 27 (5): 243–54. <https://doi.org/10.2220/biomedres.27.243>.
  107. Jain, Sumeet, Pujarini Dash, Aliva P. Minz, Sanghamitra Satpathi, Ajit G. Samal, Prativa K. Behera, Partha S. Satpathi, and Shantibhusan Senapati. 2019. “Lipopolysaccharide (LPS) Enhances Prostate Cancer Metastasis Potentially through NF-KB Activation and Recurrent

- Dexamethasone Administration Fails to Suppress It in Vivo." *The Prostate* 79 (2): 168–82. <https://doi.org/10.1002/pros.23722>.
108. Javier-DesLoges, Juan, Rana R. McKay, Austin D. Swafford, Gregory D. Sepich-Poore, Rob Knight, and J. Kellogg Parsons. 2021. "The Microbiome and Prostate Cancer." *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, July. <https://doi.org/10.1038/s41391-021-00413-5>.
  109. Joly, C., J. Gay-Quéheillard, A. Léké, K. Chardon, S. Delanaud, V. Bach, and H. Khorsi-Cauet. 2012. "Impact of Chronic Exposure to Low Doses of Chlorpyrifos on the Intestinal Microbiota in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®) and in the Rat." *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1283-4>.
  110. Jung, Tae-Hwan, Woo-Min Jeon, and Kyoung-Sik Han. 2015. "In Vitro Effects of Dietary Inulin on Human Fecal Microbiota and Butyrate Production." *Journal of Microbiology and Biotechnology* 25 (9): 1555–58. <https://doi.org/10.4014/jmb.1505.05078>.
  111. Kaiko, Gerard E., Stacy H. Ryu, Olivia I. Koues, Patrick L. Collins, Lilianna Solnica-Krezel, Edward J. Pearce, Erika L. Pearce, Eugene M. Oltz, and Thaddeus S. Stappenbeck. 2016. "The Colonic Crypt Protects Stem Cells from Microbiota-Derived Metabolites." *Cell* 167 (4): 1137. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.034>.
  112. Kasubuchi, Mayu, Sae Hasegawa, Takero Hiramatsu, Atsuhiko Ichimura, and Ikuo Kimura. 2015. "Dietary Gut Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, and Host Metabolic Regulation." *Nutrients* 7 (4): 2839–49. <https://doi.org/10.3390/nu7042839>.
  113. Kell, Douglas, and Ethersia Pretorius. 2018. "No Effects without Causes: The Iron Dysregulation and Dormant Microbes Hypothesis for Chronic, Inflammatory Diseases: Iron Dysregulation and Dormant Microbes." *Biological Reviews* 93 (March). <https://doi.org/10.1111/brv.12407>.
  114. Kim, Chang H. 2018. "Immune Regulation by Microbiome Metabolites." *Immunology* 154 (2): 220–29. <https://doi.org/10.1111/imm.12930>.
  115. Kim, Ho Min, Beom Seok Park, Jung-In Kim, Sung Eun Kim, Judong Lee, Se Cheol Oh, Purevjav Enkhbayar, et al. 2007. "Crystal Structure of the TLR4-MD-2 Complex with Bound Endotoxin Antagonist Eritoran." *Cell* 130 (5): 906–17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.002>.
  116. Kim, Myung H., Seung G. Kang, Jeong H. Park, Masashi Yanagisawa, and Chang H. Kim. 2013. "Short-Chain Fatty Acids Activate GPR41 and GPR43 on Intestinal Epithelial Cells to Promote Inflammatory Responses in Mice." *Gastroenterology* 145 (2): 396-406.e1-10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.04.056>.
  117. Kim, Myunghoo, Leon Friesen, Jeongho Park, and Chang H. Kim. 2018. "The Gut Microbial Metabolites Short-Chain Fatty Acids Restrain Tissue Bacterial Load, Chronic Inflammation, and Associated Cancer in the Colon." *European Journal of Immunology* 48 (7): 1235–47. <https://doi.org/10.1002/eji.201747122>.
  118. Kim, Yeji, Sung Wook Hwang, Seungil Kim, Yong-Soo Lee, Tae-Young Kim, Su-Hyun Lee, Su Kim, Hyun Yoo, Eun Na Kim, and Mi-Na Kweon. 2020. "Dietary Cellulose Prevents Gut Inflammation by Modulating Lipid Metabolism and Gut Microbiota." *Gut Microbes* 11 (March): 1–18. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1730149>.
  119. Klingbeil, Elizabeth A., Carolina Cawthon, Rebecca Kirkland, and Claire B. de La Serre. 2019. "Potato-Resistant Starch Supplementation Improves Microbiota Dysbiosis, Inflammation, and Gut–Brain Signaling in High Fat-Fed Rats." *Nutrients* 11 (11): 2710. <https://doi.org/10.3390/nu11112710>.

120. Koh, Ara, Filipe De Vadder, Petia Kovatcheva-Datchary, and Fredrik Bäckhed. 2016. "From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites." *Cell* 165 (June): 1332–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>.
121. Konieczna, Patrycja, David Groeger, Mario Ziegler, Remo Frei, Ruth Ferstl, Fergus Shanahan, Eamonn M. M. Quigley, Barry Kiely, Cezmi A. Akdis, and Liam O'Mahony. 2012. "Bifidobacterium Infantis 35624 Administration Induces Foxp3 T Regulatory Cells in Human Peripheral Blood: Potential Role for Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells." *Gut* 61 (3): 354–66. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300936>.
122. Kostic, Aleksandar D., Dirk Gevers, Chandra Sekhar Pdamallu, Monia Michaud, Fujiko Duke, Ashlee M. Earl, Akinyemi I. Ojesina, et al. 2012. "Genomic Analysis Identifies Association of Fusobacterium with Colorectal Carcinoma." *Genome Research* 22 (2): 292–98. <https://doi.org/10.1101/gr.126573.111>.
123. Koukourakis, Michael I., Alexandra Giatromanolaki, Adrian L. Harris, and Efthimios Sivridis. 2006. "Comparison of Metabolic Pathways between Cancer Cells and Stromal Cells in Colorectal Carcinomas: A Metabolic Survival Role for Tumor-Associated Stroma." *Cancer Research* 66 (2): 632–37. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3260>.
124. Kumar, Nagi B., Julio Pow-Sang, Kathleen M. Egan, Philippe E. Spiess, Shohreh Dickinson, Raoul Salup, Mohamed Helal, et al. 2015. "Randomized, Placebo-Controlled Trial of Green Tea Catechins for Prostate Cancer Prevention." *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)* 8 (10): 879–87. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0324>.
125. Kunzmann, Andrew T., Helen G. Coleman, Wen-Yi Huang, Cari M. Kitahara, Marie M. Cantwell, and Sonja I. Berndt. 2015. "Dietary Fiber Intake and Risk of Colorectal Cancer and Incident and Recurrent Adenoma in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial." *The American Journal of Clinical Nutrition* 102 (4): 881–90. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.113282>.
126. Lagier, Jean-Christophe, Saber Khelaifia, Maryam Tidjani Alou, Sokhna Ndongo, Niokhor Dione, Perrine Hugon, Aurelia Caputo, et al. 2016. "Culture of Previously Uncultured Members of the Human Gut Microbiota by Culturomics." *Nature Microbiology* 1 (November): 16203. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.203>.
127. Langhorst, Jost, Sigrid Elsenbruch, Julia Koelzer, Andreas Rueffer, Andreas Michalsen, and Gustav J. Dobos. 2008. "Noninvasive Markers in the Assessment of Intestinal Inflammation in Inflammatory Bowel Diseases: Performance of Fecal Lactoferrin, Calprotectin, and PMN-Elastase, CRP, and Clinical Indices." *The American Journal of Gastroenterology* 103 (1): 162–69. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01556.x>.
128. Larsen, Nadja, Finn K. Vogensen, Frans W. J. van den Berg, Dennis Sandris Nielsen, Anne Sofie Andreasen, Bente K. Pedersen, Waleed Abu Al-Soud, Søren J. Sørensen, Lars H. Hansen, and Mogens Jakobsen. 2010. "Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults." *PLOS ONE* 5 (2): e9085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009085>.
129. Larsson, Jessica M. Holmn, Hasse Karlsson, Jessica Gråberg Crespo, Malin E. V. Johansson, Lisbeth Eklund, Henrik Sjövall, and Gunnar C. Hansson. 2011. "Altered O-Glycosylation Profile of MUC2 Mucin Occurs in Active Ulcerative Colitis and Is Associated with Increased Inflammation." *Inflammatory Bowel Diseases* 17 (11): 2299–2307. <https://doi.org/10.1002/ibd.21625>.
130. Leitch, E. Carol McWilliam, Alan W. Walker, Sylvia H. Duncan, Grietje Holtrop, and Harry J. Flint. 2007. "Selective Colonization of Insoluble Substrates by Human Faecal Bacteria." *Environmental Microbiology* 9 (3): 667–79. <https://doi.org/10.1111/j.1462->

