

ADRIANA NOWAK, ZDZISŁAWA LIBUDZISZ

KARCINOGENNA AKTYWNOŚĆ MIKROORGANIZMÓW JELITOWYCH

Streszczenie

W jelicie grubym człowieka występuje złożony ekosystem, składający się z ponad 1000 gatunków mikroorganizmów, które odgrywają bardzo ważną rolę w metabolizmie składników pokarmowych i zapewnieniu zdrowia człowieka. Wiele produktów tego metabolizmu może sprzyjać rozwojowi nowotworów jelita grubego. Główną rolę w tworzeniu związków karcynogennych odgrywają bakteryjne enzymy: β -glukuronidaza, β -glukozydaza, nitroreduktaza, 7- α -dehydroksylaza, β -galaktozydaza i azoreduktaza. Ich produktami mogą być groźne dla zdrowia człowieka: związki fenolowe i indolowe, aglikony flawonoidowe, barwniki azowe, fekapentaeny, estrogeny oraz drugorzędowe kwasy żółciowe.

Słowa kluczowe: mikroorganizmy jelitowe, karcynogeny

Wprowadzenie

Karcynogeny w jelicie grubym można podzielić na egzogenne (przedostające się do organizmu człowieka na przykład wraz z dietą) oraz endogenne (powstające w wyniku aktywności mikroorganizmów jelitowych) [17]. Aktywność enzymatyczna mikroorganizmów jelitowych prowadzi do generowania wielu produktów genotoksycznych, mutagennych i karcynogennych niebezpiecznych dla zdrowia człowieka (tab. 1).

Dr inż. A. Korus, prof. dr hab. W. Kmiecik, prof. dr hab. Z. Lisiewska, Katedra Surowców i Przetwórstwa Owocowo-Warzywnego, Wydz. Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków

Dr A. Nowak, prof. dr hab. Z. Libudzisz, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydz. Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź

Tabela 1

Produkty aktywności mikroorganizmów jelitowych.
Products resulting from the activity of intestinal microbiota.

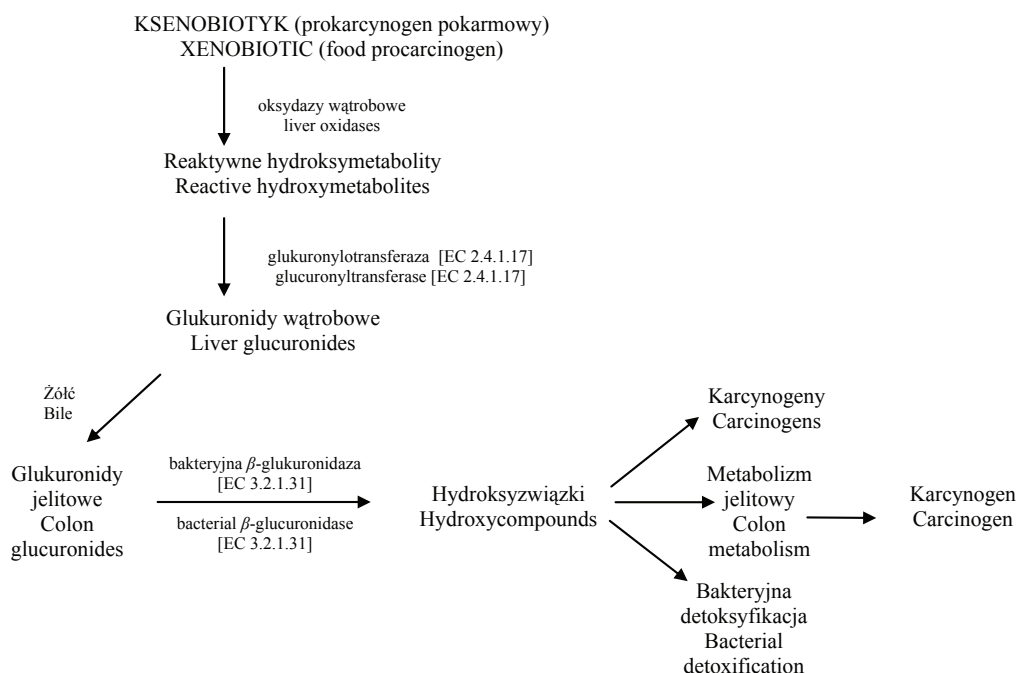
Aktywność Activity	Przykład metabolizmu bakteryjnego Example of bacterial metabolism
Aktywacja promutagenów i prokarcynogenów do związków toksycznych, mutagenów i karcynogenów Activation of promutagens and procarcinogens to toxic compounds, mutagens and carcinogens	Redukcja azo- i nitrozo związków Reduction of azo- and nitroso compounds Formowanie aglikonów z glikozydów flawonoidowych Forming aglycones from flavonoid glycosides Konwersja karcynogenu IQ do mutagenu bezpośredniego 7-OHIQ Conversion of carcinogen IQ to a direct-acting mutagen 7-OHIQ
Synteza karcynogenów i mutagenów Synthesis of carcinogens and mutagens	Formowanie związków N-nitrozowych ze źródeł endogennych oraz jonów azotanowych(III) i (V) Forming N-nitroso compounds from endogen sources and nitrite/nitrate ions Formowanie fekapentaenów z eterowych fosfolipidów Forming faecapentaenes from ether phospholipides
Synteza promotorów Synthesis of promoters	Metabolizm kwasu cholowego i chenodeoksycholowego do deoksycholowego i lithocholowego Metabolism of cholic and chenodeoxycholic acids to deoxycholic and lithocholic acids Degradacja białek do amoniaku, fenoli, indoli, skatoli i krezoli. Degradation of proteins to ammonium, phenols, indoles, skatoles, and cresoles Formowanie fekapentaenów z eterowych fosfolipidów Formation of faecapentaenes from ether phospholipides

Źródło: / Source: opracowanie własne na podstawie [9] / the authors' own study on the basis of [9].

