

# Utjecaj mikroba na terapije tumora

---

Čulo, Anja

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:061362>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

# **UTJECAJ MIKROBA NA TERAPIJE TUMORA**

## **THE IMPACT OF MICROBES ON TUMOR THERAPIES**

### **SEMINARSKI RAD**

**Anja Čulo**

**Preddiplomski studij molekularne biologije**  
**(Undergraduate Study of Molecular Biology)**

**Mentor: doc. dr. sc. Ivana Ivančić Bačić**

**Zagreb, 2014.**

## Sadržaj

1. Uvod.....	2
2. Utjecaj mikroba na imunološki sustav.....	3
3. Utjecaj mikroba na terapije tumora.....	4
3.1. Imunoterapija CpG-oligonukleotidima.....	4
3.2. Kemoterapija spojevima platine.....	7
3.3. Kemoterapija ciklofosfamidom.....	9
3.4. Kemoterapija kamptotekinom.....	13
4. Zaključak.....	16
5. Literatura.....	16
6. Sažetak.....	19
7. Summary.....	19

# 1. Uvod

Ljudsko tijelo ne sadrži samo ljudske stanice. Naseljava ga oko  $10^{14}$  mikroba i  $10^{15}$  virusa. Ta kompleksna zajednica sadrži taksone iz različitih domena života: bakterija, arheja i eukariota. Geni tih organizama stvaraju naš mikrobiom. Njihova međusobna interakcija i interakcija s imunološkim sustavom doma ina ima veliki utjecaj na zdravlje ovjeka (Clemente i sur. 2012).

Mikrobi naseljavaju sve površine ljudskog tijela koje su u dodiru s okolišem. Većina ih se nalazi u probavnom traktu (Peterson i sur. 2009), ali se nalaze i u ustima (Nasidze i sur. 2009), u vagini (Ravel i sur. 2011) i na koži (Costello i sur. 2009). Zajednice bakterija na određenim dijelovima tijela pojedinaca su različite, ali ipak postoji interindividualna varijabilnost (Costello i sur. 2009). Različiti faktori utječu na sastav mikroba. Specifični geni doma ina utječu na sastav bakterija (Benson i sur. 2010), ali ne i virusa (Reyes i sur. 2010). Sastav bakterija, virusa i eukariota zdravih odraslih osoba je stabilan tijekom vremena. Za stabilnost su važni konstantni okolišni faktori i prehrana (Clemente i sur. 2012).

Sastav mikroba mijenja se od rođenja do starosti. Dugo vremena se smatralo da su fetusi u maternici sterilni, ali je kasnije pokazano da amnionska tekućina sadrži bakterije (Jimenez i sur. 2008). Najraniji uzorak stolice novorođeneta sadrži male količine bakterija (Koenig i sur. 2011). Nakon rođenja, novorođenad je izložena mikrobima iz majčine vagine ili s kože, ovisno o načinu porođaja (Dominguez-Bello i sur. 2010). Raznolikost bakterija i virusa nakon rođenja je vrlo niska, a zatim se povećava tijekom razvoja (Clemente i sur. 2012). Rani kolonizatori probavila su obično aerotolerantni, a kasnije se zamjenjuju anaerobima. Krajem prve godine života sastav mikroba se počinje razvijati prema onome kakav pronalazimo kod odraslih jedinki (Palmer i sur. 2007). U crijevima odraslog ovjeka dominiraju bakterije iz koljena *Bacteroidetes* i *Firmicutes*. Tijekom starosti dolazi do veće varijabilnosti u sastavu bakterija vjerojatno zbog bolesti i veće upotrebe lijekova (Clemente i sur. 2012).

Jedan od glavnih faktora koji može utjecati na sastav mikroba je upotreba antibiotika. S njima treba biti jako oprezan jer prekomjerna upotreba dovodi do stvaranja otpornih patogena. Neke bakterijske vrste se ne oporavljaju i do nekoliko mjeseci nakon tretmana, a dugoročno dolazi do smanjene raznolikosti bakterija. Upotrebom antibiotika smanjuju se kolonizacijske sposobnosti vrsta koje se nalaze u probavilu što može dovesti do pojačanog rasta stranih mikroba koji mogu uzrokovati različite bolesti (Clemente i sur. 2012).

