

## Uticaj metabolita probiotičkih bakterija na ćelije humanog adenokarcinoma bazalnih epitelnih ćelija

---

Nekoliko korisnih efekata pripisano je probiotičkim bakterijama koje proizvode mlečnu kiselinu (LAB). Utvrđeno je da sojevi *Lactobacillus spp.* deluju antiproliferativno na različite ćelijske linije kancera. Jedan je i kancer debelog creva, gde uticaj bakterija može da varira od soja do soja, i postoji potreba da se pronađu novi probiotički sojevi sa svojstvima supresora tumora putem in vitro studija. Ovim radom je testiran uticaj metabolita crevne mikrobiote na vijabilnost ćelija adenokarcinoma bazalnih epitelnih ćelija. Vijabilnost je testirana pomoću MTT eseja. Rezultati pokazuju da je rast kancerskih ćelija najuspešnije inhibiran tretmanom cell-free supernatant-bioreaktora bakterija *Lactobacillus spp.* i *E. coli*, kao i samog soja *Lactobacillus spp.* Isto tako su kombinacija buterne i mlečne kiseline u određenim koncentracijama ispoljile značajnu inhibiciju rasta kancerskih ćelija u odnosu na kontrolu, što uglavnom nije bio slučaj sa pojedinačnim tretmanima ovih kiselina. S obzirom da je cell-free supernatant ovih bioreaktora pokazao efekat i na bakteriji *Enterobacter faecalis*, pretpostavlja se da su za ove rezultate zaslužni i bakteriocini, pored ostalih metabolita ovih bakterija. Time je utvrđeno da soj *Lactobacillus spp.* kao i kombinacija različitih koncentracija buterne i mlečne kiseline, koji su njeni najzastupljeniji metaboliti, imaju inhibitorno dozno-zavisno dejstvo na rast tumorskih ćelija, ali je pokazano i proliferativno dejstvo na kancerskim ćelijama u određenim kombinacijama.

## Uvod

Kolorektalni karcinom predstavlja jedan od najvećih zdravstvenih problema 21. veka, sa milion obolelih i pola miliona smrtnih slučajeva godišnje u svetu (Liong 2008). Smatra se da je porast slučajeva obolelih od kolorektalnog karcinoma usko vezan sa „zapadnjačkim” načinom života i ishrane koji podrazumeva preveliki unos crvenog mesa, mali unos vlakana, konzumiranje alkohola, pušenje itd. (Kumar i Dhanda 2017; Liong 2008; Van Raay i Allen-Vercoe 2017; Sharma i Shukla 2016). Ranije studije pokazuju da su pojedini predstavnici crevne mikrobiote odgovorni za porast rizika od kolorektalnog karcinoma, jer proizvode karcinogene, ko-karcinogene ili pro-karcinogene (Liong 2008). Jedna od prethodnih studija je utvrdila da je samo 20% testiranih germ-free životinja razvilo hemijski indukovani kolorektalni kancer, u poređenju sa 93% obolelih životinja sa normalnom crevnom mikrobiotom (*ibid.*). S druge strane, postoje i studije koje naglašavaju ulogu pojedinih predstavnika crevne mikrobiote u prevenciji kancerogeneze, čiji metaboliti utiču na proces diferencijacije kancerskih ćelija (*ibid.*).

Probiotici su korisni mikroorganizmi koji doprinose boljem zdravlju domaćina, tako da se novije studije fokusiraju na njihova antikancerogena dejstva. Pretpostavlja se da mehanizmi antikancerogenog delovanja probiotika podrazumevaju da oni menjaju metabolitičku aktivnost crevne mikrobiote i fiziološko i biohemijsko stanje debelog creva, da uklanjaju kancerogene materije, proizvode anti-kancerogene ili anti-mutagene supstance i povećavaju imunski odgovor domaćina (Sadeghi-Aliabadi *et al.* 2014).