Mikroorganizmy jelitowe mogą aktywować związki prokarcynogenne, dostające się do organizmu człowieka wraz z dietą, ale także te, które są wydzielane wraz z żółcią do jelita grubego [13]. Tworzenie szkodliwych metabolitów przez mikroorganizmy jelitowe może nastąpić poprzez [2]:

- enzymatyczne usunięcie z danego związku grupy detoksykacyjnej przyłączonej do karcynogenu w wątrobie;
- aktywację prokarcynogenów (związki rakotwórcze wymagające wstępnej aktywacji metabolicznej i działające pośrednio poprzez ich aktywne metabolity) przedostających się do organizmu wraz z dietą;
- metabolizm substancji endogennych do karcynogenów lub promotorów (związków o aktywności promującej powstawanie i rozwój guzów).

Potencjalnie szkodliwe związki przedostające się do organizmu wraz z dietą podlegają przemianom zachodzącym w wątrobie, tj. utlenianiu z udziałem cytochromu P₄₅₀ do glukuronidów, a następnie wraz z żółcią są wydzielane do jelita, w którym kwaśna, po opuszczeniu żołądka, miazga pokarmowa jest zobojętniana [13]. Jest to tzw. glukuronidacja ksenobiotyków, która ma na celu ich detoksyfikację i usunięcie poza organizm (rys. 1) [7].



Rys. 1. Przemiany glukuronidów jelitowych przez mikroorganizmy.

Fig. 1. Transformation of colon glucuronides by intestinal microbiota.

Źródło: / Source: opracowanie własne na podstawie [2 i 20] / the authors' own study on the basis of [2, 20].

Ponad 97 % soli żółciowych jest aktywnie reabsorbowana w jelicie krętym i zwracana do wątroby poprzez żyłę wrotną. Jednak reszta soli oraz związanych z nią ksenobiotyków przechodzi do jelita grubego, w którym następuje ich przemiana przez mikroorganizmy jelitowe i uwalnianie związków biologicznie aktywnych, o właściwościach toksycznych, mutagennych i karcynogennych [13]. Związki te, przechodząc wraz z żółcią przez przewód pokarmowy, mogą zostać przekształcone przez enzymy bakterii jelitowych z uwolnieniem części glukuronidowej oraz toksycznego metabolitu [3, 9, 13]. W powstawanie lub aktywację związków karcynogennych w jelicie grubym

są zaangażowane enzymy bakteryjne (tzw. fekalne), z których najważniejszymi są: β -glukuronidaza (EC 3.2.1.31), β -glukozydaza (EC 3.2.1.21), nitroreduktaza (EC 1.7.1.1), reduktaza azotanowa (EC 1.7.1.), 7- α -dehydroksylaza (EC 1.1.1.159), β -galaktozydaza (EC 3.2.1.23), azoreduktaza (EC 1.7.1.6), hydrolaza glikocholanowa (EC 3.5.1.24) i ureaza (EC 3.5.1.5) [9, 16, 27]. Wzrost aktywności tych enzymów w kale wskazuje na niekorzystne zmiany w układzie mikroorganizmów jelitowych.

Karcynogeny powstające lub przekształcane w jelicie grubym przez mikroorganizmy jelitowe to głównie [9, 16]: fenole, krezole, indole, skatole, aglikony flawonoidowe, barwniki azowe, fekapentaeny, drugorzędowe kwasy żółciowe oraz estrogeny.

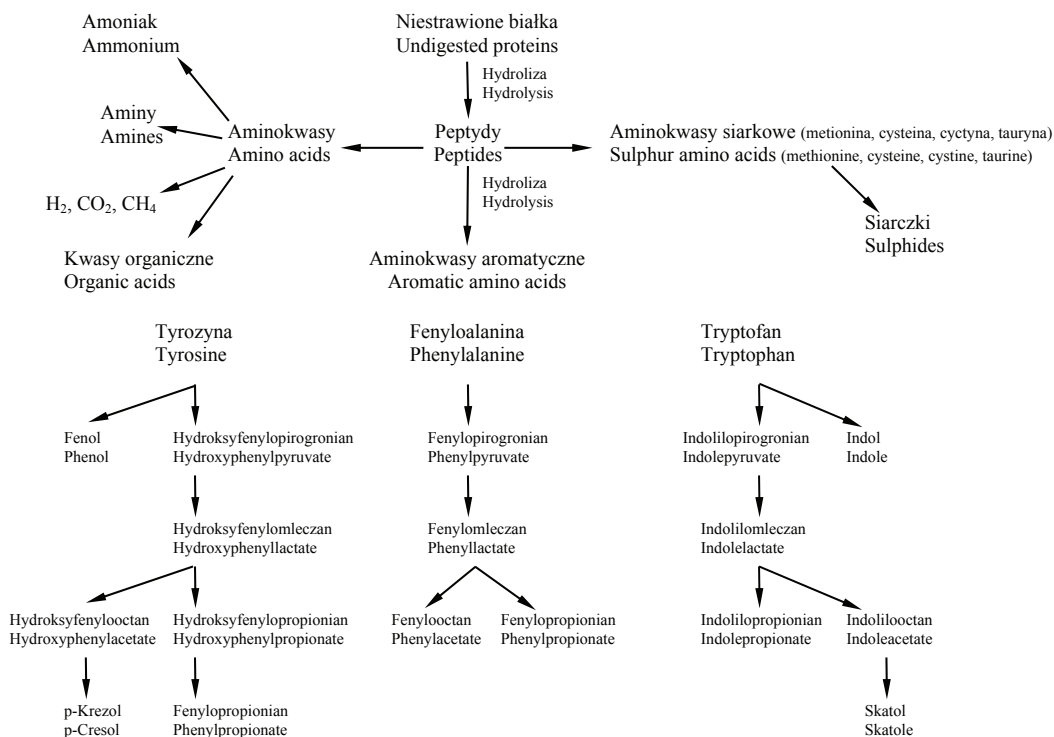
Związki fenolowe i indolowe

Badania *in vivo* wykazały, że jelitowy metabolizm białek (tzw. fermentacja białkowa) zachodzący przy udziale mikroorganizmów jelitowych prowadzi do wytworzenia wielu produktów genotoksycznych, mutagennych i karcynogennych.