U prošlosti su bolesti promatrane sa stajališta: „jedan mikrob – jedna bolest“. Bakterije, eukarioti i virusi su proučavani u uvjetima u kojima se smatralo da uzrokuju bolest. No, to se pokazalo neispravnim. S obzirom na to da ljudsko tijelo naseljavaju brojni mikrobi, ispostavilo se da su neke bolesti rezultat disbioze, a ne pojedinog patogena. Takve bolesti su dijabetes, pretilost te različite autoimune bolesti i alergije. Mikrobi sudjeluju u složenim interakcijama koje utječu na fenotip i liječenje bolesti. U budućnosti bi liječenje moglo uključivati aktivnu modulaciju sastava virusa i mikroba. Stvaranje zdrave mikrobne populacije bi se moglo postići i transplantacijom stranih mikroba. Sastav mikrobnih zajednica može se mijenjati i korištenjem antibiotika (Clemente i sur. 2012).

## 2. Utjecaj mikroba na imunološki sustav

Sisavci i mikrobi koevoluiraju milijunima godina pa stoga nije neobično složena interakcija između ljudskog imunološkog sustava i simbiotskih mikroba. Mikrobi su potrebni za razvoj prirodne i stečene imunosti. U modernom okruženju mnogi ljudi nisu izloženi mikrobima potrebnima za razvoj normalnog imunološkog sustava što uzrokuje porast broja osoba s autoimunim bolestima i alergijama u razvijenim zemljama. Prirodni imunološki sustav prepoznaje opće molekule koje su prisutne kod velikog broja različitih bakterija kao što su komponente stanične stijenke (lipopolisaharid i peptidoglikan) i flagelin. *Toll-like* receptori (TLRs) su proteini koje domaćin koristi kako bi prepoznao takve antigene. Kad ti proteini nisu prisutni ili su mutirani, imunološki sustav u probavilu se ne razvija normalno. Simbiotski mikrobi utječu i na diferencijaciju T-limfocita (Clemente i sur. 2012).

Za imunološki sustav domaćina važna je sposobnost razlikovanja je li neka bakterija patogen ili simbiot. Prirodni imunološki sustav prepoznaje molekule koje su univerzalne. Stoga je za diskriminaciju bakterija zadužen stečeni imunološki sustav. On prepoznaje antigene i ovisno o njima pokreće proupalne ili antiupalne odgovore. Mikrobi utječu na diferencijaciju CD4<sup>+</sup> T-limfocita u pro- ili antiupalne skupine. Oni nastaju u timusu, a nakon toga odlaze na periferiju gdje različiti signali utječu na njihovo sazrijevanje i funkciju (Lee i Mazmanian 2010).

U 19. stoljeću Rudolf Virchow je uočio prisutnost leukocita unutar tumora. To je bila prva indikacija koja upućuje na povezanost upalnih procesa i tumora. Danas se zna da upalni odgovori igraju odličnu ulogu u različitim fazama razvoja tumora te u reakcijama tumora

na terapije. Mnogi okolišni uzročnici tumora su povezani s nekom vrstom kronične upale. Upale utječu na odgovor imunološkog sustava, a inače na tumor pa se zato koriste u imunoterapijama i za povećanje učinkovitosti kemoterapija. U nekim slučajevima upale mogu i oslabiti učinkovitost terapije (Grivennikov i sur. 2010).

### **3. Utjecaj mikroba na terapije tumora**

Postoje različiti načini borbe protiv tumora: kemoterapija, operacija, terapija zračenjem, usmjerena terapija, imunoterapija, hipertermija, transplantacija matičnih stanica, fotodinamička terapija, terapija pomoću lasera i transfuzija krvi i krvnih produkata (www.cancer.org). Prilikom kemoterapije koriste se kemijske supstance koje se mogu podijeliti u nekoliko kategorija: alkilirajuć i agensi (ciklofosfamid, ifosfamid), antraciklinski antibiotici (doksorubicin, bleomicin), spojevi platine (cisplatin, oksaliplatin), inhibitori mitoze (vinkristin), antimetaboliti (5-fluorouracil), derivati kamptotekina (topotekan), modifikatori biološkog odgovora (interferon) i hormoni. U terapijama zračenjem koriste se X-zrake, gama-zrake i, rjeđe, zračenje pomoću protona i neutrona. Zračenje stvara slobodne radikale koji zatim uništavaju stanice raka (Ozben 2006). Imunoterapije koriste imunološki sustav cijelog organizma za borbu protiv tumora. Iako su stanice raka manje imunogene od patogena, imunološki sustav ih je sposoban prepoznati i uništiti (Blattman i Greenberg 2004).