---

Isidora Alempijević (2001), Beograd, učenica 4. razreda XIV beogradske gimnazije

MENTOR: Stefan Maksimović, student VI godine Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Brojni sojevi bakterija koje proizvode mlečnu kiselinu (eng. Lactic acid bacteria – LAB) pripadaju crevnoj mikrobioti, i najčešći su probiotski suplementi u ishrani. Smatra se da sojevi LAB i mlečna kiselina koju oni proizvode održavaju crevnu homeostazu i sprečavaju invaziju patogeni. Pretpostavlja se da je to uzrokovano time što smanjuju pH vrednost u svom okruženju. Međutim, rađene su studije u kojima je pokazano da mlečna kiselina, tj. smanjena pH vrednost, može stimulisati rast kancerskih ćelija, zbog toga što kancerske ćelije imaju promenjeni metabolizam u kojem je zastupljenija aerobna glikoliza. Iako i dalje nema dokaza da mlečna kiselina proizvedena od strane bakterija doprinosi razvijanju kolorektalnog karcinoma, pokazano je u nekoliko slučajeva da je mikrookruženje kolorektalnog karcinoma obogaćeno sojem *Streptococcus gallolyticus* koji spada u LAB (Cox-York *et al.* 2019; Rafter 2003).

Buterna kiselina, koja spada u grupu jedinjenja koja se zajedničkim imenim nazivaju masne kiseline kratkog lanca (eng. Short-chain fatty acids – SCFA), glavni je produkt koji nastaje bakterijskom fermentacijom mlečnih proizvoda. Buterna kiselina je bitan izvor energije za zdrave epitelne ćelije kolona, i ima ulogu u održavanju crevne homeostaze. Ispitivan je uticaj buterne kiseline na različite linije kancerskih ćelija u *in vitro* uslovima, i pokazano da ima antikancersko dejstvo, tako što indukuje apoptozu i inhibira proliferaciju kancerskih ćelija (Hamer *et al.* 2010). U drugoj studiji, koja je rađena na ljudskim ćelijama debelog creva dobijenim biopsijum u *ex vivo* uslovima, pokazano je da se tretiranjem ćelija buternom kiselinom na 4 h, brzina proliferacije u bazalnom regionu kriptepovećala za 60% (*ibid.*). Ovakva sposobnost buterne kiseline da stimuliše i suzbije diferencijaciju kolonocita pod različitim fiziološkim uslovima često se naziva „paradoks butirata” (Cox-York *et al.* 2019).

U ovom radu ispitivan je uticaj metabolita koje proizvodi fiziološka crevna mikrobiota, a koji bi mogli imati efekat na suzbijanje rasta kancerskih ćelija, pri čemu su razmatrani pojedinačni i kombinovani efekti buterne i mlečne kiseline na vijabilnost ćelija humanog adenokarcinoma bazalnih epitelnih ćelija. U tom cilju vijabilnost ćelija humanog adenokarcinoma

bazalnih epitelnih ćelija merena je MTT esejom nakon tretmana. Pored ispitivanja uticaja metabolita crevne mikrobiote na vijabilnost ćelija humanog adenokarcinoma bazalnih epitelnih ćelija, testirano je i njihovo antimikrobno dejstvo na sojevima *Enterobacter faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.* i *Bacillus subtilis*.

## Materijal i metode

**Bioreaktor i priprema cell-free supernatanta (CFS).** U jedan erlenmajer sa pripremljenim MRS bujonom je dodato 100 µL prekonoćne kulture *Lactobacillus* spp. i 10 µL prekonoćne kulture *Escherichia coli*, dok je u drugi dodato 100 µL prekonoćne kulture *Lactobacillus* spp. Erlenmajeri su inkubirani preko noći na temperaturi od 37°C. Bakterijske suspenzije iz oba bioreaktora su prebačene u vaje, koje su potom centrifugirane 10 minuta na temperaturi od 4°C, i brzinom na 13500 rpm. Dobijeni supernatant je čuvan na temperaturi od 4°C do upotrebe (Escamilla *et al.* 2012; Faghfoori *et al.* 2017).

**Antibiogram.** Antimikrobna aktivnosta dobijenih CFS je testirana disc diffusion antibiogram testom na odabranim laboratorijskim sojevima bakterija *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas sp.* i *Bacillus subtilis* u gustini od  $1.5 \cdot 10^8$  ćelija po mililitru. Petrijeve šolje su inkubirane 24 h na temperaturu od 37°C.