2920.2006.01186.x.

131. Leone, Serena, Antonio Molinaro, Enrica Pessione, Roberto Mazzoli, Carlo Giunta, Luisa Sturiale, Domenico Garozzo, Rosa Lanzetta, and Michelangelo Parrilli. 2006. "Structural Elucidation of the Core-Lipid A Backbone from the Lipopolysaccharide of *Acinetobacter Radioresistens* S13, an Organic Solvent Tolerant Gram-Negative Bacterium." *Carbohydrate Research* 341 (5): 582–90. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.01.016>.
132. Ley, Ruth E., Peter J. Turnbaugh, Samuel Klein, and Jeffrey I. Gordon. 2006. "Microbial Ecology: Human Gut Microbes Associated with Obesity." *Nature* 444 (7122): 1022–23. <https://doi.org/10.1038/4441022a>.
133. Li, Cheng-Chung, Yu-Chen Hou, Chiu-Li Yeh, and Sung-Ling Yeh. 2014. "Effects of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid on Prostate Cancer Cell Migration and Invasion Induced by Tumor-Associated Macrophages." *PLoS One* 9 (6): e99630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099630>.
134. Li, Hui, Lois Myeroff, Dominic Smiraglia, Michael F. Romero, Theresa P. Pretlow, Lakshmi Kasturi, James Lutterbaugh, et al. 2003. "SLC5A8, a Sodium Transporter, Is a Tumor Suppressor Gene Silenced by Methylation in Human Colon Aberrant Crypt Foci and Cancers." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (14): 8412–17. <https://doi.org/10.1073/pnas.1430846100>.
135. Li, Kelvin, Monika Bihan, Shibu Yooseph, and Barbara A. Methé. 2012. "Analyses of the Microbial Diversity across the Human Microbiome." *PLOS ONE* 7 (6): e32118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032118>.
136. Li, Tiange, Yue Zhang, Jiajia Song, Lijun Chen, Min Du, and Xueying Mao. 2022. "Yogurt Enriched with Inulin Ameliorated Reproductive Functions and Regulated Gut Microbiota in Dehydroepiandrosterone-Induced Polycystic Ovary Syndrome Mice." *Nutrients* 14 (2): 279. <https://doi.org/10.3390/nu14020279>.
137. Lin, Hsi-Hsun, Shiao-Ping Huang, Hui-Chun Hsieh, Colin S. Chen, and Ya-Lei Chen. 2007. "Performance Characteristics of the *Limulus* Amebocyte Lysate Assay and Gas Chromatography-Mass Spectrum Analysis of Lipopolysaccharides Relative to Nitric Oxide Production by Peritoneal Exudates of Cells." *Journal of Hazardous Materials* 145 (3): 431–36. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.11.043>.
138. Liss Michael A., Al-Bayati Osamah, Gelfond Jonathan, Goros Martin, Ullevig Sarah, DiGiovanni John, Hamilton-Reeves Jill, O'Keefe Denise, Bacich Dean, Weaver Brandi, Leach Robin, Thompson Ian M. 2019. "Higher baseline dietary fat and fatty acid intake is associated with increased risk of incident prostate cancer in the SABOR study." *Cancer Prostatic Dis* 22(2):244-251. doi: 10.1038/s41391-018-0105-2.
139. Liu, Jun-Li, Irina Segovia, Xiao-Lin Yuan, and Zu-Hua Gao. 2020. "Controversial Roles of Gut Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids (SCFAs) on Pancreatic  $\beta$ -Cell Growth and Insulin Secretion." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (3): E910. <https://doi.org/10.3390/ijms21030910>.
140. Liu, Pinyi, Yanbing Wang, Ge Yang, Qihe Zhang, Lingbin Meng, Ying Xin, and Xin Jiang. 2021. "The Role of Short-Chain Fatty Acids in Intestinal Barrier Function, Inflammation, Oxidative Stress, and Colonic Carcinogenesis." *Pharmacological Research* 165 (March): 105420. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105420>.
141. Louis, Petra, Georgina L. Hold, and Harry J. Flint. 2014. "The Gut Microbiota, Bacterial Metabolites and Colorectal Cancer." *Nature Reviews Microbiology* 12 (10): 661–72. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3344>.

