

The role of the gut microbiota in human cancer

Citation for published version (APA):

Ziemons, J. (2024). *The role of the gut microbiota in human cancer: the power of an equilibrium*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20240208jz>

Document status and date:

Published: 01/01/2024

DOI:

[10.26481/dis.20240208jz](https://doi.org/10.26481/dis.20240208jz)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Chapter 10

Summary / Samenvatting

Summary

The role of the gut microbiota in human cancer - The power of an equilibrium

The present thesis investigates how chemotherapy and cancer cachexia might challenge the gut microbial equilibrium. Furthermore, it shows that prebiotics represent a promising strategy to restore or maintain this equilibrium in cancer patients.

As an introduction into the topic, **Chapter 1** familiarizes the reader with some important concepts of gut microbiota research as well as prior research in the field of the gut microbiota in human cancer. Furthermore, prebiotics, probiotics, synbiotics, postbiotics, other dietary interventions, fecal microbiota transplantation and antibiotics are presented as potential strategies to influence gut microbiota composition.

1. The gut microbiota and chemotherapy

Chapter 2 provides a systematic overview of clinical research concerning the interactions between the gut microbiota and systemic anti-cancer therapies, more specifically chemotherapy, immunotherapy and hormonal therapy. This review indicates not only that the administration of systemic treatments affects the gut microbiota, but that gut bacteria could also influence the outcome of these treatments. However, generalizability of these results is limited because of large differences in study design and sampling timepoints, as well as a considerable heterogeneity in patient characteristics.

The following chapters focus on mutual relationships between gut bacteria and the chemotherapeutic compound 5-Fluorouracil (5-FU). In **Chapter 3**, we analyze microbial diversity (α -diversity), community structure (β -diversity), and bacterial abundances during three cycles of capecitabine in patients with metastatic or unresectable colorectal cancer (CRC). In this relatively small cohort of 33 patients, we do not identify consistent 5-FU-induced effects on gut microbiota composition and no associations between gut microbiota parameters and tumor response. Nevertheless, this pilot study provides a framework and insights into potential challenges of gut microbiota research in complex patient cohorts, which will be of significant benefit for future longitudinal studies in similar populations.

In 44 patients derived from the same patient cohort, we also quantify fecal levels of the gut bacteria-derived short-chain fatty acids (SCFA) and branched-chain fatty acids (BCFA) (**Chapter 4**). Particularly SCFA have been previously described to exert beneficial metabolic, anti-inflammatory, as well as anti-carcinogenic effects. In our cohort, fecal levels of the SCFA valerate and caproate decrease significantly during three cycles of capecitabine. Furthermore, baseline levels of the BCFA iso-butyrate are significantly lower in fecal samples from patients with partial response, compared to patients with stable disease or progressive disease, indicating a potential link between BCFA levels and tumor response to 5-FU-based chemotherapy. Nutritional status (MUST score), physical performance (Karnofsky Performance Score), and chemotherapy-induced toxicity (CTCAE criteria) are not significantly associated with SCFA or BCFA in these patients. Surprisingly, baseline SCFA correlate positively with blood neutrophil counts, which is contradictory to the expected anti-inflammatory effects. To combine data on bacterial abundances with metabolite data, different associations between SCFA/BCFA and the abundance of bacterial families are described.

As a follow-up of these two clinical studies, the effects of 5-FU on both gut microbiota composition, as well as SCFA/BCFA levels are investigated using the TNO *in vitro* model of the colon (TIM-2) and a human-derived microbial consortium (**Chapter 5**). The use of this validated, computer-controlled model, that closely mimics the physiological conditions of the colon, allows the close monitoring of molecular gut microbiota-chemotherapy interactions in a more controlled setting. By means of these *in vitro* experiments, we identify 5-FU-induced microbiota shifts, and demonstrate that these shifts could be counteracted by the addition of prebiotics during 5-FU treatment. Consequently, it is hypothesized that prebiotics might represent a promising strategy to prevent manifestation of microbial dysbiosis during 5-FU-based chemotherapy and that this requires further investigation in a clinical setting.

In **Chapter 6** we investigate the gut microbiota in 44 postmenopausal breast cancer patients during combinatorial treatment with Adriamycin, Cyclophosphamide and Docetaxel (AC-D) and identify AC-D-induced gut microbiota changes. More specifically, abundance of *Ruminococcaceae NK4A214 group*, *Christensenellaceae R7 group*, *Ruminococcaceae UCG-005* and *Marvinbryantia* decreases during AC-D, while abundance of Proteobacteria, unclassified Enterobacterales and *Lactobacillus* increases. Furthermore, the occurrence of diarrhea during the Docetaxel cycles seems to be associated with microbial species richness. However, there is no association between the gut microbiota and tumor response in a subgroup of patients who received AC-D in the neoadjuvant setting.