Različite terapije mijenjaju mikrookolinu tumora i time potiču imunološki odgovor koji uništava tumor. Upalne stanice povezane s tumorima potiču proliferaciju stanica tumora i guše antitumorsku imunost. S obzirom na to da mikrobi iz probavnog sustava utječu na upale i imunost, ne samo lokalno već i u cijelome tijelu, postavlja se pitanje mogu li oni doprinosti terapijama tumora (Iida i sur. 2013).

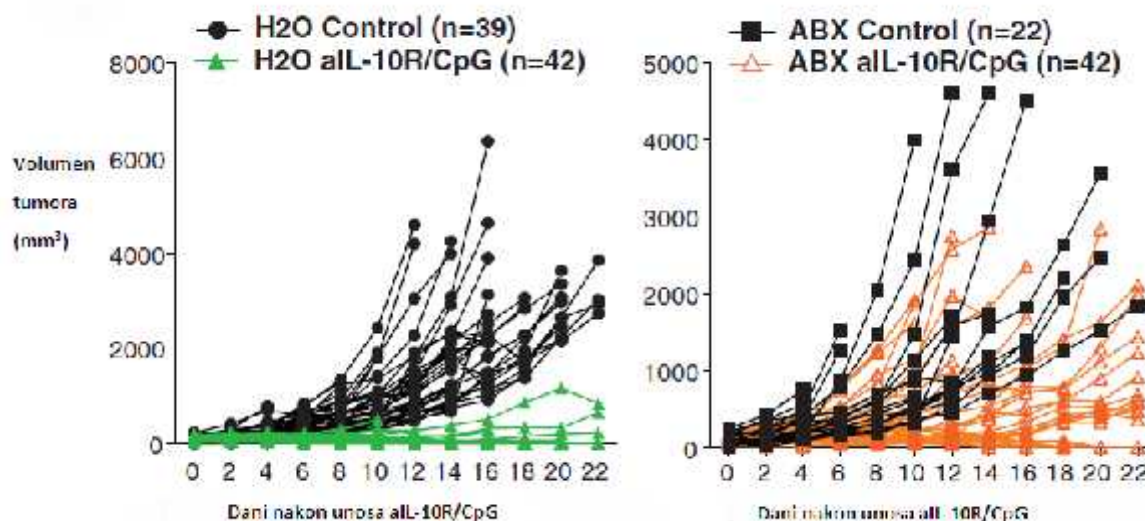
#### **3.1. Imunoterapija CpG-oligonukleotidima**

Imunogena svojstva DNA su otkrivena 1984. kad je primijećeno da DNA izolirana iz *Mycobacterium tuberculosis* aktivira NK stanice i potiče regresiju tumora. Daljnjim istraživanjima je utvrđeno da su za to zaslužne CpG sekvence u bakterijskoj DNA. Te sekvence su kod kralješnjaka obično metilirane. Sintetički oligodeoksinukleotidi (ODN) koji sadrže CpG motive pokazuju slična svojstva kao bakterijska DNA. Njihova biološka aktivnost ovisi o bazama na 5' i 3' krajevima. Metilacija citozina unutar CpG motiva poništava imunogena svojstva (Carpentier i sur. 2003). CpG-ODN imaju modificiranu fosfotioratnu