142. Macfarlane, S., G. T. Macfarlane, and J. H. Cummings. 2006. "Review Article: Prebiotics in the Gastrointestinal Tract." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 24 (5): 701–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.03042.x>.
143. Macfarlane, Sandra, and George T. Macfarlane. 2003. "Regulation of Short-Chain Fatty Acid Production." *The Proceedings of the Nutrition Society* 62 (1): 67–72. <https://doi.org/10.1079/PNS2002207>.
144. Machiels, Kathleen, Marie Joossens, João Sabino, Vicky De Preter, Ingrid Arijs, Venessa Eeckhaut, Vera Ballet, et al. 2014. "A Decrease of the Butyrate-Producing Species *Roseburia Hominis* and *Faecalibacterium Prausnitzii* Defines Dysbiosis in Patients with Ulcerative Colitis." *Gut* 63 (8): 1275–83. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-304833>.
145. Macpherson, A. J., M. M. Martinic, and N. Harris. 2002. "The Functions of Mucosal T Cells in Containing the Indigenous Commensal Flora of the Intestine." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 59 (12): 2088–96. <https://doi.org/10.1007/s000180200009>.
146. Maeshima, Nina, and Rachel C. Fernandez. 2013. "Recognition of Lipid A Variants by the TLR4-MD-2 Receptor Complex." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3: 3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00003>.
147. Mahowald, Michael A., Federico E. Rey, Henning Seedorf, Peter J. Turnbaugh, Robert S. Fulton, Aye Wollam, Neha Shah, et al. 2009. "Characterizing a Model Human Gut Microbiota Composed of Members of Its Two Dominant Bacterial Phyla." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (14): 5859–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901529106>.
148. Major, Jacqueline M., Amanda J. Cross, Joanne L. Watters, Albert R. Hollenbeck, Barry I. Graubard, and Rashmi Sinha. 2011. "Patterns of Meat Intake and Risk of Prostate Cancer among African-Americans in a Large Prospective Study." *Cancer Causes & Control: CCC* 22 (12): 1691–98. <https://doi.org/10.1007/s10552-011-9845-1>.
149. Mandir, Nikki, Hans Englyst, and Robert A. Goodlad. 2008. "Resistant Carbohydrates Stimulate Cell Proliferation and Crypt Fission in Wild-Type Mice and in the *Apc*(Min/+) Mouse Model of Intestinal Cancer, Association with Enhanced Polyp Development." *The British Journal of Nutrition* 100 (4): 711–21. <https://doi.org/10.1017/S0007114508901276>.
150. Mangifesta, Marta, Leonardo Mancabelli, Christian Milani, Federica Gaiani, Nicola de'Angelis, Gian de'Angelis, Douwe Van Sinderen, Marco Ventura, and Francesca Turrone. 2018. "Mucosal Microbiota of Intestinal Polyps Reveals Putative Biomarkers of Colorectal Cancer." *Scientific Reports* 8 (September). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32413-2>.
151. Martín, Rebeca, Celia Chamignon, Nadia Mhedbi-Hajri, Florian Chain, Muriel Derrien, Unai Escribano-Vázquez, Peggy Garault, et al. 2019. "The Potential Probiotic *Lactobacillus Rhamnosus* CNCM I-3690 Strain Protects the Intestinal Barrier by Stimulating Both Mucus Production and Cytoprotective Response." *Scientific Reports* 9 (1): 5398. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41738-5>.
152. Martyniak, Adrian, Aleksandra Medyńska-Przęczek, Andrzej Wędrychowicz, Szymon Skoczeń, and Przemysław J. Tomasik. 2021. "Prebiotics, Probiotics, Synbiotics, Paraprobiotics and Postbiotic Compounds in IBD." *Biomolecules* 11 (12): 1903. <https://doi.org/10.3390/biom11121903>.
153. Maslowski, Kendle M., Angelica T. Vieira, Aylwin Ng, Jan Kranich, Frederic Sierro, Di Yu, Heidi C. Schilter, et al. 2009. "Regulation of Inflammatory Responses by Gut Microbiota and Chemoattractant Receptor GPR43." *Nature* 461 (7268): 1282–86. <https://doi.org/10.1038/nature08530>.



154. Matsushita, Makoto, Kazutoshi Fujita, Takuji Hayashi, Hisako Kayama, Daisuke Motooka, Hiroaki Hase, Kentaro Jingushi, et al. 2021. "Gut Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Promote Prostate Cancer Growth via IGF1 Signaling." *Cancer Research* 81 (15): 4014–26. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-4090>.
155. Matsushita, Makoto, Kazutoshi Fujita, Daisuke Motooka, Koji Hatano, Shota Fukae, Norihiko Kawamura, Eisuke Tomiyama, et al. 2021. "The Gut Microbiota Associated with High-Gleason Prostate Cancer." *Cancer Science* 112 (8): 3125–35. <https://doi.org/10.1111/cas.14998>.
156. Mattsby-Baltzer, I., Z. Mielniczuk, L. Larsson, K. Lindgren, and S. Goodwin. 1992. "Lipid A in Helicobacter Pylori." *Infection and Immunity* 60 (10): 4383–87. <https://doi.org/10.1128/iai.60.10.4383-4387.1992>.
157. McOrist, Alexandra L., Rosalind B. Miller, Anthony R. Bird, Jennifer B. Keogh, Manny Noakes, David L. Topping, and Michael A. Conlon. 2011. "Fecal Butyrate Levels Vary Widely among Individuals but Are Usually Increased by a Diet High in Resistant Starch." *The Journal of Nutrition* 141 (5): 883–89. <https://doi.org/10.3945/jn.110.128504>.
158. Mehta, Raaj S., Galeb S. Abu-Ali, David A. Drew, Jason Lloyd-Price, Ayshwarya Subramanian, Paul Lochhead, Amit D. Joshi, et al. 2018. "Stability of the Human Faecal Microbiome in a Cohort of Adult Men." *Nature Microbiology* 3 (3): 347–55. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0096-0>.
159. Melnik, Alexey, Pieter Dorrestein, Ricardo Silva, Embriette Hyde, Alexander Aksenov, Fernando Vargas, Amina Bouslimani, et al. 2017. "Coupling Targeted and Untargeted Mass Spectrometry for Metabolome-Microbiome-Wide Association Studies of Human Fecal Samples." *Analytical Chemistry* 89 (June). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01381>.
160. Meyer, D., and M. Stasse-Wolthuis. 2009. "The Bifidogenic Effect of Inulin and Oligofructose and Its Consequences for Gut Health." *European Journal of Clinical Nutrition* 63 (11): 1277–89. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2009.64>.
161. Molinaro, Antonio, Otto Holst, Flaviana Di Lorenzo, Maire Callaghan, Alessandra Nurisso, Gerardino D'Errico, Alla Zamyatina, et al. 2015. "Chemistry of Lipid A: At the Heart of Innate Immunity." *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 21 (2): 500–519. <https://doi.org/10.1002/chem.201403923>.
162. Momen-Heravi, Fatemeh, Ana Babic, Shelley S. Tworoger, Libin Zhang, Kana Wu, Stephanie A. Smith-Warner, Shuji Ogino, et al. 2017. "Periodontal Disease, Tooth Loss and Colorectal Cancer Risk: Results from the Nurses' Health Study." *International Journal of Cancer* 140 (3): 646–52. <https://doi.org/10.1002/ijc.30486>.
163. Moore, Patrick S., and Yuan Chang. 2010. "Why Do Viruses Cause Cancer? Highlights of the First Century of Human Tumour Virology." *Nature Reviews. Cancer* 10 (12): 878–89. <https://doi.org/10.1038/nrc2961>.
164. Moran, A. P., B. Lindner, and E. J. Walsh. 1997. "Structural Characterization of the Lipid A Component of Helicobacter Pylori Rough- and Smooth-Form Lipopolysaccharides." *Journal of Bacteriology* 179 (20): 6453–63. <https://doi.org/10.1128/jb.179.20.6453-6463.1997>.
165. Mukhopadhyaya, Indrani, Sarah Morais, Jenny Laverde-Gomez, Paul O. Sheridan, Alan W. Walker, William Kelly, Athol V. Klieve, et al. 2018. "Sporulation Capability and Amylosome Conservation among Diverse Human Colonic and Rumen Isolates of the Keystone Starch-Degrader Ruminococcus Bromii." *Environmental Microbiology* 20 (1): 324–36. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14000>.
166. Munford, Robert S., and Alan W. Varley. 2006. "Shield as Signal: Lipopolysaccharides and