**Merenje vijabilnosti ćelija.** Ćelije linije A549 humanog adenokarcinoma pluća su zasađene u mikrotitar ploče sa 96 bunarića u koncentraciji od  $1.5 \cdot 10^6$  ćelija po bunariću. Nakon 12 h je otklonjen medijum i dodato je po 10 µL tretmana. Svi tretmani su rađeni u tripletu. Mikrotitar pločica sa 96 bunarića je inkubirana preko noći. Po isteku eksperimentalnog tretmana odliven je medijum, a zatim je u svaki bunarić dodato po 100 µL rastvora MTT koncentracije 0.5 mg/mL. Nakon inkubacije od 3 h na 37°C, medijum je odliven i ćelije su lizirane dodatkom 100 µL 0.04 M HCl u izopropanolu u svaki bunarić. Ploča je zatim inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi uz neprestano mešanje kako bi se kristali formazana u potpunosti rastvorili. Apsorbance su očitane su na 540 nm.

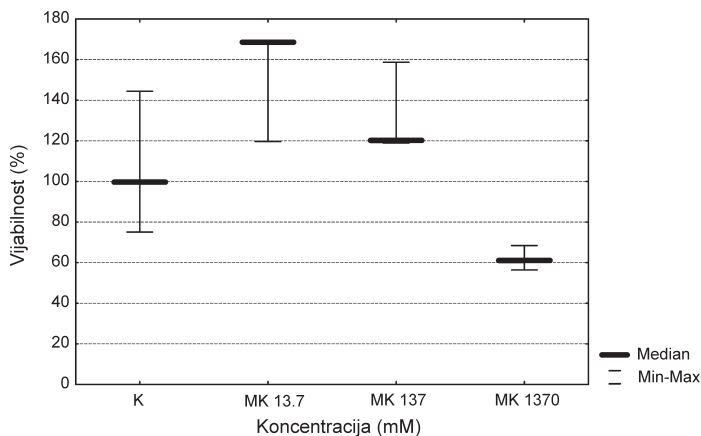
## Rezultati

Cell free supernatanti i iz bioreaktora u kome je gajena kultura *Lactobacillus* spp. (bioreaktor dva) i iz bioreaktora gde je gajena kultura *Lactobacillus* spp. i *Escherichia coli* (bioreaktor jedan) pokazali su antimikrobno dejstvo jedino na bakteriji *Enterobacter faecalis*, dok kod ostalih sojeva nije zabeležena zona inhibicije.

Sa grafika na slici 3 uočava se da su kombinovani tretmani mlečne i buterne kiseline imali antiproliferativno dejstvo u koncentracijama: buterna 50 mM i mlečna kiselina 1.37 M (vijabilnost 65%), buterna 50 mM i mlečna kiselina 137 mM (81%) i buterna 0.5 mM i mlečna kiselina 1.37 M (68%). Odvojeno su uglavnom ispo-

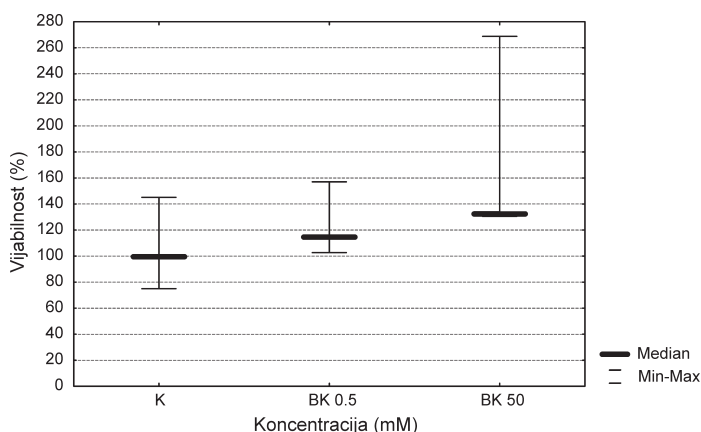
ljile proliferativno dejstvo (slike 1 i 2): buterna kiselina 50 mM (vijabilnost 134%), buterna kiselina 0.5 mM (116%), mlečna kiselina 170 mM (121%) i mlečna kiselina 13.7 mM (160%); izuzetak je najvša testirana koncentracija mlečne kiseline (1.37 M), koja je ispoljila antiproliferativno dejstvo (vijabilnost 62%).