Dzienna ilość związków białkowych przedostających się do jelita grubego człowieka, głównie w postaci białek rozpuszczalnych (48-51 %) i peptydów (20-30 %) wynosi od 3 do 25 g [21]. Białka te pochodzą zarówno z diety, jak i ze źródeł endogennych, takich jak enzymy wątrobowe oraz z wydzielania wewnętrznego (w jamie ustnej, żołądka, wątrobie i jelicie cienkim). Do jelita grubego białka przedostają się w postaci produktów lizy, śluzu jelitowego, złuszczonej komórki śluzowej i nabłonkowej, a także białek wydzielanych przez bakterie [9, 10, 12, 21]. Białka, które nie uległy strawieniu i wchłonięciu w jelicie cienkim, są rozkładane w jelicie grubym przez endopeptydazy oraz proteiny mikroorganizmów jelitowych, gdyż są one bogatym źródłem azotu oraz energii. Efektem proteolizy białek i oligopeptydów jest ich rozkład do aminokwasów, a te mogą następnie ulec rozkładowi bezpośrednio przez bakterie w jelicie grubym [11, 22]. Wykorzystywanie białek jako źródła energii na drodze fermentacji białkowej jest zjawiskiem rzadkim i zachodzi tylko wtedy, gdy zostaną wyczerpane zapasy węglowodanów [21]. Proces ten przeprowadzają bakterie proteolityczne, głównie z rodzajów *Bacteroides* i *Propionibacterium*, a także w mniejszym stopniu *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacillus* i *Staphylococcus* [21, 22, 23]. Produkty tej fermentacji to SCFA (*short chain fatty acids* - krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe), BCFA (*branched chain fatty acids* - kwasy tłuszczowe o rozgałęzionych łańcuchach), wodór oraz CO₂. Ponadto związki toksyczne, takie jak: amoniak, aminy, związki fenolowe i indolowe, powstają w wyniku reakcji deaminacji, dekarboksylacji oraz

α - i β -eliminacji, która polega na odłączeniu dwóch podstawników od atomu węgla (α -eliminacja) lub od dwóch sąsiadujących ze sobą atomów węgla (β -eliminacja) w cząsteczce związku [9, 10, 22]. Wiele związków fenolowych i indolowych, w tym fenol, p-krezol oraz 4-etylofenol jest tworzonych w wyniku rozkładu aminokwasów

aromatycznych (fenyloalaniny, tyrozyny i tryptofanu), na drodze reakcji deaminacji, transaminacji, dekarboksylacji i dehydrogenacji (rys. 2). Aminokwasy aromatyczne powszechnie występują w mleku, jajach, wołowinie oraz niektórych sztucznych słodzikach.



Rys. 2. Produkty przemian białek w jelicie grubym człowieka.

Fig. 2. Products of proteins metabolism in human colon.

Źródło: / Source: opracowanie własne na podstawie [9 i 20] / the authors' own study on the basis of [9, 20].

W organizmie człowieka związki te podlegają reakcji sprzęgania z siarczanami albo glukuronidami w wątrobie, a następnie są wydzielane wraz z żółcią i wydalane wraz z moczem (rys. 1). Jednak część sprzężonych związków glukuronidowych, pod wpływem bakteryjnej β -glukuronidazy, ulega hydrolizie w jelicie grubym, co powoduje uwolnienie karcynogenów. W wyniku późniejszych przemian są przekształcane do związków genotoksycznych, mutagennych oraz karcynogennych. Wykazano, że względne beztlenowce, tj. *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus faecalis* i *Staphylococcus albus* są zdolne do syntezy fenolu, natomiast beztlenowce *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium* sp., *Bifidobacterium* sp. i *Clostridium*

sp. do syntezy p-krezolu [10]. Za wytwarzanie związków indolowych (w tym indolu) odpowiedzialne są *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Escherichia coli* i *Citrobacter* sp., które dzięki aktywności tryptofanazy przekształcają tryptofan do indolu. *Bacteroides fragilis* oraz *Peptostreptococcus asaccharolyticus* mogą przekształcać tyrozynę do fenolu [10].

Ureaza – enzym wykryty głównie u bakterii z rodzajów *Bacteroides*, *Proteus* i *Klebsiella*, odpowiada za hydrolizę mocznika do amoniaku, zwiększając tym samym pH kału, co wskazuje na zagrożenie nowotworem jelita grubego.

Bakterie jelitowe, głównie z rodzaju *Clostridium* oraz *Bacteroides*, w wyniku aktywności proteolitycznej wytwarzają proste aminy alifatyczne (metyloaminę, dimetyloaminę, propyloaminę, butyloaminę 2-metylobutyloaminę), poliaminy (putrescynę, kadawerynę, pyrolidynę, piperidynę, histaminę) oraz aminy aromatyczne (tyraminę, tryptaminę, fenyloetyloaminę), które mogą z kolei być substratami w reakcji nitrozowania, prowadzącej do powstania rakotwórczych związków N-nitrozowych [12]. Wytwarzanie związków indolowych i fenolowych, a także amin przez mikroorganizmy jelitowe zależy nie tylko od diety, lecz również od aktywności sekrecyjnej przewodu pokarmowego, wydzielania gruczołów dokrewnych, a także od składu ilościowego i jakościowego mikroorganizmów jelitowych [12]. Dieta wysokobiałkowa powoduje zwiększone wydalanie amoniaku z kałem oraz p-krezolu w moczu. Ponadto fenol i jego pochodne obecne są w wielu źródłach egzogennych, gdyż mogą być dostarczane do organizmu wraz z lekami, dymem papierosowym (jeden papieros zawiera 60-140 µg fenolu). Powszechnym źródłem fenolu są kawa, napoje alkoholowe, produkty mleczne, wołowina, różnego rodzaju prażone orzeszki, herbata czarna i zielona, niektóre herbaty ziołowe, miód, kakao, a także owoce i warzywa, choć w mniejszym stopniu. U dzieci karmionych mieszankami sztucznymi wykryto o wiele wyższy poziom amoniaku, fenolu i p-krezolu w moczu oraz wyższą aktywność ureazy, β -glukozydazy i β -glukuronidazy w wodzie kałowej niż u dzieci karmionych piersią. Związane to jest z niekorzystnymi zmianami ilościowymi i jakościowymi w składzie mikroorganizmów jelitowych. Fizjologiczny poziom fenolu, p-krezolu oraz indolu w dolnych odcinkach przewodu pokarmowego jest niski. Obserwuje się jednak znacznie mniejsze stężenia tych związków w części dystalnej (zstępującej), niż proksymalnej (wstępującej) okrężnicy. Związane jest to z wysoką aktywnością proteolityczną mikroorganizmów w części dystalnej okrężnicy. Po inkubacji treści jelitowej z części proksymalnej okrężnicy *in vitro* z aminokwasami aromatycznymi zaobserwowano, że tworzy się 1,0 mmol fenolu/kg treści jelitowej/h, 0,32 mmol p-krezolu/kg treści jelitowej/h oraz 0,06 mmol indolu/kg treści jelitowej/h [21]. Znacznie większe ich stężenie zaobserwowano w części dystalnej jelita grubego: 3,0 mmol fenolu/kg treści jelitowej i 4,0 mmol p-krezolu/kg treści jelitowej. Inkubacja *in vitro* wykazała, że fenol powstawał najszybciej, natomiast indol najwolniej. Ci sami autorzy prowadzili pomiar stężenia fenolu,