okosnicu koja ih ini otpornima na endonukleaze (Jahrsdörfer i Weiner 2008). Bakterijska DNA i CpG-ODN direktno aktiviraju B-limfocite i dendriti ke stanice kod sisavaca te makrofage kod miševa i štakora. Dendriti ke stanice su važne za obranu od patogena, ali i za poticanje antitumorskog odgovora (Vicari i sur. 2002). Aktivacijom dendriti kih stanica dolazi do izlu ivanja citokina što vodi do aktivacije T-limfocita i NK-stanica. CpG-ODN u stanice vjerojatno ulaze endocitozom gdje aktiviraju razli ite signalne puteve. *Toll-like* receptor 9 (TLR9) je najvažnija komponenta za prepoznavanje CpG-ODN. On je dio uro ene imunosti i važan je za prepoznavanje mikroba (Carpentier i sur. 2003). CpG-ODN poti e stanice na ekspresiju TLR9 (Shirota i sur. 2012). CpG-ODN se mogu koristiti sami, u kombinaciji s antitijelima ili antigenima i s dendriti kim stanicama (Carpentier i sur. 2003). Dodatak antitijela za receptor interleukina 10 (anti-IL-10R) pokazuje snažniju antitumorsku aktivnost od samog CpG-ODN i poti e antitumorsku imunološku memoriju (Vicari i sur. 2002). Istraživanja na modelnim organizmima pokazuju da CpG-ODN može pove ati antitumorsku aktivnost u kombinaciji s kemoterapijom i radioterapijom, no klini kim ispitivanjima je utvr eno da ne poboljšava u inak kemoterapije (Jahrsdörfer i Weiner 2008). Efikasnost terapije je ve a kad se CpG-ODN injektira direktno u tumor. Unutar mikrookoliša tumora, CpG-ODN pove ava broj T-limfocita i NK stanica (Shirota i sur. 2012).

Kako bi istražili utjecaj simbiotskih bakterija na upalne procese u mikrookolišu tumora, znanstvenici su miševima davali koktel antibiotika (ABX), koji se sastoji od vankomicina, imipenema i neomicina, po evši tri tjedna prije inokulacije tumora. Za potkožnu inokulaciju su izabrane tri vrste tumora s obzirom na osjetljivost na terapiju: EL4 limfom, MC38 karcinom debelog crijeva i B16 melanom. Miševi su analizirani ili tretirani kad su tumori dosegнули promjer 4 mm. Predterapijska analiza ekspresije gena kod MC38 i EL4 tumora pokazala je smanjenu ekspresiju gena povezanih s upalom, fagocitozom i prezentacijom antigena, a pove anu kod gena zaduženih za razvoj tikva, rak i metabolizam (Iida i sur. 2013).

Miševi s MC38 i B16 su tretirani kombinacijom intratumoralnih CpG-oligonukleotida (ODN), ligandom *Toll-like* receptora 9 (TLR9) i antitijelima za receptor interleukina 10 (IL-10). Ova imunoterapija usporava rast tumora i produžuje život induciranjem hemoragijske nekroze pomo u faktora nekroze tumora (TNF) koji proizvode mijeloidne stanice povezane s tumorom. Ovaj tretman je inducirao nekrozu tumora u kontrolnoj skupini miševa s MC38. Efikasnost terapije je smanjena u miševima tretiranim s ABX što je prikazano na Slici 1.



**Slika 1.** Volumen tumora MC38 kod kontrolne skupine (lijevo) i životinja tretiranih s ABX (desno). Zelenim i naran astim su označene životinje podvrgnute anti-IL-10R/CpG terapiji (preuzeto iz: Iida i sur. 2013).

ABX je značajno smanjio ekspresiju *Tnf* induciranu pomoću CpG-ODN i uestalost TNF-pozitivnih leukocita u MC38 tumorima. Smanjio je uestalost stanica koje proizvode TNF i količinu citokina po stanici kod različitih vrsta leukocita. Nakon anti-IL-10R/CpG-ODN terapije, tumori miševa tretiranih s ABX su pokazali smanjenu ekspresiju proupalnih *Il1a*, *Il1b*, *Il12b* i *Cxcl10* gena, ali ne i antiupalnih *Il10*, *Il1rn*, *Socs3* i *Nos2* gena. GF (*germ-free*) i SPF (*specific pathogen-free*) miševi s MC38 tumorom su primili anti-IL-10R/CpG-ODN terapiju. Tumori GF miševa su proizvodili značajno manje količine TNF-a. Ovi rezultati pokazuju da smanjenje populacije mikroba utječe na efikasnost terapije. Simbiotski mikrobi potiču u mijeloidne stanice povezane s tumorom na proizvodnju citokina kao odgovor na terapiju. ABX i nedostatak mikroba blokiraju taj odgovor i TNF-ovisnu nekrozu tumora. Prva je produkcija TNF-a u ovisnosti o sastavu fekalnih mikroba kako bi se utvrdio utjecaj pojedinih bakterijskih vrsta na antitumorski odgovor. Korištene su dvije skupine mikroba: 1) tretman s ABX tijekom tri tjedna nakon čega je uslijedio oporavak jedan do četiri tjedna i 2) tretman pojedinačnim antibiotikom tijekom tri tjedna. Količina bakterija se vratila na predtretmansko stanje tjedan dana nakon prestanka uzimanja ABX. Raznolikost bakterija je postupno rasla, ali nije dosegla prijašnje stanje. Kako bi se vratila normalna ekspresija gena *Tnf* potrebna su bila četiri tjedna. Pojedinačni antibiotici su pokazali varijabilnost u utjecaju na ekspresiju *Tnf*. Jedino je imipenem dosljedno smanjio ukupnu prisutnost bakterija. Identificirani su rodovi bakterija koji su pozitivno ili negativno korelirali s ekspresijom *Tnf*. Rod *Lactobacillus* je pokazao negativnu korelaciju. Uključuje vrste *L. murinum*, *L. intestinalis* i *L. fermentum*. Za posljednju je od prije poznato da ima antiupalni i inak.