Koncentrovani cell-free supernatanti bioreaktora jedan i dva su pokazali antiproliferaciono dejstvo: kod CFS bioreaktora jedan (*Lactobacillus* spp. i *E. coli*) vijabilnost je iznosila 74%, a kod bioreaktora dva (*Lactobacillus* spp.) 76%, dok su sto puta razblaženi supernatanti pokazali proliferativno dejstvo: kod CFS bioreaktora jedan vijabilnost je iznosila 167%, a kod bioreaktora dva – 130% (slika 4).



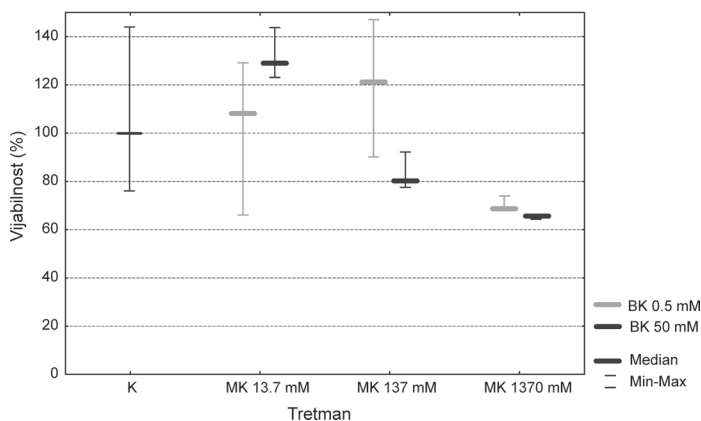
Slika 1. Vijabilnost A549 ćelija pri tretmanu različitim koncentracijama mlečne kiseline: K – kontrola, MK – mlečna kiselina.

Figure 1. Viability of A549 cells in treatment with different concentrations of lactic acid: K – control, MK – lactic acid.



Slika 2. Vijabilnost A549 ćelija pri tretmanu različitim koncentracijama buterne kiseline: K – kontrola, BK – buterna kiselina.

Figure 2. Viability of A549 cells in treatment with different concentrations of butyric acid: K – control, BK – butyric acid.

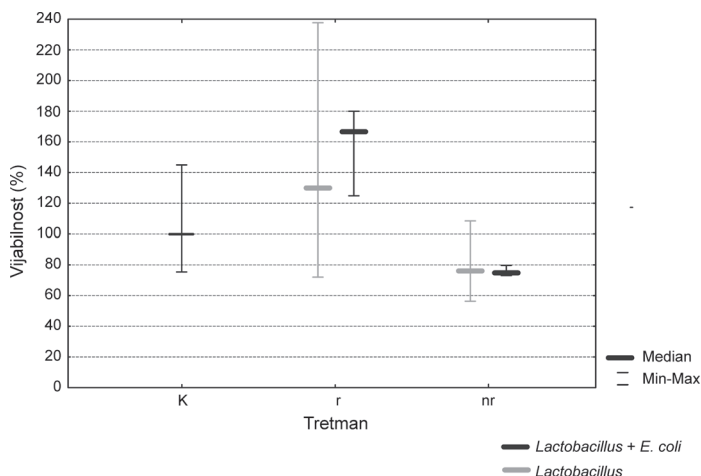


Slika 3. Vijabilnost A549 ćelija pri različitim kombinacijama koncentracija mlečne i buterne kiseline:

K – kontrola, MK – mlečna kiseline, BK – buterna kiseline.

Figure 3. Viability of A549 cells in treatment with different combinations of concentrations of lactic and butyric acid:

K – control, MK – lactic acid, BK – butyric acid.



Slika 4. Vijabilnost A549 ćelija pri tretmanu koncentrovanim i 100 puta razblaženim CFS bakterijskih suspenzija oba bioreaktora:

K – kontrola, r – razblaženi CFS, nr – koncentrovani CFS.

Figure 4. Viability of A549 cells in the treatment of concentrated and 100-fold diluted CFS bacterial suspensions of both bioreactors:

K – control, r – diluted CFS, concentrated CFS.