- the Evolution of Immunity to Gram-Negative Bacteria." *PLOS Pathogens* 2 (6): e67. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020067>.
167. Murphy, Neil, Teresa Norat, Pietro Ferrari, Mazda Jenab, Bas Bueno-de-Mesquita, Guri Skeie, Christina C. Dahm, et al. 2012. "Dietary Fibre Intake and Risks of Cancers of the Colon and Rectum in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)." *PloS One* 7 (6): e39361. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039361>.
  168. Nagy-Szakal, Dorottya, Emily B. Hollister, Ruth Ann Luna, Reka Szigeti, Nina Tatevian, C. Wayne Smith, James Versalovic, and Richard Kellermayer. 2013. "Cellulose Supplementation Early in Life Ameliorates Colitis in Adult Mice." *PloS One* 8 (2): e56685. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056685>.
  169. Nakai, Yasutomo, and Norio Nonomura. 2013. "Inflammation and Prostate Carcinogenesis." *International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association* 20 (2): 150–60. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2012.03101.x>.
  170. Nastasi, Claudia, Marco Candela, Charlotte Menné Bonefeld, Carsten Geisler, Morten Hansen, Thorbjørn Krejsgaard, Elena Biagi, et al. 2015. "The Effect of Short-Chain Fatty Acids on Human Monocyte-Derived Dendritic Cells." *Scientific Reports* 5 (November): 16148. <https://doi.org/10.1038/srep16148>.
  171. Neish, Andrew S. 2009. "Microbes in Gastrointestinal Health and Disease." *Gastroenterology* 136 (1): 65–80. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.080>.
  172. Nguyen, Thi Loan Anh, Sara Vieira-Silva, Adrian Liston, and Jeroen Raes. 2015. "How Informative Is the Mouse for Human Gut Microbiota Research?" *Disease Models & Mechanisms* 8 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1242/dmm.017400>.
  173. Ni, Yun-Feng, Jian Wang, Xiao-Long Yan, Feng Tian, Jin-Bo Zhao, Yun-Jie Wang, and Tao Jiang. 2010. "Histone Deacetylase Inhibitor, Butyrate, Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice." *Respiratory Research* 11 (March): 33. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-11-33>.
  174. Oh, Hyeon Jeong, Jung Ho Kim, Jeong Mo Bae, Hyun Jung Kim, Nam-Yun Cho, and Gyeong Hoon Kang. 2019. "Prognostic Impact of Fusobacterium Nucleatum Depends on Combined Tumor Location and Microsatellite Instability Status in Stage II/III Colorectal Cancers Treated with Adjuvant Chemotherapy." *Journal of Pathology and Translational Medicine* 53 (1): 40–49. <https://doi.org/10.4132/jptm.2018.11.29>.
  175. Ohto, Umeharu, Koichi Fukase, Kensuke Miyake, and Yoshinori Satow. 2007. "Crystal Structures of Human MD-2 and Its Complex with Antiendotoxic Lipid IVA." *Science (New York, N.Y.)* 316 (5831): 1632–34. <https://doi.org/10.1126/science.1139111>.
  176. Oliva, Marc, Nuria Mulet-Margalef, Maria Ochoa-De-Olza, Stefania Napoli, Joan Mas, Berta Laquente, Laia Alemany, Eric J. Duell, Paolo Nuciforo, and Victor Moreno. 2021. "Tumor-Associated Microbiome: Where Do We Stand?" *International Journal of Molecular Sciences* 22 (3): 1446. <https://doi.org/10.3390/ijms22031446>.
  177. Olmo, N., J. Turnay, P. Pérez-Ramos, E. Lecona, J. I. Barrasa, I. López de Silanes, and M. A. Lizarbe. 2007. "In Vitro Models for the Study of the Effect of Butyrate on Human Colon Adenocarcinoma Cells." *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 21 (2): 262–70. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.09.011>.
  178. Pais de Barros, Jean-Paul, Thomas Gautier, Wahib Sali, Christophe Adrie, Hélène Choubley, Emilie Charron, Caroline Lalande, et al. 2015. "Quantitative Lipopolysaccharide Analysis Using HPLC/MS/MS and Its Combination with the Limulus Amebocyte Lysate Assay." *Journal of Lipid Research* 56 (7): 1363–69. <https://doi.org/10.1194/jlr.D059725>.

179. Pajtasz-Piasecka, E., A. Szyda, J. Rossowska, A. Krawczenko, M. Indrová, P. Grabarczyk, P. Wysocki, A. Mackiewicz, and D. Duś. 2004. "Loss of Tumorigenicity of Murine Colon Carcinoma MC38/0 Cell Line after Transduction with a Retroviral Vector Carrying Murine IL-12 Genes." *Folia Biologica* 50 (1): 7–14.
180. Parada Venegas, Daniela, Marjorie K. De la Fuente, Glauben Landskron, María Julieta González, Rodrigo Quera, Gerard Dijkstra, Hermie J. M. Harmsen, Klaas Nico Faber, and Marcela A. Hermoso. 2019. "Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases." *Frontiers in Immunology* 10: 277. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00277>.
181. Park, J., M. Kim, S. G. Kang, A. H. Jannasch, B. Cooper, J. Patterson, and C. H. Kim. 2015. "Short-Chain Fatty Acids Induce Both Effector and Regulatory T Cells by Suppression of Histone Deacetylases and Regulation of the MTOR-S6K Pathway." *Mucosal Immunology* 8 (1): 80–93. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.44>.
182. Paroder, Viktoriya, Shelly R. Spencer, Monika Paroder, Diego Arango, Simo Schwartz, John M. Mariadason, Leonard H. Augenlicht, Sepehr Eskandari, and Nancy Carrasco. 2006. "Na<sup>+</sup>/Monocarboxylate Transport (SMCT) Protein Expression Correlates with Survival in Colon Cancer: Molecular Characterization of SMCT." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (19): 7270–75. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602365103>.
183. Parracho, Helena M. R. T., Max O. Bingham, Glenn R. Gibson, and Anne L. McCartney. 2005. "Differences between the Gut Microflora of Children with Autistic Spectrum Disorders and That of Healthy Children." *Journal of Medical Microbiology* 54 (Pt 10): 987–91. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46101-0>.
184. Peek, Richard M., and Martin J. Blaser. 2002. "Helicobacter Pylori and Gastrointestinal Tract Adenocarcinomas." *Nature Reviews. Cancer* 2 (1): 28–37. <https://doi.org/10.1038/nrc703>.
185. Petersson, J., O. Schreiber, G. C. Hansson, S. J. Gendler, A. Velcich, J. O. Lundberg, S. Roos, L. Holm, and M. Phillipson. 2011. "Importance and Regulation of the Colonic Mucus Barrier in a Mouse Model of Colitis." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 300 (2): G327-333. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00422.2010>.
186. Petrelli, Fausto, Gianluca Tomasello, Karen Borgonovo, Michele Ghidini, Luca Turati, Pierpaolo Dallera, Rodolfo Passalacqua, Giovanni Sgroi, and Sandro Barni. 2017. "Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis." *JAMA Oncology* 3 (2): 211–19. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.4227>.
187. Pier, Gerald B. 2007. "Pseudomonas Aeruginosa Lipopolysaccharide: A Major Virulence Factor, Initiator of Inflammation and Target for Effective Immunity." *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* 297 (5): 277–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.012>.
188. Pinheiro, Céline, Adhemar Longatto-Filho, Cristovam Scapulatempo, Luísa Ferreira, Sandra Martins, Luc Pellerin, Mesquita Rodrigues, Venancio A. F. Alves, Fernando Schmitt, and Fátima Baltazar. 2008. "Increased Expression of Monocarboxylate Transporters 1, 2, and 4 in Colorectal Carcinomas." *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 452 (2): 139–46. <https://doi.org/10.1007/s00428-007-0558-5>.
189. Pluznick, Jennifer. 2014. "A Novel SCFA Receptor, the Microbiota, and Blood Pressure Regulation." *Gut Microbes* 5 (2): 202–7. <https://doi.org/10.4161/gmic.27492>.
190. Poore, Gregory D., Evguenia Kopylova, Qiyun Zhu, Carolina Carpenter, Serena Fraraccio,