p-krezolu i indolu w próbkach testowych po inkubacji mikroorganizmów jelitowych, ale przy różnym rozcieńczeniu. Stwierdzili obecność fenolu w stężeniach od 0,06 do 0,22 mmol/l (\approx 5,7 - 20,7 μ g/ml); p-krezolu do 0,46 mmol/l (\approx 50 μ g/ml) oraz indolu do 0,06 mmol/l (\approx 7 μ g/ml) indolu [21]. Wykazano, że stężenie metabolitów po fermentacji białek w części dystalnej okrężnicy (głównie fenolu i p-krezolu) jest znacznie wyższe (95 mmol fenolu/kg mokrej masy treści jelitowej i 23 mmol p-krezolu/kg mokrej masy treści jelitowej) niż w części proksymalnej (1,48 mmol fenolu/kg mokrej masy treści jelitowej i 0,46 mmol p-krezolu/kg mokrej masy treści jelitowej). Inni autorzy wskazują, że dziennie wraz z moczem wydalanych jest 25,6 μ g fenolu, 87,3 μ g p-krezolu oraz 301,6 μ g indolu [25].

Związki fenolowe oraz indolowe mogą powodować wiele chorób zarówno ludzi, jak i zwierząt. Działają niekorzystnie na nabłonek jelitowy. Fenol oraz indol, a także metabolity tryptofanu (indoliloctan, indolilopropionian) mogą indukować nowotwory jelita grubego. Zachowują się raczej jak promotory (czynniki wywołujące rozwój guza) niż bezpośrednie karcynogeny. Fenole zachowują się jak kokarcynogeny (czynniki nie inicjujące rozwoju nowotworów, ale zwiększające działanie związków rakotwórczych) oraz mogą powodować schizofrenię. Fenol oraz jego pochodne (1,4-dihydroksybenzen = hydrochinon) pochodzące z diety, a także powstające w wyniku aktywności mikroorganizmów jelitowych są głównymi czynnikami białaczek [14]. Produkty fermentacji białek ograniczają żywotność komórek nabłonkowych jelita oraz powodują zapalenie jelita grubego. Ponadto, badania *in vitro* wykazały, że fenol katalizuje reakcję nitrozowania dimetyloaminy do karcynogenu – N-nitrozodimetyloaminy, a reakcja fenolu oraz indolu z azotanami(III) prowadzi do powstania diazochinonu, związku o działaniu mutagennym [10]. Stwierdzono, że indol może prowadzić do rozwoju nowotworów jelita grubego oraz pęcherza moczowego [21], natomiast p-krezol hamuje wzrost młodych świń oraz powoduje nadpobudliwość u dzieci [12].

Międzynarodowa Agencja do Badań nad Rakiem (IARC) zaklasyfikowała (8 kwietnia 2003 r.) jednak fenol, jako związek niekarcynogeny dla ludzi [27].

Aglikony flawonoidowe

Glikozydy flawonoidowe występujące naturalnie w roślinach, to związki złożone z niecukrowego, niskocząsteczkowego podstawnika (aglikonu) połączonego wiązaniem glikozydowym z częścią cukrową. Dzielne spożycie glikozydów przez człowieka wynosi od 50 do 1000 mg, a ich głównym źródłem są owoce, warzywa oraz napoje pochodzenia roślinnego, takie jak herbaty ziołowe i wino [9, 16]. Glikozydy w spożywanej formie są nieszkodliwe. Większość z nich nie ulega strawieniu i są wtedy transportowane do jelita grubego, w którym enzymy bakteryjne β -glikozydazy (β -glukuronidaza, β -galaktozydaza, β -glukozydaza) rozkładają je do aglikonów oraz części cukrowych, które mogą być wykorzystane jako źródło energii (tab. 2).

Tabela 2

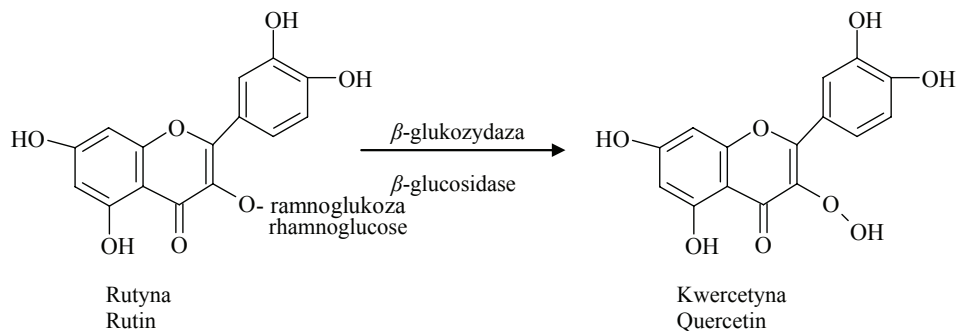
Mikroorganizmy jelitowe o aktywności β -glikozydaz.