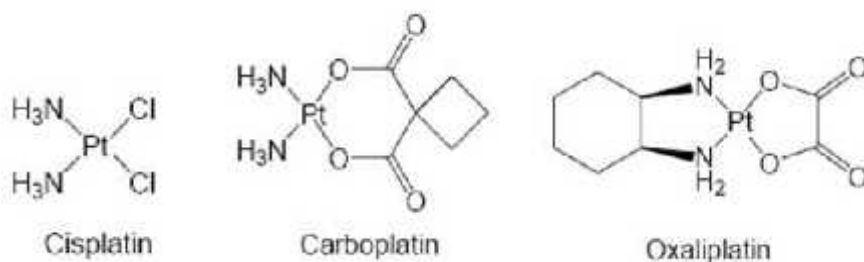


Pozitivnu korelaciju su pokazali rodovi *Ruminococcus* i *Alistipes* (*A. shahii*). Vrste roda *Lactobacillus* su se brzo oporavila nakon prestanka ABX tretmana. Oporavak rodova *Ruminococcus* i *Alistipes* je duže trajao i poklopio se s obnovom TNF odgovora. Davanje uzgojene *A. shahii* miševima prethodno tretiranim s ABX je obnovilo sposobnost mijeloidnih stanica povezanih s tumorom da proizvode TNF. Davanje *L. fermentum* netretiranim miševima je ublažilo odgovor (Iida i sur. 2013).

### 3.2. Kemoterapija spojevima platine

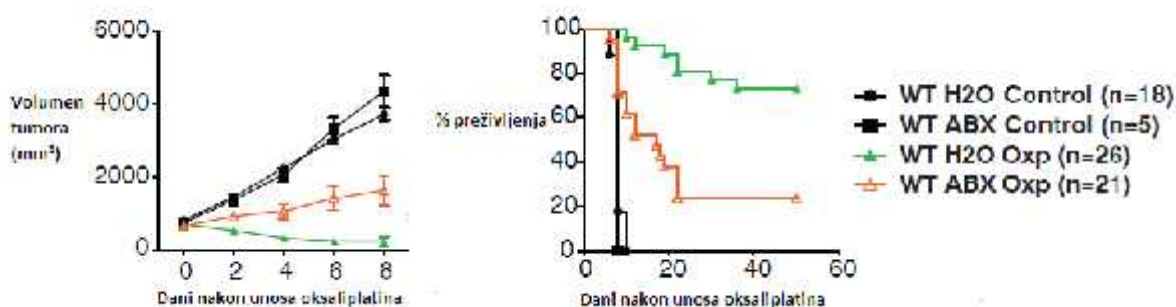
Poznato je da neki kemoterapeutici i terapije zračenjem uzrokuju stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) tijekom liječenja tumora. ROS su važni u prijenosu signala i za baktericidnu aktivnost fagocita, no mogu uzrokovati teška oštećenja biološki makromolekula, osobito DNA. Oštećenje membrane mitohondrija dovodi do izlaska citokroma c što potiče ulazak stanice u apoptozu. Velike količine ROS mogu dovesti i do nekroze. Stanice raka su izložene većem oksidativnom stresu u usporedbi s normalnim stanicama zbog pojačane metaboličke aktivnosti, oštećenja mitohondrija i povećanog stvaranja ROS. Oksidativni stres može potaknuti proliferaciju stanica tumora, uzrokovati mutacije i genetsku nestabilnost te uzrokovati promjene u osjetljivosti na antitumorski agens, no može i uništiti stanice pa se stoga koristi u terapijama tumora (Ozben 2006).