- Stephen Wandro, Tomasz Kosciolk, et al. 2020. "Microbiome Analyses of Blood and Tissues Suggest Cancer Diagnostic Approach." *Nature* 579 (7800): 567–74. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2095-1>.
191. Poutahidis, Theofilos, Kelsey Cappelle, Tatiana Levkovich-Urman, Chung-Wei Lee, Michael Douberis, Zhongming Ge, James Fox, Bruce Horwitz, and Susan Erdman. 2013. "Pathogenic Intestinal Bacteria Enhance Prostate Cancer Development via Systemic Activation of Immune Cells in Mice." *PloS One* 8 (August): e73933. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073933>.
  192. Primec, Maša, Dušanka Mičetić-Turk, and Tomaž Langerholc. 2017. "Analysis of Short-Chain Fatty Acids in Human Feces: A Scoping Review." *Analytical Biochemistry* 526 (June): 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.03.007>.
  193. Proctor, Lita M., Heather H. Creasy, Jennifer M. Fettweis, Jason Lloyd-Price, Anup Mahurkar, Wenyu Zhou, Gregory A. Buck, et al. 2019. "The Integrative Human Microbiome Project." *Nature* 569 (7758): 641–48. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1238-8>.
  194. Purcell, Rachel V., John Pearson, Alan Aitchison, Liane Dixon, Frank A. Frizelle, and Jacqueline I. Keenan. 2017. "Colonization with Enterotoxigenic *Bacteroides Fragilis* Is Associated with Early-Stage Colorectal Neoplasia." *PLoS ONE* 12 (2): e0171602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171602>.
  195. Raetz, Christian R. H., C. Michael Reynolds, M. Stephen Trent, and Russell E. Bishop. 2007. "Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria." *Annual Review of Biochemistry* 76: 295–329. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803>.
  196. Raetz, Christian R. H., and Chris Whitfield. 2002. "Lipopolysaccharide Endotoxins." *Annual Review of Biochemistry* 71: 635–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>.
  197. Rakoff-Nahoum, Seth, Justin Paglino, Fatima Eslami-Varzaneh, Stephen Edberg, and Ruslan Medzhitov. 2004. "Recognition of Commensal Microflora by Toll-like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis." *Cell* 118 (2): 229–41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.002>.
  198. Ramirez-Farias, Carlett, Kathleen Slezak, Zoë Fuller, Alan Duncan, Grietje Holtrop, and Petra Louis. 2009. "Effect of Inulin on the Human Gut Microbiota: Stimulation of *Bifidobacterium Adolescentis* and *Faecalibacterium Prausnitzii*." *The British Journal of Nutrition* 101 (4): 541–50. <https://doi.org/10.1017/S0007114508019880>.
  199. Ranjan, Ravi, Asha Rani, Ahmed Metwally, Halvor S. McGee, and David L. Perkins. 2016. "Analysis of the Microbiome: Advantages of Whole Genome Shotgun versus 16S Amplicon Sequencing." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 469 (4): 967–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.083>.
  200. Ratajczak, Weronika, Aleksandra Rył, Arnold Mizerski, Kinga Walczakiewicz, Olimpia Sipak, and Maria Laszczyńska. 2019. "Immunomodulatory Potential of Gut Microbiome-Derived Short-Chain Fatty Acids (SCFAs)." *Acta Biochimica Polonica* 66 (1): 1–12. [https://doi.org/10.18388/abp.2018\\_2648](https://doi.org/10.18388/abp.2018_2648).
  201. Ratledge C. and Wilkinson S. G., 1988, Microbial lipids. *Academic Press*. DOI:10.1002/9783527620890.ch4
  202. Reichardt, Nicole, Sylvia H. Duncan, Pauline Young, Alvaro Belenguer, Carol McWilliam Leitch, Karen P. Scott, Harry J. Flint, and Petra Louis. 2014. "Phylogenetic Distribution of Three Pathways for Propionate Production within the Human Gut Microbiota." *The ISME Journal* 8 (6): 1323–35. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.14>.

203. Rezasoltani, Sama, Dorrieh Ahmadi Bashirzadeh, Ehsan Nazemalhosseini Mojarad, Hamid Asadzadeh Aghdaei, Mohsen Norouzinia, and Shabnam Shahrokh. 2020. "Signature of Gut Microbiome by Conventional and Advanced Analysis Techniques: Advantages and Disadvantages." *Middle East Journal of Digestive Diseases* 12 (1): 5–11. <https://doi.org/10.15171/mejdd.2020.157>.
204. Richman, Erin L., Stacey A. Kenfield, Meir J. Stampfer, Edward L. Giovannucci, Steven H. Zeisel, Walter C. Willett, and June M. Chan. 2012. "Choline Intake and Risk of Lethal Prostate Cancer: Incidence and Survival." *The American Journal of Clinical Nutrition* 96 (4): 855–63. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.039784>.
205. Roberfroid, Marcel B. 2007. "Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients." *The Journal of Nutrition* 137 (11 Suppl): 2493S-2502S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.11.2493S>.
206. Robert, Céline, and Annick Bernalier-Donadille. 2003. "The Cellulolytic Microflora of the Human Colon: Evidence of Microcrystalline Cellulose-Degrading Bacteria in Methane-Excreting Subjects." *FEMS Microbiology Ecology* 46 (1): 81–89. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00207-1](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00207-1).
207. Round, June L., and Sarkis K. Mazmanian. 2009. "The Gut Microbiome Shapes Intestinal Immune Responses during Health and Disease." *Nature Reviews. Immunology* 9 (5): 313–23. <https://doi.org/10.1038/nri2515>.
208. Round, June L., and Sarkis K. Mazmanian. 2010. "Inducible Foxp3+ Regulatory T-Cell Development by a Commensal Bacterium of the Intestinal Microbiota." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (27): 12204–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909122107>.
209. Rowland, Ian, Glenn Gibson, Almut Heinken, Karen Scott, Jonathan Swann, Ines Thiele, and Kieran Tuohy. 2018. "Gut Microbiota Functions: Metabolism of Nutrients and Other Food Components." *European Journal of Nutrition* 57 (1): 1–24. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8>.
210. Salcedo, Rosalba, Andrea Worschech, Marco Cardone, Yava Jones, Zsofia Gyulai, Ren-Ming Dai, Ena Wang, et al. 2010. "MyD88-Mediated Signaling Prevents Development of Adenocarcinomas of the Colon: Role of Interleukin 18." *The Journal of Experimental Medicine* 207 (8): 1625–36. <https://doi.org/10.1084/jem.20100199>.
211. San-Millán, Iñigo, and George A. Brooks. 2017. "Reexamining Cancer Metabolism: Lactate Production for Carcinogenesis Could Be the Purpose and Explanation of the Warburg Effect." *Carcinogenesis* 38 (2): 119–33. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw127>.
212. Scardovi, V. 1965. "The Fructose-6-Phosphate Shunt as a Peculiar Pattern of Hexose Degradation in the Genus Bifidobacterium." *Ann Microbiol Enzymol* 15: 19–29.
213. Schnorr, Stephanie L., Marco Candela, Simone Rampelli, Manuela Centanni, Clarissa Consolandi, Giulia Basaglia, Silvia Turrone, et al. 2014. "Gut Microbiome of the Hadza Hunter-Gatherers." *Nature Communications* 5 (April): 3654. <https://doi.org/10.1038/ncomms4654>.
214. Sekirov, Inna, Shannon L. Russell, L. Caetano M. Antunes, and B. Brett Finlay. 2010. "Gut Microbiota in Health and Disease." *Physiological Reviews* 90 (3): 859–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>.
215. Serpa, Jacinta, Francisco Caiado, Tânia Carvalho, Cheila Torre, Luís G. Gonçalves, Cristina Casalou, Pedro Lamosa, et al. 2010. "Butyrate-Rich Colonic Microenvironment Is a Relevant Selection Factor for Metabolically Adapted Tumor Cells." *Journal of Biological Chemistry*