β -glicosidase activity in intestinal microbiota.

Enzym Enzyme	Rodzaje lub gatunki bakterii Genera or species of bacteria
β -glukozydaza β -glucosidase	<i>Bacteroides uniformis</i> <i>Bacteroides ovatus</i> <i>Enterococcus faecalis</i>
β -glukuronidaza β -glucuronidase	<i>Bacteroides fragilis</i> <i>Bacteroides vulgatus</i> <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> <i>Eubacterium eligens</i> <i>Peptostreptococcus sp.</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Clostridium sp.</i>
β -galaktozydaza β -galactosidase	<i>Escherichia coli</i> <i>Bacteroides distasonis</i>

Źródło: / Source: opracowanie własne na podstawie [3 i 13] / the authors' own study on the basis of [3, 13].

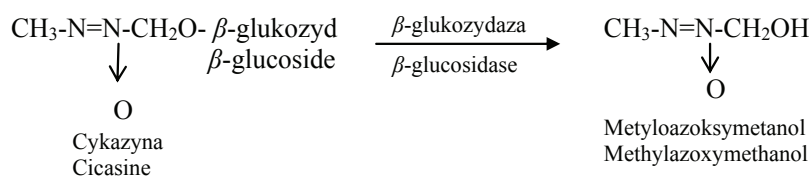
Glikozydy w jelicie grubym człowieka mogą pochodzić z dwóch źródeł: z diety oraz z przemian zachodzących w wątrobie - utleniania z udziałem cytochromu P₄₅₀ do glukuronidów, a następnie wydzielania ich wraz z żółcią do jelita grubego. W wątrobie są przekształcane przez mikroorganizmy jelitowe do biologicznie aktywnych aglikonów, które wykazują właściwości toksyczne, mutagenne i karcynogenne [7]. Do mikroorganizmów o najwyższej aktywności β -glukuronidazy należą *Escherichia coli* i *Clostridium sp.*, natomiast *Bacteroides sp.* oraz *Enterococcus faecalis* charakteryzują się największą aktywnością β -glukozydazy [3]. β -glukozydaza przekształca rutynę w kwercetynę (rys. 3).



Rys. 3. Przekształcenie rutyny przez β -glukozydazę bakterii jelitowych.

Fig. 3. Transformation of rutin by β -glucosidase of intestinal microbiota.

Wykazano, że kwercetyna jest promotorem guzów jelitowych u szczurów. Cykazyina – związek występujący w korzeniu, liściach oraz orzechach tropikalnej palmy – może być hydrolizowany przez mikroorganizmy jelitowe do genotoksycznego metyloazoksymetanolu (MAM) (rys. 4).



Rys. 4. Bioaktywacja cykazyiny przez β -glukozydazę bakterii jelitowych.

Fig. 4. Bioactivation of cicasin by β -glucosidase of intestinal microbiota.

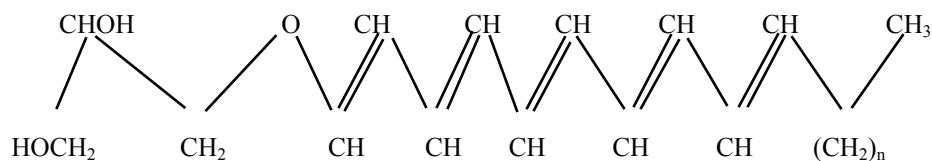
W doświadczeniach ze szczurami wykazano, że MAM był formowany w wyniku bakteryjnej aktywności z 1,2-dimetylohydrazyny (DMH) – modelowego karcynogenu powodującego nowotwór jelita grubego. Zarówno rutyna, jak i cykazyina nie są mutagenne, ale mogą stać się karcynogenami po aktywacji przez mikroorganizmy jelitowe. β -galaktozydaza z kolei katalizuje przemianę robininy (kemferolo-3-O-galaktozydoramnozydo-7-O-ramnozyd), występującej w kwiatach robini akacyjowej stosowanej w ziołolecznictwie, do kemferolu, który, jak wykazano w teście Ames, jest mutagenem. Reakcję tę przeprowadzają jelitowe bakterie *Bacteroides distasonis* [3].

Toksyczność i mutagenność aglikonów flawonoidowych pozostaje w sprzeczności z raportami dotyczącymi antymutagennego działania tych związków. Jednak praw-

dą jest, że hydroliza glikozydów roślinnych w jelicie grubym prowadzi do wytworzenia związków korzystnych, jak i szkodliwych dla zdrowia człowieka.

Fekapentaeny (FP)

Zidentyfikowanymi do tej pory fekapentaenami są związki zbudowane z eteru glicerylowego zawierającego część pentaenową, o długości łańcucha 12 i 14 atomów węgla w cząsteczce (rys. 5).



Rys. 5. Budowa chemiczna FP-12 ($n = 1$) i FP-14 ($n = 3$).

Fig. 5. Chemical structure of FP-12 ($n = 1$) and FP-14 ($n = 3$).

Obecność FP w kale człowieka związana jest z dietą bogatą w białka zwierzęce. W badaniach *in vitro* wykazano, że za powstawanie tych związków są odpowiedzialne bakterie jelitowe z rodzaju *Bacteroides* [9]. Pochodzenie prekursorów fekapentaenów jest dosyć niejasne: mogą pochodzić z diety, błon bakteryjnych lub tkanek jelita grubego. Syntezie tych związków mogą sprzyjać kwasy żółciowe [6].