## Diskusija

Crevna mikrobiota održava crevnu homeostazu time što sprečava invaziju patogena, promovise post-natalno nastajanje mukuznih struktura i stimuliše imunitet. S obzirom da i dalje nije usvojen koncept fiziološke mikrobiote, nego se ona značajno razlikuje kod svakog organizma, ne može se sa sigurnošću tvrditi o nekom ustaljenom principu njenog delovanja. Na osnovu malog broja studija na tu temu, danas je opšte prihvaćeno da predominantno kod velike većine ispitivanih populacija, crevnom mikrobiotom dominiraju Bacteroidetes (npr. *Bacteroides* i *Prevotella*), Firmicutes (npr. *Clostridium*, *Roseburia*, *Faecalibacterium* i

*Ruminococcus*), Actinobacteria (na primer *Bifidobacterium*), Proteobacteria (npr. *Enterobacteriaceae*) i Verrucomicrobia (npr. *Akkermansia muciniphila*) (Belcheva *et al.* 2014). Antimutageni potencijal bakterijskih metabolita se najviše vezuje za buternu kiselinu, acetate, neke glikoproteine, peptidoglikane i polisaharide. Mehanizmi njihovog antimutagenog dejstva su vezivanje za mutagene, inhibicija enzima koji aktiviraju kancerogenezu, podsticanje hemopreventivnih enzima i prevencija oštećenja na DNK (Sharma i Shukla 2016).

Ispitivanjem zasebnog efekta svakog od metabolita u našoj studiji, rezultati su pokazali sličnost sa prethodnim studijama. Naime, buterna kiseline je pokazala proliferativno dejstvo na

ispitivanom soju kancerskih linija. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodno pretpostavljenim mehanizmom njenog delovanja, gde se smatra da buterna kiselina stimuliše matične ćelije crevnog epitela u kripta debelog creva (Belcheva *et al.* 2014). Međutim, mlečna kiselina pokazuje u koncentraciji koja je primećena u okruženju bakterija koje je luče, inhibitorni efekat na rast tumorskih ćelija, kako u poređenju sa kontrolom, tako i sa ostalim tretmanima. Pritom, naše istraživanje potvrđuje dozno-zavisni efekat mlečne kiseline. Smatra se da stvaranjem mikrosredine sa nižim pH, ove bakterije mlečnom kiselinom sprečavaju ispoljavanje efekata drugih bakterija i njihovih metabolite. Iako je za ovakve studije neophodno ispitivanje na živim jedinkama sa varijacijama u mikrobioti, naša studija daje rezultate u skladu sa pretpostavkama prethodnih istraživanja (Belcheva *et al.* 2014). Kombinacije koncentrovane buterne i mlečne kiseline su pokazale inhibitorno dejstvo, takođe u vidu dozno-zavisnog efekta. S obzirom da naša studija nije pokazala nikakvu statističku značajnost u razlici ovih efekata, ne možemo sa sigurnošću pripisati inhibitorni potencijal jednom od metabolita, iako znamo njihov zasebni efekat.

Antimikrobno dejstvo je pokazano samo na soju *Enterococcus faecalis*, što je u skladu sa prethodno rađenom studijom, međutim u toj studiji je dokazano antimikrobno dejstvo na sojevima *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. (Faghfoori *et al.* 2017). CFS oba bioreaktora je pokazao inhibitorno dejstvo u dozno-zavisnom trendu. Jače inhibitorno dejstvo CSF-a bioreaktora jedan (*Lactobacillus* spp. i *E. coli*) u odnosu na bioreaktor dva (*Lactobacillus* spp.) može se objasniti time što je došlo do toga da *Lactobacillus* spp. u prisustvu kompetitivnog soja *E. coli* proizvodi bakteriocine, za koje je u prethodnim radovima takođe utvrđeno da imaju inhibitorna svojstva na rast tumorskih ćelija. Ovakvi rezultati su u skladu sa prethodnom studijom, gde je takođe utvrđeno inhibitorno dejstvo CFS sojeva *L. paracasei* (57.29%) i *L. rhamnosus* (23.69%) na ćelije linije HT-29 (Faghfoori *et al.* 2017).