2. The gut microbiota and cancer cachexia

Another aspect of human cancer that is investigated in the context of this thesis, is cancer cachexia, a metabolic wasting syndrome. In **Chapter 7**, we summarize the current knowledge about cachexia-associated gut microbiota profiles, as described in previous (preclinical) research. Furthermore, we describe associations between gut bacteria and different metabolic hallmarks of cancer cachexia, including systemic inflammation, gut permeability, muscle wasting, insulin sensitivity, food intake, as well as body weight regulation.

Subsequently, **Chapter 8** presents one of the first clinical gut microbiota studies in the context of cancer cachexia. For this cross-sectional study, patients suffering from pancreatic-, breast-, lung-, or ovarian cancer are included before treatment initiation and are classified as being either cachectic or non-cachectic, based on weight loss. As a control group, cancer-free partners are included. This study indicates that abundance of the pro-inflammatory Proteobacteria, a genus from the Enterobacteriaceae family, as well as *Veillonella* are enriched in cachectic cancer patients, while the genera *Megamonas* and *Peptococcus* are more abundant in non-cachectic cancer patients. In addition, fecal levels of SCFA tend to be reduced in cachectic cancer patients, but this is statistically significant for acetate only. Markers of intestinal inflammation (calprotectin) or systemic inflammation (CRP and leukocyte counts) are not significantly elevated in cachectic cancer patients.

To conclude, **Chapter 9** integrates the results from all previous chapters and provides a framework, as well as practical recommendations for future studies, with the aim to stimulate and facilitate further research in this field.

Samenvatting

De rol van de darmmicrobiota bij humane kanker - De kracht van een evenwicht

Dit proefschrift onderzoekt hoe chemotherapie en cachexie het evenwicht van de darmmicrobiota mogelijk kunnen verstoren. Bovendien toont het aan dat prebiotica een veelbelovende strategie vormen om het microbiële evenwicht in kankerpatiënten te herstellen of te behouden.

In **Hoofdstuk 1** wordt de lezer ingeleid in het onderwerp en worden belangrijke concepten van darmmicrobiota onderzoek besproken, evenals eerdere onderzoeken op het gebied van de darmmicrobiota bij kanker. Verder worden prebiotica, probiotica, synbiotica, postbiotica, andere voedingsinterventies, fecale microbiota-transplantatie en antibiotica gepresenteerd als mogelijke strategieën om de samenstelling van de darmmicrobiota te beïnvloeden.

1. De darmmicrobiota en chemotherapie

Hoofdstuk 2 geeft een systematisch overzicht van klinisch onderzoek naar de interacties tussen de darmmicrobiota en systemische behandeling van kanker, meer specifiek chemotherapie, immunotherapie en hormonale therapie. Uit dit overzicht blijkt niet alleen dat de systemische behandelingen invloed kunnen hebben op de darmmicrobiota, maar ook dat de darmmicrobiota de uitkomst van deze behandelingen kan moduleren. De generaliseerbaarheid van deze resultaten is echter beperkt vanwege grote verschillen in onderzoeksopzet en verzamelingstijdstippen, evenals aanzienlijke heterogeniteit in patiëntkenmerken.

De volgende hoofdstukken richten zich op wederzijdse relaties tussen darmbacteriën en het chemotherapeutische middel 5-Fluorouracil (5-FU). In **Hoofdstuk 3** analyseren we de diversiteit (α -diversiteit) en samenstelling (β -diversiteit) van de darmmicrobiota, evenals de relatieve hoeveelheid van specifieke bacteriën tijdens drie cycli van capecitabine bij patiënten met gemetastaseerde of niet-resectabele colorectaal carcinoom. In deze groep van 33 patiënten identificeren we geen consistente effecten van 5-FU op de samenstelling van de darmmicrobiota en geen verbanden tussen darmmicrobiota parameters en tumorrespons. Desondanks biedt deze pilotstudie inzichten in potentiële uitdagingen van darmmicrobiota onderzoek bij complexe patiëntenpopulaties. Dit zal aanzienlijke voordelen opleveren voor toekomstige longitudinale studies in vergelijkbare populaties.

Bij 44 patiënten uit dezelfde patiëntenpopulatie hebben we ook de fecale concentraties van korteketenvezuren (SCFA) en vertakte-ketenvetzuren (BCFA) gemeten (**Hoofdstuk 4**). Deze metaboliëten worden geproduceerd door de darmmicrobiota. Met name SCFA werden eerder beschreven als stoffen met gunstige metabole, ontstekingsremmende en anti-carcinogene effecten. In onze patiëntengroep nemen de fecale waarden van de SCFA valeraat en caproaat significant af gedurende drie cycli van capecitabine. Bovendien zijn de basis concentraties van de BCFA iso-butyraat significant lager in fecale monsters van patiënten met een gedeeltelijke respons in vergelijking met patiënten met stabiele ziekte of progressieve ziekte, wat wijst op een mogelijk verband tussen BCFA en de tumorrespons op 5-FU-gebaseerde chemotherapie. Voedingsstatus (MUST-score), fysieke conditie (Karnofsky Performance Score) en toxiciteit (CTCAE-criteria) vertonen geen significante associaties met SCFA of

BCFA bij deze patiënten. Het valt echter op dat de basis waarden van SCFA positief correleren met het aantal neutrofielen in het bloed, wat in tegenspraak is met de verwachte ontstekingsremmende effecten. Daarnaast beschrijven we ook verschillende associaties tussen SCFA/BCFA en bacteriële families.