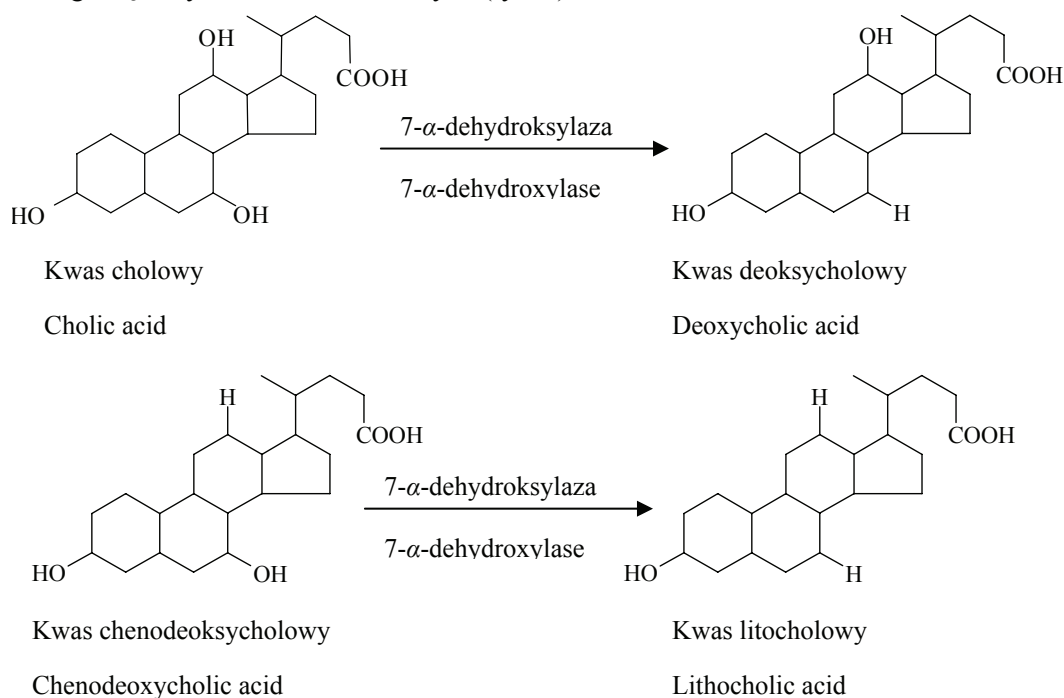
W teście Ames wykazano wysoką genotoksyczność fekapentaenów [20]. W badaniach *in vitro* z wykorzystaniem ludzkich fibroblastów wykazano, że są mutagenami bezpośrednimi powodującymi jednoniciowe pęknięcia DNA, mutacje genowe, aberracje chromosomowe, wymiany siostrzanych chromatyd, a także niekontrolowane syntezę DNA. Stwierdzono także, że FP mogą być czynnikami promującymi powstawanie guzów u szczurów [8]. Wyniki badań epidemiologicznych są całkowicie sprzeczne, ponieważ wskazują na niższy poziom FP w kale pacjentów z rakiem jelita grubego niż w próbach kontrolnych, natomiast w kale wegetarian (populacji o małym ryzyku zachorowalności na nowotwory jelit) związki te występowały w dużym stężeniu [20]. Rola fekapentaenów jako karcynogenów jest więc nadal niejasna.

Drugorzędowe kwasy żółciowe

Kwasy żółciowe są głównymi produktami metabolizmu cholesterolu powstającymi w wątrobie. Pierwszorzędowe kwasy żółciowe (kwas cholowy i chenodeoksycholowy) są wydzielane wraz z żółcią w postaci sprzężonej z glicyną i tauryną, tworząc kwas glikocholowy i taurocholowy [19]. Dzięki silnym właściwościom emulgującym żółć bierze udział w trawieniu pokarmów poprzez emulgowanie lipidów. Jednak ponad 97 % kwasów żółciowych jest reabsorbowanych do wątroby, reszta kierowana jest do jelita grubego i ulega dekonjugacji przy udziale bakteryjnej 7- α -dehydroksylazy. Ak-

tywność 7- α -dehydroksylazy stwierdzono u: *Clostridium leptum*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium sordellii*, *Eubacterium* sp., *Escherichia coli* oraz *Bacteroides* sp. [3].

W pierwszym etapie tauryna lub glicyna jest odłączana od kwasu taurocholowego i glikocholowego. W drugim etapie następuje dehydroksylacja powstałych w ten sposób pierwszorzędowych kwasów żółciowych (cholowego i chenodeoksycholowego) do drugorzędowych kwasów żółciowych (rys. 6).



Rys. 6. Przemiany pierwszorzędowych kwasów żółciowych do drugorzędowych kwasów żółciowych na drodze dehydroksylacji bakteryjnej w jelicie grubym.

Fig. 6. Transformation of primary bile acids to secondary bile acids via dehydroxylation pathway by intestinal microbiota.

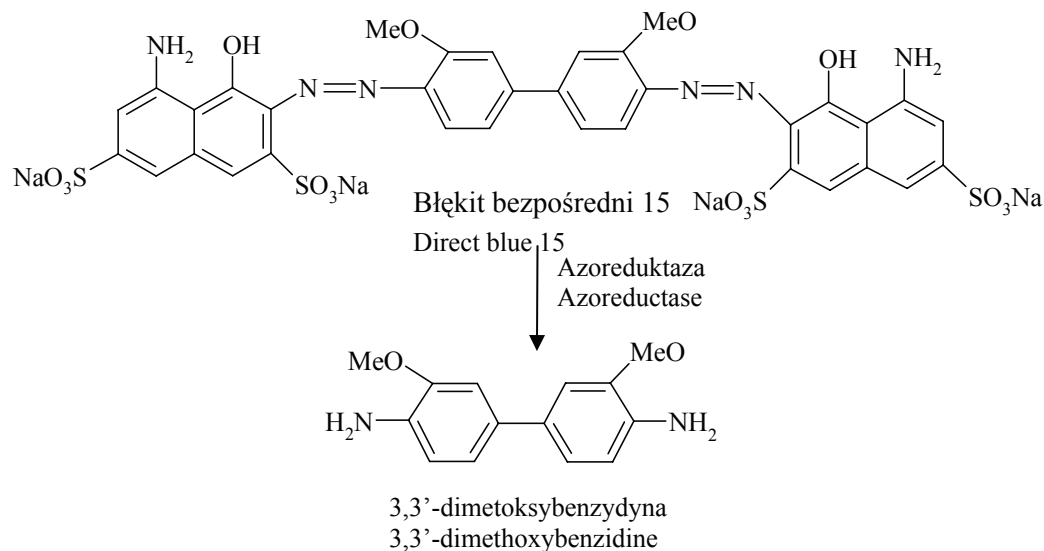
Dalsza bakteryjna degradacja w jelicie grubym prowadzi do powstania kwasów żółciowych trzeciorzędowych. Kwas deoksycholowy ulega częściowej absorpcji do wątroby, gdzie ulega sprzężeniu, po czym zostaje wydzielony wraz z żółcią. Kwas litocholowy nie ulega reabsorpcji. Oba związki są wydalane z kałem i stanowią 95 % całkowitej ilości wydalanych z organizmu kwasów żółciowych [15, 19].