## Zaključak

Ovim radom je utvrđeno da soj *Lactobacillus* spp. kao i kombinacija različitih koncentracija buterne i mlečne kiseline koji su njeni najzastupljeniji metaboliti imaju inhibitorno dejstvo na rast tumorskih ćelija, ali takođe mogu imati i proliferativno dejstvo na istim. Međutim, ovi rezultati nisu dovoljni da bismo mogli da kažemo da su mehanizmi metabolita i same varijacije među sojevima bakterija crevne mikrobiote dovoljno razjašnjeni, kao potencijalni target budućih terapija za suzbijanje kolorektalnog kancera. Pored urađenog MTT esej na kancerskim ćelijama, potrebno je uraditi i MTT esej na zdravim ćelijama crevnog epitela, zbog prethodnih studija koje tvrde da crevna mikrobiota ima negativno dejstvo na zdrave ćelije i zapravo indukuje kolorektalni karcinom. Crevna mikrobiota je složena zajednica mikroorganizama, stoga posle testiranja samo jednog soja i interakcije dva različita soja i njihovih metabolita, ne možemo sa sigurnošću da tvrdimo njen uticaj na kolorektalni karcinom.

## Literatura

- Belcheva A., Irrazabal T., Robertson S. J., Streutker C., Maughan H., *et al.* 2014. Gut microbial metabolism drives transformation of MSH2-deficient colon epithelial cells. *Cell*, **158** (2): 288.
- Cox-York K., Stoecker E., Hamm A., Weir T. 2019. *Microbiome and cancer*. Springer
- Escamilla J., Lane M., Maitin V. 2012. Cell-free supernatants from probiotic lactobacillus casei and *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease colon cancer cell invasion *in vitro*. *Nutrition and cancer*, **64** (6): 871.
- Faghfoori Z., Pourghassem Gargari B., Saber A., Seyyedi M., Fazelian S., Yari A. 2017. Prophylactic effects of secretion metabolites of dairy lactobacilli through downregulation of ErbB-2 and ErbB-3 genes on colon cancer cells. *European Journal of Cancer Prevention*, **29** (3): 1.
- Hamer H., Jonkers D., Venema K., Vanhoutvin S., Troost F. *et al.* 2010. Review article: The role of butyrate on colonic function. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, **27**: 104.

Kumar R., Dhanda S. 2017. Mechanistic insight of probiotics derived anticancer pharmaceuticals: A road forward for cancer therapeutics. *Nutrition and Cancer*, **69** (3): 375.

Liong M. T. 2008. Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: Postulated mechanisms and *in-vivo* evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, **9** (5): 854.

Rafter J. 2003. Lactic acid bacteria and cancer: Mechanistic perspective. *British Journal of Nutrition*, **88** (S1): S89.

Sadeghi-Aliabadi H., Mohammadi F., Fazeli H., Mirlohi M. 2014. Effects of *Lactobacillus plantarum* A7 with probiotic potential on colon cancer and normal cells proliferation in comparison with a commercial strain. *Iranian journal of basic medical sciences*, **17** (10): 815.

Sharma M., Shukla G. 2016. Metabiotics: one step ahead of probiotics; an insight into mechanisms involved in anticancerous effect in colorectal cancer. *Frontiers in Microbiology*, **7**: 1.

Van Raay T., Allen-Vercoe E. 2017. Microbial interactions and interventions in colorectal cancer. *Microbiology Spectrum*, **5** (3): 1.

---

*Isidora Alempijević*

## Effects of Probiotic Bacterial Metabolites on Human Basal Epithelial Adenocarcinoma Cells

Several beneficial effects have been attributed to the probiotic lactic acid bacteria (LAB). It was determined that the strain *Lactobacillus* spp. can act antiproliferative on various cancer cell lines, including colon cancer. Effects of lactic acid bacteria on colon cancer may vary from strain to strain and there is a need to find new probiotic strains with tumor-suppressing properties through *in vitro* studies. This work tested the effects of gut microbiota metabolites on the viability of basal epithelial adenocarcinoma cells. Cell viability was tested using MTT assay. Results suggest the most successful treatments for the inhibition of cancer cell growth were cell-free supernatants from bioreactors of *Lactobacillus* spp. and *E. coli*, like *Lactobacillus* spp. Moreover, the combination of butyric acid 50 mM and lactic acid at a concentration of 1.37 M and 137 mM have also inhibited the growth of the cancer cells. Also, the cell-free supernatant had an effect on *Enterobacter faecalis*, which brings about the question and effects of bacteriocin in addition to other metabolism products of these bacteria. Besides this result, *Lactobacillus* spp. as well as the combination of different concentrations of butyric and lactic acid, which are its most common metabolites, do have anticancer effects, but can also have a proliferative effect on cancer cells in certain combinations. 