- 285 (50): 39211–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.156026>.
216. Shah, Manasi S., Todd Z. DeSantis, Thomas Weinmaier, Paul J. McMurdie, Julia L. Cope, Adam Altrichter, Jose-Miguel Yamal, and Emily B. Hollister. 2018. "Leveraging Sequence-Based Faecal Microbial Community Survey Data to Identify a Composite Biomarker for Colorectal Cancer." *Gut* 67 (5): 882–91. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313189>.
217. Shan, Meimei, Maurizio Gentile, John R. Yeiser, A. Cooper Walland, Victor U. Bornstein, Kang Chen, Bing He, et al. 2013. "Mucus Enhances Gut Homeostasis and Oral Tolerance by Delivering Immunoregulatory Signals." *Science (New York, N.Y.)* 342 (6157): 447–53. <https://doi.org/10.1126/science.1237910>.
218. Shin, Na-Ri, June-Chul Lee, Hae-Youn Lee, Min-Soo Kim, Tae Woong Whon, Myung-Shik Lee, and Jin-Woo Bae. 2014. "An Increase in the Akkermansia Spp. Population Induced by Metformin Treatment Improves Glucose Homeostasis in Diet-Induced Obese Mice." *Gut* 63 (5): 727–35. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303839>.
219. Shoham, Y., R. Lamed, and E. A. Bayer. 1999. "The Cellulosome Concept as an Efficient Microbial Strategy for the Degradation of Insoluble Polysaccharides." *Trends in Microbiology* 7 (7): 275–81. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(99\)01533-4](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(99)01533-4).
220. Singh, Nagendra, Ashish Gurav, Sathish Sivaprakasam, Evan Brady, Ravi Padia, Huidong Shi, Muthusamy Thangaraju, et al. 2014. "Activation of Gpr109a, Receptor for Niacin and the Commensal Metabolite Butyrate, Suppresses Colonic Inflammation and Carcinogenesis." *Immunity* 40 (1): 128–39. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.007>.
221. Sivaprakasam, S., A. Gurav, A. V. Paschall, G. L. Coe, K. Chaudhary, Y. Cai, R. Kolhe, et al. 2016. "An Essential Role of Ffar2 (Gpr43) in Dietary Fibre-Mediated Promotion of Healthy Composition of Gut Microbiota and Suppression of Intestinal Carcinogenesis." *Oncogenesis* 5 (6): e238. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2016.38>.
222. Skrzydło-Radomańska, Barbara, Beata Prozorow-Król, Halina Cichoż-Lach, Emilia Majsiak, Joanna B. Bierła, Wojciech Kosikowski, Mariusz Szczerbiński, Jesper Gantzel, and Bożena Cukrowska. 2020. "The Effectiveness of Synbiotic Preparation Containing Lactobacillus and Bifidobacterium Probiotic Strains and Short Chain Fructooligosaccharides in Patients with Diarrhea Predominant Irritable Bowel Syndrome-A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled Study." *Nutrients* 12 (7): E1999. <https://doi.org/10.3390/nu12071999>.
223. Śliżewska, Katarzyna, Paulina Markowiak-Kopeć, and Weronika Śliżewska. 2020. "The Role of Probiotics in Cancer Prevention." *Cancers* 13 (1): 20. <https://doi.org/10.3390/cancers13010020>.
224. Sluis, Maria, Barbara Koning, Adrianus Bruijn, Anna Velcich, Jules Meijerink, Johannes Goudoever, Hans Büller, et al. 2006. "Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection." *Gastroenterology* 131 (July): 117–29. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.04.020>.
225. Smith, Patrick M., Michael R. Howitt, Nicolai Panikov, Monia Michaud, Carey Ann Gallini, Mohammad Bohlooly-Y, Jonathan N. Glickman, and Wendy S. Garrett. 2013. "The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis." *Science (New York, N.Y.)* 341 (6145): 569–73. <https://doi.org/10.1126/science.1241165>.
226. So, Daniel, Kevin Whelan, Megan Rossi, Mark Morrison, Gerald Holtmann, Jaimon T. Kelly, Erin R. Shanahan, Heidi M. Staudacher, and Katrina L. Campbell. 2018. "Dietary Fiber Intervention on Gut Microbiota Composition in Healthy Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis." *The American Journal of Clinical Nutrition* 107 (6): 965–83. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy041>.

227. Song, Jaehwi, Ji Heon Noh, Jong Heun Lee, Jung Woo Eun, Young Min Ahn, Su Young Kim, Sug Hyung Lee, et al. 2005. "Increased Expression of Histone Deacetylase 2 Is Found in Human Gastric Cancer." *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 113 (4): 264–68. [https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2005.apm\\_04.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2005.apm_04.x).
228. Song, Mingyang, Andrew T. Chan, and Jun Sun. 2020. "Influence of the Gut Microbiome, Diet, and Environment on Risk of Colorectal Cancer." *Gastroenterology* 158 (2): 322–40. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.06.048>.
229. Stearns-Kurosawa, Deborah J., Marcin F. Osuchowski, Catherine Valentine, Shinichiro Kurosawa, and Daniel G. Remick. 2011. "The Pathogenesis of Sepsis." *Annual Review of Pathology* 6: 19–48. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130327>.
230. Steimle, Alex, Ingo B. Autenrieth, and Julia-Stefanie Frick. 2016. "Structure and Function: Lipid A Modifications in Commensals and Pathogens." *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* 306 (5): 290–301. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.03.001>.
231. Stempelj, Mateja, Michele Kedinger, Leonard Augenlicht, and Lidija Klampfer. 2007. "Essential Role of the JAK/STAT1 Signaling Pathway in the Expression of Inducible Nitric-Oxide Synthase in Intestinal Epithelial Cells and Its Regulation by Butyrate." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (13): 9797–9804. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609426200>.
232. Strasner, Amy, and Michael Karin. 2015. "Immune Infiltration and Prostate Cancer." *Frontiers in Oncology* 5: 128. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00128>.
233. Sun, Mingming, Wei Wu, Zhanju Liu, and Yingzi Cong. 2017. "Microbiota Metabolite Short Chain Fatty Acids, GPCR, and Inflammatory Bowel Diseases." *Journal of Gastroenterology* 52 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00535-016-1242-9>.
234. Świątecka, Dominika, Świątecka Dominika, Arjan Narbad, Narbad Arjan, Karyn P. Ridgway, Ridgway P. Karyn, Henryk Kostyra, and Kostyra Henryk. 2011. "The Study on the Impact of Glycated Pea Proteins on Human Intestinal Bacteria." *International Journal of Food Microbiology* 145 (1): 267–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.002>.
235. Szponar, Bogumila, Elisabeth Norin, Tore Midtvedt, and Lennart Larsson. 2002. "Limitations in the Use of 3-Hydroxy Fatty Acid Analysis to Determine Endotoxin in Mammalian Samples." *Journal of Microbiological Methods* 50 (3): 283–89. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(02\)00038-6](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(02)00038-6).
236. Tan, Hwee Tong, Sandra Tan, Qingsong Lin, Teck Kwang Lim, Choy Leong Hew, and Maxey C. M. Chung. 2008. "Quantitative and Temporal Proteome Analysis of Butyrate-Treated Colorectal Cancer Cells." *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 7 (6): 1174–85. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700483-MCP200>.
237. Tan, Jian, Craig McKenzie, Maria Potamitis, Alison N. Thorburn, Charles R. Mackay, and Laurence Macia. 2014. "The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease." *Advances in Immunology* 121: 91–119. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9>.
238. Tan, Tze Guan, Esen Sefik, Naama Geva-Zatorsky, Lindsay Kua, Debdut Naskar, Fei Teng, Lesley Pasman, et al. 2016. "Identifying Species of Symbiont Bacteria from the Human Gut That, Alone, Can Induce Intestinal Th17 Cells in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (50): E8141–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617460113>.
239. Tang, Yong, Yakun Chen, Hongmei Jiang, and Daotai Nie. 2011. "The Role of Short-Chain Fatty Acids in Orchestrating Two Types of Programmed Cell Death in Colon Cancer." *Autophagy* 7 (2): 235–37.
240. Tang, Yong, Yakun Chen, Hongmei Jiang, Gregory T. Robbins, and Daotai Nie. 2011. "G-