Badania epidemiologiczne wykazują, że dieta bogata w mięso oraz tłuszcze zwierzęce powoduje zwiększoną degradację i wydalanie kwasów żółciowych, co wiąże się z powstawaniem toksycznego siarkowodoru odpowiedzialnego, m.in. za zapalenie

jelita grubego [19]. Dowiedziono, że drugorzędowe kwasy żółciowe sprzyjają rozwojowi raka jelita grubego, zachowując się jako promotory karcynogenezy [1, 5, 19]. Spowolniony pasaż jelitowy zwiększa poziom kwasu deoksycholowego, sprzyjając powstawaniu kamieni żółciowych. Eksperymenty przeprowadzone na kulturach tkankowych z wykorzystaniem kolonocytów dowiodły, że drugorzędowe kwasy żółciowe powodują uszkodzenia DNA takie, jak pęknięcia nici i formowanie reaktywnych adduktów (tj. reaktywnych form tlenu), ale także indukują apoptozę komórek oraz dają pozytywne rezultaty w teście komety *in vitro* z wykorzystaniem ludzkich kolonocytów HT29 [1, 5, 6].

Barwniki azowe

Barwniki azowe to związki aromatyczne zawierające jedną lub więcej grup azowych ($R_1-N=N-R_2$), które stosowane są na szeroką skalę w przemyśle tekstylnym, kosmetycznym, farmaceutycznym, drukarstwie i laboratoriach, a także w przemyśle spożywczym [3]. Barwniki stosowane jako dodatki do żywności nie mogą być szkodliwe dla zdrowia człowieka, jednakże mikroorganizmy jelitowe potrafią je degradować (zwłaszcza rozpuszczalne w wodzie barwniki azowe) do karcynogennych fenylo- i naftylo- podstawionych amin aromatycznych [3, 7]. W bardziej zindustrializowanych regionach, co wiąże się z użyciem barwników azowych na dużą skalę, częściej występują nowotwory jelita grubego [7]. Za redukcję barwników do amin aromatycznych odpowiada enzym bakteryjny - azoreduktaza, a wytworzone produkty pośrednie - wolne rodniki, łatwo reagują z DNA. Powstałe aminy są gromadzone w jelicie grubym, a następnie przy udziale enzymów mikrosomalnych obecnych w śluzie jelitowym utleniane do karcynogenów [7]. Główne mikroorganizmy o aktywności azoreduktazy to bakterie z rodzajów *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus* i *Fusobacterium* [4]. *Fusobacterium* sp. bierze udział w przemianie niemutagennego błękitu trypanowego do o-toluidyny, która w teście Ames wykazuje właściwości mutagenne oraz barwnika ponso 3R do mutagenu 2,4,5-trimetyloaniliny [3]. Zarówno mikroorganizmy jelitowe człowieka, jak i szczura są zdolne do redukcji wiązania azowego w barwnikach benzydynowych do ich karcynogennych pochodnych. Inne barwniki stosowane w przemyśle spożywczym - żółcień metylowa i oranż metylowy są metabolizowane przez jelitowe bakterie beztlenowe do mutagennej N,N-dimetylo-*p*-fenylenodiaminy. Czerwień bezpośrednia 2 oraz błękit bezpośredni 15 mogą być przekształcane do 3,3'-dimetoksybenzydiny (rys. 7).



Rys. 7. Bioaktywacja błękitu bezpośredniego 15 przez azoreduktazę bakterii jelitowych.

Fig. 7. Bioactivation of direct blue 15 by azoreductase of intestinal microbiota.

Natomiast produktami redukcji czerni bezpośredniej 38 może być benzydina, 4-aminobifenyl, 4-acetyloaminobifenyl oraz monoacetyl benzydiny. Wszystkie produkty metabolizmu bakteryjnego są mutagenne i karcynogenne [3].

Estrogeny

Istnieją kliniczne dowody, że hormony mają wpływ na rozwój nowotworów piersi. Estrogeny są produkowane przez jajniki z cholesterolu, wydzielane do krwiobiegu i transportowane do tkanek docelowych oraz wątroby. W wątrobie estron oraz estradiol są inaktywowane poprzez reakcję sprzęgania z glukuronidami lub siarczanami. Nieznaczna ich ilość jest wydzielana wraz z żółcią do jelita grubego, w którym część ulega dekoniugacji w wyniku aktywności bakteryjnej β -glukuronidazy oraz sulfatazy. Około 80 % estrogenów, które uległy dekoniugacji jest reabsorbowanych, natomiast reszta jest wydalana z organizmu wraz z moczem. Poza dekoniugacją estrogenów, bakterie mogą je przekształcać w wyniku reakcji oksydacji, redukcji lub dehydroksylacji. Mikroorganizmy jelitowe zwiększają aktywność biologiczną wchłoniętych estrogenów poprzez przekształcenie estronu w aktywny estradiol, zwiększając tym samym ryzyko zachorowania na hormono-zależnego raka piersi [18].

Podsumowanie

W jelicie grubym człowieka występuje złożony ekosystem mikroorganizmów, których aktywność metaboliczna może sprzyjać rozwojowi nowotworów jelita grubego. Enzymy bakteryjne (β -glukuronidaza, β -glukozydaza, nitroreduktaza, 7- α -dehydroksylaza, β -galaktozydaza, azoreduktaza) biorą udział w endogennej syntezie wielu związków karcynogennych, takich jak fenole i indole, aglikony flawonoidowe, barwniki azowe, fekapentaeny, estrogeny oraz drugorzędowe kwasy żółciowe. Badania epidemiologiczne wykazały, że syntezie niektórych związków sprzyja dieta bogata w białka oraz tłuszcze zwierzęce.