Als vervolg op deze twee klinische onderzoeken worden de effecten van 5-FU op zowel de samenstelling van de darmmicrobiota als ook op SCFA/BCFA concentraties onderzocht. Hiervoor wordt het TNO *in vitro* model van het colon (TIM-2) en een menselijke microbiota gebruikt (**Hoofdstuk 5**). Het gebruik van dit gevalideerde, computer-gecontroleerde model, dat de fysiologische omstandigheden van het colon simuleert, maakt het mogelijk om moleculaire interacties tussen de darmmicrobiota en chemotherapie in een gecontroleerde omgeving te monitoren. Met behulp van deze *in vitro* experimenten identificeren we 5-FU-geïnduceerde verschuivingen in de microbiota en tonen we aan dat deze verschuivingen kunnen worden tegengegaan door de toevoeging van prebiotica tijdens de behandeling met 5-FU. Hieruit volgt de hypothese dat prebiotica een veelbelovende strategie kunnen vormen om microbiële dysbiose tijdens 5-FU-gebaseerde chemotherapie te voorkomen, en dat dit verder onderzocht moet worden in een klinische setting.

In **Hoofdstuk 6** onderzoeken we de darmmicrobiota bij 44 postmenopauzale borstkankerpatiënten tijdens de combinatietherapie met Adriamycine, Cyclofosfamide en Docetaxel (AC-D). Bij deze patiënten zijn AC-D-geïnduceerde veranderingen in de darmmicrobiota gevonden. De hoeveelheid van *Ruminococcaceae NK4A214-groep*, *Christensenellaceae R7-groep*, *Ruminococcaceae UCG-005* en *Marvinbryantia* neemt af tijdens AC-D, terwijl de hoeveelheid van Proteobacteria, ongeclassificeerde Enterobacterales en *Lactobacillus* toeneemt. Bovendien lijkt het optreden van diarree tijdens Docetaxel geassocieerd te zijn met het aantal verschillende darmbacteriën. Er is echter geen verband gevonden tussen de darmmicrobiota en tumorrespons bij een subgroep van patiënten die AC-D in de neoadjuvante setting kregen.

2. De darmmicrobiota en cachexie

Een ander aspect van kanker, dat in het kader van dit proefschrift wordt onderzocht, is cachexie, een metabool wasting syndroom. In **Hoofdstuk 7** wordt de huidige kennis over cachexie-geassocieerde darmmicrobiota profielen samengevat. Deze kennis komt vooral voort uit eerdere (preklinische) onderzoeken. Bovendien beschrijven we de verbanden tussen de darmmicrobiota en verschillende metabole kenmerken van cachexie, waaronder systemische ontsteking, integriteit van de darmbarrière, spierverlies, insulinegevoeligheid, voedselinname en gewichtsregulatie.

Vervolgens presenteert **Hoofdstuk 8** een van de eerste klinische studies naar de darmmicrobiota in het kader van cachexie. Voor deze cross-sectionele studie worden patiënten met alveesklier-, borst-, long- of eierstokcarcinoom geïncubeerd vóór aanvang van de behandeling en geïncubeerd als cachectisch of niet-cachectisch op basis van gewichtsverlies. Als controlegroep worden partners van patiënten zonder carcinomen opgenomen. Deze studie geeft aan dat de pro-inflammatoire Proteobacteria, een genus uit de Enterobacteriaceae-familie, en *Veillonella* verhoogd zijn bij cachectische kankerpatiënten, terwijl *Megamonas* en *Peptococcus* meer aanwezig zijn bij niet-cachectische kankerpatiënten.

Bovendien neigen de fecale concentraties van SCFA verlaagd te zijn bij cachectische patiënten, maar dit is alleen voor acetaat statistisch significant. Markers van darmontsteking (calprotectine) of systemische ontsteking (CRP en leukocytenaantallen) zijn niet significant verhoogd door cachexie.

Tot slot integreert **Hoofdstuk 9** de resultaten van alle voorgaande hoofdstukken en biedt een raamwerk en praktische aanbevelingen voor toekomstige studies, met als doel verdere onderzoeken in dit vakgebied te stimuleren en te faciliteren.