Spojevi platine (Slika 2.) stvaraju velike količine ROS (Ozben 2006). Oksaliplatina ometa replikaciju DNA i transkripciju te je nespecifičan za stanični ciklus (Baker 2003). Slična je cisplatini i karboplatini. Stvara kovalentne veze unutar lanca DNA i time sprječava replikaciju. Koristi se sama ili u kombinaciji s 5-fluorouracilom (Ibrahim i sur. 2004). Cisplatina djeluje slično kao oksaliplatina. Stvaranjem kovalentnih veza unutar lanca DNA aktivira signalne putove koji vode stanicu u apoptozu (Siddik 2003). Oksaliplatina, za razliku od cisplatine, uzrokuje imunogeni stanični smrtni ciklus koji potiče antitumorsku imunost pomoću T-stanica (Iida i sur. 2013).



**Slika 2.** Kemijska struktura spojeva platine koji se koriste u kemoterapijama: cisplatina, karboplatina i oksaliplatina (preuzeto s: [www.jeccr.com](http://www.jeccr.com))

U in vivo terapija cisplatinom i oksaliplatinom ne ovise direktno o upalnom procesu. Kako bi ispitali utjecaj mikroba na takve terapije, znanstvenici su inokulirali miševima s limfomima EL4 i karcinomima debelog crijeva MC38. Tretman oksaliplatinom je uklonio većinu potkožnih EL4 tumora u kontrolnoj skupini miševa. Miševima tretirani s ABX i GF miševi su pokazali smanjenu regresiju tumora i slab odgovor na terapiju (Slika 3.). U in vivo oksaliplatine na MC38 i cisplatine na EL4 tumore su također bili smanjeni kod životinja tretiranih s ABX. U in vivo ABX je primijenjen dva dana nakon tretmana oksaliplatinom što ukazuje na supresiju rane citotoksičnosti. 18 sati nakon tretmana, ABX je smanjio promjene u ekspresiji gena primijenjenih kod EL4 tumora. Inhibirao je gene povezane s diferencijacijom, aktivacijom i funkcijom monocita, a povećao je ekspresiju gena povezanih sa staničnim funkcijama poput metabolizma, translacije, transkripcije i replikacije DNA (Iida i sur. 2013).



**Slika 3.** Volumen tumora EL4 kod kontrolne skupine i životinja tretiranih s ABX. Narandžastim i zelenim su označene životinje tretirane oksaliplatinom (preuzeto iz: Iida i sur. 2013).

Analiza ekspresije gena nakon tretmana oksaliplatinom je pokazala da je smanjena indukcija proupalnih gena u odsustvu mikroba što ukazuje na važnost upalnog procesa za antitumorski učinak lijeka. Za razliku od anti-IL-10R/CpG-ODN terapije, antitumorski učinak oksaliplatine je neovisan o TNF. ABX tretman nakon unosa oksaliplatine je smanjio indukciju *Nox1* i *Cybb* koji kodiraju NADPH oksidazu 2 (NOX2) koja stvara ROS i *Nos2*, *Sod1* i *Sod2* koji su zaduženi za odgovor na ROS. Oksaliplatina je potaknula stvaranje ROS u tumorima

kontrolne skupine miševa, ali ne i one tretirane s ABX što je detektirano *in vivo* pomo u bioluminiscencije. Stvaranje ROS se može blokirati pomo u antioksidansa N-acetil cisteina (NAC). On blokira apoptozu stanica raka induciranu pomo u oksaliplatina *in vitro* i inhibira u inak terapije oksaliplatinom na miše tumorske stani ne linije *in vivo*. Inhibicija stvaranja ROS pomo u deficijencije *Cybb* ili pomo u NAC smanjila je regresiju tumora induciranu s oksaliplatinom i smanjila je ukupnu stopu preživljena u usporedbi sa životinjama tretiranim s ABX. Redukcija mijeloidnih stanica pomo u Gr-1 antitijela smanjila je sposobnost oksaliplatine da inducira regresiju tumora i pove a preživljavanje. Ovi rezultati upu uju na to da do smanjenog u inka oksaliplatine u GF i ABX miševima dolazi zbog smanjene sposobnosti mijeloidnih stanica da stvaraju ROS (Iida i sur. 2013).