Literatura

- [1] Bernstein H., Bernstein C., Payne C.M., Dvorakova K., Garewal H.: Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutat. Res.*, 2005, **589**, 47-65.
- [2] Bresnick E.: Colon carcinogenesis. *Cancer*, 1980, **45**, 1047-1051.
- [3] Chadwick R.W., George E., Claxton L.D.: Role of intestinal mucosa and microflora in the bioactivation of dietary and environmental mutagens or carcinogens. *Drug Metab. Rev.*, 1992, **24**, 425-492.
- [4] Chung K.T., Stevens S.E., Cerniglia C.E.: The reduction of azo dyes by intestinal microflora. *Crit. Rev. Microb.*, 1992, **18**, 175-190.
- [5] Debruyne P.R., Bruyneel E.A., Li X., Zimmer A., Gespach C., Mareel M.: The role of bile acids in carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 2001, **480-481**, 359-369.
- [6] de Kok T.M.C.M., van Maanen J.M.S.: Evaluation of fecal mutagenicity and colorectal cancer risk. *Mutat. Res.*, 2000, **463**, 53-101.
- [7] Goldin B.R.: Intestinal microflora: metabolism of drugs and carcinogens. *Ann. Med.*, 1990, **22**, 43-48.
- [8] Hughes R., Magee E.A.M., Bingham S.: Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 2000, **1**, 51-58.
- [9] Hughes R., Rowland I.R.: Metabolic activities of the gut microflora in relation to cancer. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 2000, **12**, 179-185.
- [10] Hughes R., Cross A.J., Pollock J.R.A., Bingham S.: Dose - dependent effect of dietary meat and endogenous colonic N-nitrosation. *Carcinogenesis*, 2001, **22 (1)**, 199-202.
- [11] Macfarlane G.T., Cummings J.H., Allison C.: Protein degradation by human intestinal bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 1986, **132**, 1647-1656.
- [12] Macfarlane G.T., Cummings J.H.: Diet and the metabolism of intestinal bacteria. In: Brostoff J., Challacombe J.S.: *Food allergy and intolerance*. Saunders-Published, Londyn 2002, pp. 321-341.
- [13] McBain A.J., Macfarlane G.T.: Ecological and physiological studies on large intestinal bacteria in relation to production of hydrolytic and reductive enzymes involved in formation of genotoxic metabolites. *J. Med. Microbiol.*, 1998, **47**, 407-416.
- [14] McDonald T.A., Holland N.T., Skibola C., Smith M.T.: Hypothesis: phenol and hydroquinone derived mainly from diet and gastrointestinal flora activity are casual factors in leukemia. *Leukemia*, 2001, **15**, 10-20.
- [15] Nagengast F.M., Grubben M.J.A.L., van Munster I.P.: Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. *Eur. J. Cancer*, 1991, **31A**, 1067-1070.
- [16] Nowak A., Libudzisz Z.: Mutagenne i karcynogenne metabolity tworzone przez mikroflorę jelita grubego człowieka. *Post. Mikrobiol.*, 2004, **43 (3)**, 321-339.

- [17] Nowak A., Libudzisz Z.: Karcynogeny w przewodzie pokarmowym człowieka. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, **4** (59),
- [18] Parodi P.W.: The role of intestinal bacteria in the causation and prevention of cancer: modulation by diet and probiotics. *Aus. J. Dairy Technol.*, 1999, **54**, 103-120.
- [19] Ridlon J.M., Kang D.J., Hylemon P.B.: Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lip. Res.*, 2006, **47**, 241-259.
- [20] Schiffman M.H., Wilkins T.D. i wsp.: Case – control study of colorectal cancer and faecal mutagenicity. *Cancer Res.*, 1989, **49**, 3420-3424.
- [21] Smith E.A., Macfarlane G.T.: Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *J. Appl. Bacteriol.*, 1996, **81**, 288-302.
- [22] Smith E.A., Macfarlane G.T.: Dissimilatory amino acid metabolism in human colonic bacteria. *Anaerobe*, 1997, **3**, 327-337.
- [23] Smith E.A., Macfarlane G.T.: Formation of phenolic and indolic compounds by anaerobic bacteria in the human large intestine. *Microb. Ecol.*, 1997, **33**, 180-188.
- [24] Smith E.A., Macfarlane G.T.: Enumeration of amino acid fermenting bacteria in the human large intestine: effects of pH and starch on peptide metabolism and dissimilation of amino acids. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1998, **25**, 355-368.
- [25] Van Tassell R.L., Kingston D.G.I., Wilkins T.D.: Metabolism of dietary genotoxins by the human colonic microflora: the fecapentaenes and heterocyclic amines. *Mutat. Res.*, 1990, **238**, 209-221.
- [26] YCIMR, Yakult Central Institute for Microbiological Research (ed.): In: *Lactobacillus casei* strain Shirota – Intestinal flora and human health. Yakult Honhsa Co. Ltd., Tokyo 1999, pp. 1-288.
- [27] INCHEM – Chemical safety information, <http://inchem.org/>
- [28] Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>

CARCINOGENIC ACTIVITY OF INTESTINAL MICROBIOTA

S u m m a r y

Human colon is harboured by a complex ecosystem containing up to 1000 species of microorganisms. The intestinal microbiota play a crucial role in the metabolism of food components and in ensuring health. Many products of the metabolism can favour the development of colon tumours. The main role in the formation of carcinogenic compounds play bacterial enzymes such as: β -glucuronidase, β -glucosidase, nitroreductase, 7- α -dehydroxylase, β -galactosidase, and azoreductase. Their products can be compounds harmful to human health, such as: phenolic and indolic compounds, flavonoid aglycones, azo dyes, fecapentaens, oestrogens, and secondary bile acids.

Key words: intestinal microbiota, carcinogens 