- Protein-Coupled Receptor for Short-Chain Fatty Acids Suppresses Colon Cancer.” *International Journal of Cancer* 128 (4): 847–56. <https://doi.org/10.1002/ijc.25638>.
241. Tao, Ran, Edwin F. de Zoeten, Engin Ozkaynak, Chunxia Chen, Liqing Wang, Paige M. Porrett, Bin Li, et al. 2007. “Deacetylase Inhibition Promotes the Generation and Function of Regulatory T Cells.” *Nature Medicine* 13 (11): 1299–1307. <https://doi.org/10.1038/nm1652>.
  242. Tazoe, Hideaki, Yasuko Otomo, Shin-Ichiro Karaki, Ikuo Kato, Yasuyuki Fukami, Masaki Terasaki, and Atsukazu Kuwahara. 2009. “Expression of Short-Chain Fatty Acid Receptor GPR41 in the Human Colon.” *Biomedical Research (Tokyo, Japan)* 30 (3): 149–56. <https://doi.org/10.2220/biomedres.30.149>.
  243. Teeling, H., and F. O. Glockner. 2012. “Current Opportunities and Challenges in Microbial Metagenome Analysis--a Bioinformatic Perspective.” *Briefings in Bioinformatics* 13 (6): 728–42. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs039>.
  244. Thangaraju, Muthusamy, Gail A. Cresci, Kebin Liu, Sudha Ananth, Jaya P. Gnanaprakasam, Darren D. Browning, John D. Mellinger, et al. 2009. “GPR109A Is a G-Protein-Coupled Receptor for the Bacterial Fermentation Product Butyrate and Functions as a Tumor Suppressor in Colon.” *Cancer Research* 69 (7): 2826–32. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4466>.
  245. Thangaraju, Muthusamy, Gail Cresci, Shiro Itagaki, John Mellinger, Darren D. Browning, Franklin G. Berger, Puttur D. Prasad, and Vadivel Ganapathy. 2008. “Sodium-Coupled Transport of the Short Chain Fatty Acid Butyrate by SLC5A8 and Its Relevance to Colon Cancer.” *Journal of Gastrointestinal Surgery: Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 12 (10): 1773–81; discussion 1781-1782. <https://doi.org/10.1007/s11605-008-0573-0>.
  246. Tjalsma, Harold, Annemarie Boleij, Julian R. Marchesi, and Bas E. Dutilh. 2012. “A Bacterial Driver-Passenger Model for Colorectal Cancer: Beyond the Usual Suspects.” *Nature Reviews. Microbiology* 10 (8): 575–82. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2819>.
  247. Tolhurst, Gwen, Helen Heffron, Yu Shan Lam, Helen E. Parker, Abdella M. Habib, Eleftheria Diakogiannaki, Jennifer Cameron, Johannes Grosse, Frank Reimann, and Fiona M. Gribble. 2012. “Short-Chain Fatty Acids Stimulate Glucagon-like Peptide-1 Secretion via the G-Protein-Coupled Receptor FFAR2.” *Diabetes* 61 (2): 364–71. <https://doi.org/10.2337/db11-1019>.
  248. Topping, D. L., and P. M. Clifton. 2001. “Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides.” *Physiological Reviews* 81 (3): 1031–64. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1031>.
  249. Tunaru, Sorin, Jukka Kero, Annette Schaub, Christian Wufka, Andree Blaukat, Klaus Pfeffer, and Stefan Offermanns. 2003. “PUMA-G and HM74 Are Receptors for Nicotinic Acid and Mediate Its Anti-Lipolytic Effect.” *Nature Medicine* 9 (3): 352–55. <https://doi.org/10.1038/nm824>.
  250. Turnbaugh, Peter J., Vanessa K. Ridaura, Jeremiah J. Faith, Federico E. Rey, Rob Knight, and Jeffrey I. Gordon. 2009. “The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice.” *Science Translational Medicine* 1 (6): 6ra14. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000322>.
  251. Vaira, D., P. Malfertheiner, F. Megraud, and A. T. Axon. 1999. “Diagnosis of Helicobacter Pylori Infection by HpSA Test. European Helicobacter Pylori HpSA Study Group.” *Lancet (London, England)* 354 (9191): 1732. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)76722-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)76722-2).