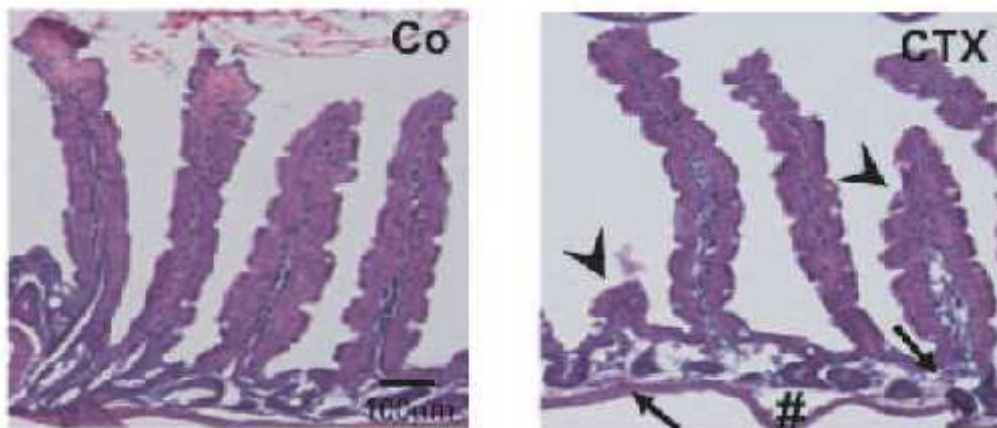
Koli ina tumorske DNA vezane s platinom je bila sli na kod kontrolne skupine i miševa tretiranih s ABX, iako su tumori ABX miševa pokazali manje ošte enja DNA, što zna i da ABX smanjenjem produkcije ROS sprje ava ošte ivanje DNA i apoptozu nakon vezanja s oksaliplatinom. Smanjena indukcija *Atr* gena zaduženog za odgovor na ošte enje DNA i gena *Bax*, *Fas*, *Cdkn1a* i *Rb1*, koji se nalaze nizvodno od p53, je u skladu sa smanjenim ošte enjem tumorske DNA i smanjenom p53-ovisnom aktivacijom apoptoze. Iako se prije smatralo da produkcija ROS od strane tumorskih stanica potrebna za citotoksi an efekt spojeva platine *in vitro*, ovi podaci ukazuju na to da ROS potrebni za genotoksi nost ve inom potje u od upalnih stanica povezanih s tumorima. ABX tretman utje e na citotoksi nost ubrzo nakon kemoterapije što je primije eno kod oksaliplatine i njemu sli ne cisplatine koja ne može potaknuti imunogenu stani nu smrt. Tako je potvr eno da simbiotske bakterije moduliraju genotoksi nost spojeva platine neovisno o imunosti potaknutoj imunogenom stani nom smrti. Aktivacija dendriti kih stanica i adaptivni antitumorski imunološki odgovor nakon oksaliplatine tako er zahtijeva upalni odgovor ovisan o simbiotskim bakterijama. Osim kompleksa platine, lijekovi poput antraciklina, alkiliraju ih agenasa, podofilotoksina i kamptotekina tako er induciraju ROS kao dio njihove antitumorske aktivnosti i vjerojatno se sli no reguliraju (Iida i sur. 2013).

### **3.3. Kemoterapija ciklofosfamidom**

Ciklofosfamid (CTX) je alkiliraju i agens koji djeluje citotoksi no i imunosupresivno. Neaktivan je *in vitro*, ali produkti njegovog metabolizma nastali u jetri pokazuju biološku aktivnost. esto se koristi za lije enje tumora i autoimunih bolesti. Postoje njegovi brojni

analizi koji pokazuju specifične djelovanje (Ahmed i Hombal 1984). Koristi se kao imunosupresivni agens prije transplantacije organa. Karcinogen je i uzrokuje pojavu sekundarnih tumora. Stvara kovalentne veze unutar lanaca DNA. Uzrokuje mutacije gena, aberacije kromosoma i stvaranje mikronukleusa. (Anderson i sur. 1995).