252. Vaishnava, Shipra, Cassie Behrendt, Anisa Ismail, Lars Eckmann, and Lora Hooper. 2009. "Paneth Cells Directly Sense Gut Commensals and Maintain Homeostasis at the Intestinal Host-Microbial Interface." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (January): 20858–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808723105>.
253. Vinolo, Marco A. R., Hosana G. Rodrigues, Elaine Hatanaka, Fábio T. Sato, Sandra C. Sampaio, and Rui Curi. 2011. "Suppressive Effect of Short-Chain Fatty Acids on Production of Proinflammatory Mediators by Neutrophils." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 22 (9): 849–55. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.07.009>.
254. Vogtmann, Emily, Xing Hua, Georg Zeller, Shinichi Sunagawa, Anita Y. Voigt, Rajna Hercog, James J. Goedert, Jianxin Shi, Peer Bork, and Rashmi Sinha. 2016. "Colorectal Cancer and the Human Gut Microbiome: Reproducibility with Whole-Genome Shotgun Sequencing." *PLoS One* 11 (5): e0155362. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155362>.
255. Waal, Greta de, Lize Engelbrecht, Tanja Davis, Willem de Villiers, Douglas Kell, and Etheresia Pretorius. 2018. "Correlative Light-Electron Microscopy Detects Lipopolysaccharide and Its Association with Fibrin Fibres in Parkinson's Disease, Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes Mellitus." *Scientific Reports* 8 (November). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35009-y>.
256. Waal, Greta M. de, W. D. de Villiers, T. Forgan, Timothy J. Roberts, and E. Pretorius. 2020. "Colorectal Cancer Is Associated with Increased Circulating Lipopolysaccharide, Inflammation and Hypercoagulability." *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65324-2>.
257. Walker, Alan W., Jennifer Ince, Sylvia H. Duncan, Lucy M. Webster, Grietje Holtrop, Xiaolei Ze, David Brown, et al. 2011. "Dominant and Diet-Responsive Groups of Bacteria within the Human Colonic Microbiota." *The ISME Journal* 5 (2): 220–30. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.118>.
258. Wanders, Desiree, Emily C. Graff, and Robert L. Judd. 2012. "Effects of High Fat Diet on GPR109A and GPR81 Gene Expression." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 425 (2): 278–83. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.082>.
259. Wang, Wei-Lin, Shao-Yan Xu, Zhi-Gang Ren, Liang Tao, Jian-Wen Jiang, and Shu-Sen Zheng. 2015. "Application of Metagenomics in the Human Gut Microbiome." *World Journal of Gastroenterology* 21 (3): 803–14. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i3.803>.
260. Wang, Yanan, Nancy P. Ames, Hein M. Tun, Susan M. Tosh, Peter J. Jones, and Ehsan Khafipour. 2016. "High Molecular Weight Barley  $\beta$ -Glucan Alters Gut Microbiota Toward Reduced Cardiovascular Disease Risk." *Frontiers in Microbiology* 7: 129. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00129>.
261. Wang, Ying, Eric J. Jacobs, Christina C. Newton, and Marjorie L. McCullough. 2016. "Lycopene, Tomato Products and Prostate Cancer-Specific Mortality among Men Diagnosed with Nonmetastatic Prostate Cancer in the Cancer Preventi
262. Watson, Henry, Suparna Mitra, Fiona C. Croden, Morag Taylor, Henry M. Wood, Sarah L. Perry, Jade A. Spencer, et al. 2018. "A Randomised Trial of the Effect of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplements on the Human Intestinal Microbiota." *Gut* 67 (11): 1974–83. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314968>.
263. Weisburger, J. H., B. S. Reddy, T. Narisawa, and E. L. Wynder. 1975. "Germ-Free Status and Colon Tumor Induction by N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 148 (4): 1119–21. <https://doi.org/10.3181/00379727-148-38700>.

264. Willfahrt, Andreas, Erich Steiner, Jonas Hötzel, and Xavier Crispin. 2019. "Printable Acid-Modified Corn Starch as Non-Toxic, Disposable Hydrogel-Polymer Electrolyte in Supercapacitors." *Applied Physics A* 125 (7): 474. <https://doi.org/10.1007/s00339-019-2767-6>.
265. Wolters, Maike, Jenny Ahrens, Marina Romani-Pérez, Claire Watkins, Yolanda Sanz, Alfonso Benítez-Páez, Catherine Stanton, and Kathrin Günther. 2019. "Dietary Fat, the Gut Microbiota, and Metabolic Health – A Systematic Review Conducted within the MyNewGut Project." *Clinical Nutrition* 38 (6): 2504–20. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.12.024>.
266. Wong, Julia M. W., Russell de Souza, Cyril W. C. Kendall, Azadeh Emam, and David J. A. Jenkins. 2006. "Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids." *Journal of Clinical Gastroenterology* 40 (3): 235–43. <https://doi.org/10.1097/00004836-200603000-00015>.
267. Xiao, Min, Yun Gang Liu, Meng Chen Zou, and Fei Zou. 2014. "Sodium Butyrate Induces Apoptosis of Human Colon Cancer Cells by Modulating ERK and Sphingosine Kinase 2." *Biomedical and Environmental Sciences: BES* 27 (3): 197–203. <https://doi.org/10.3967/bes2014.040>.
268. Yan, Hui, and Kolapo M. Ajuwon. 2015. "Mechanism of Butyrate Stimulation of Triglyceride Storage and Adipokine Expression during Adipogenic Differentiation of Porcine Stromovascular Cells." *PLoS One* 10 (12): e0145940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145940>.
269. Yang, Yongzhi, Biswapriya B. Misra, Lei Liang, Dexi Bi, Wenhao Weng, Wen Wu, Sanjun Cai, et al. 2019. "Integrated Microbiome and Metabolome Analysis Reveals a Novel Interplay between Commensal Bacteria and Metabolites in Colorectal Cancer." *Theranostics* 9 (14): 4101–14. <https://doi.org/10.7150/thno.35186>.
270. Yoshida, Naofumi, Tomoya Yamashita, Shigenobu Kishino, Hikaru Watanabe, Kengo Sasaki, Daisuke Sasaki, Tokiko Tabata, et al. 2020. "A Possible Beneficial Effect of Bacteroides on Faecal Lipopolysaccharide Activity and Cardiovascular Diseases." *Scientific Reports* 10 (1): 13009. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69983-z>.
271. Zagato, Elena, Chiara Pozzi, Alice Bertocchi, Tiziana Schioppa, Fabiana Saccheri, Silvia Guglietta, Bruno Fosso, et al. 2020. "Endogenous Murine Microbiota Member Faecalibaculum Rodentium and Its Human Homologue Protect from Intestinal Tumour Growth." *Nature Microbiology* 5 (3): 511–24. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0649-5>.
272. Zarrinpar, Amir, Amandine Chaix, Shibu Yooseph, and Satchidananda Panda. 2014. "Diet and Feeding Pattern Affect the Diurnal Dynamics of the Gut Microbiome." *Cell Metabolism* 20 (6): 1006–17. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.11.008>.
273. Ze, Xiaolei, Yonit Ben David, Jenny A. Laverde-Gomez, Bareket Dassa, Paul O. Sheridan, Sylvia H. Duncan, Petra Louis, et al. 2015. "Unique Organization of Extracellular Amylases into Amylosomes in the Resistant Starch-Utilizing Human Colonic Firmicutes Bacterium Ruminococcus Bromii." *MBio* 6 (5): e01058-01015. <https://doi.org/10.1128/mBio.01058-15>.
274. Zeng, Hu, and Hongbo Chi. 2015. "Metabolic Control of Regulatory T Cell Development and Function." *Trends in Immunology* 36 (1): 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.08.003>.
275. Zeng, Huawei, Shahid Umar, Bret Rust, Darina Lazarova, and Michael Bordonaro. 2019. "Secondary Bile Acids and Short Chain Fatty Acids in the Colon: A Focus on Colonic Microbiome, Cell Proliferation, Inflammation, and Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (5): 1214. <https://doi.org/10.3390/ijms20051214>.

276. Zhang, Zhenhuan, Hiroko Yamashita, Tatsuya Toyama, Hiroshi Sugiura, Yoshiaki Ando, Keiko Mita, Maho Hamaguchi, Yasuo Hara, Shunzo Kobayashi, and Hirotaka Iwase. 2005. "Quantitation of HDAC1 mRNA Expression in Invasive Carcinoma of the Breast\*." *Breast Cancer Research and Treatment* 94 (1): 11–16. <https://doi.org/10.1007/s10549-005-6001-1>.
277. Zheng, Danping, Timur Liwinski, and Eran Elinav. 2020. "Interaction between Microbiota and Immunity in Health and Disease." *Cell Research* 30 (6): 492–506. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>.
278. Zhu, Ping, Elke Martin, Jörg Mengwasser, Peter Schlag, Klaus-Peter Janssen, and Martin Göttlicher. 2004. "Induction of HDAC2 Expression upon Loss of APC in Colorectal Tumorigenesis." *Cancer Cell* 5 (5): 455–63.
279. Zmora, Niv, Jotham Suez, and Eran Elinav. 2019. "You Are What You Eat: Diet, Health and the Gut Microbiota." *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 16 (1): 35–56. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0061-2>.