Ciklofosamid je alkilirajuće antitumorsko sredstvo koje inducira imunogenu smrt tumorskih stanica, uništava imunosupresorske T-stanice i potiče  $T_H1$  i  $T_H17$  stanice koje kontroliraju rast tumora. Također uzrokuje mukozitis (ozljeđuje mukoznu barijeru koja je povezana s translokacijom bakterija) i neutropeniju. Te komplikacije zahtijevaju terapiju antibioticima koja može rezultirati disbiozom. 48 sati nakon ubrizgavanja CTX miševima, analizirana je epitelna barijera crijeva. Primijećeno je skraćivanje malih crijevnih vila, nepovezanost epitelne barijere, intersticijski edemi i fokalna akumulacija mononuklearnih stanica u lamini proprijiji (Slika 4.). Nakon kemoterapije povećava se broj vrastih i Panethovih stanica u vilima i kriptama. U duodenumu miševa tretiranih s CTX je povećana količina antibakterijskog enzima lizozima. Oralno unesen fluorescein izotiocijanat (FITC) – dekstran je detektiran u krvi 18 sati nakon uzimanja CTX što ukazuje na povećanu permeabilnost u crijevu. Oštećenja u crijevnoj barijeri su praćena značajnom translokacijom simbiotskih bakterija u mezenteričke limfne čvorove i slezenu kod više od 50% miševa 48 sati nakon CTX tretmana. Nekoliko vrsta Gram-pozitivnih bakterija, uključujući i *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus murinus* i *Enterococcus hirae*, uzgojeno je na hranjivim podlogama direktno iz tih limfnih organa. Analiziran je sastav crijevnih mikroba pomoću *high-throughput* 454 *pyrosequencing*-a i kvantitativne lančane reakcije polimerazom (QPCR). Iako CTX nije uzrokovao veliku disbiozu u ranim fazama (24-48 sati), promijenio je sastav mikroba u tankom crijevu kod miševa sa potkožnim tumorima (metastaziraju i melanom B16F10 i nemetastaziraju i sarkom MCA205) tjedan dana nakon terapije. CTX je smanjio prisutnost bakterijskih vrsta koljena *Firmicutes* u mukoznom sloju što je u skladu s izvješćima o fekalnim uzorcima pacijenata. Ukupna količina bakterija i vrste *Clostridium leptum* u tankom crijevu nije promijenjena 7 dana nakon tretmana. No, CTX je doveo da smanjenja broja laktobacila i enterokoka. Ovi rezultati ukazuju na sposobnost CTX-a da potakne selektivnu translokaciju određenih Gram-pozitivnih bakterija praćenu značajnim promjenama u mikrobiomu tankog crijeva (Viaud i sur. 2013).



Slika

4. Crijevni vili kod kontrolne skupine miševa (lijevo) i oštećenja kod skupine tretirane s CTX (desno) (preuzeto iz: Viaud i sur. 2013).

Poklapaju i se sa disbiozom 7 dana nakon uzimanja CTX, uestalost  $CD103^+ CD11b^+$  dendriti kih stanica i T-stanica koje proizvode transkripcijski faktor ROR  $\gamma$  t je značajno smanjena u lamini proprijii tankog, ali ne i debelog crijeva. ROR  $\gamma$  t je potreban za stvaranje  $T_H17$  stanica koje proizvode interleukin-17 (IL-17). CTX potiče polarizaciju  $CD4^+$  T stanica prema  $T_H1$  (proizvodnja interferona- $\gamma$ ) i  $T_H17$  putu. Ovaj učinak je specifičan za CTX. Crijevni mikrobi su neophodni za konverziju  $CD4^+$  T-stanica u proizvođače IL-17 kao odgovor na CTX. *Ex vivo* otpuštanje IL-17 pomoću splenocita stimuliranih pomoću receptora T-stanica (TCR) je pojačano nakon uzimanja CTX kod SPF (*specific pathogen free*) miševa, ali ne i kod GF (*germ free*) miševa. Sterilizacija crijeva pomoću antibiotika širokog spektra (ATB – kombinacija kolistina, ampicilina i streptomicina) je suprimirala uinjak CTX na sekreciju IL-17 i IFN- $\gamma$  od strane splenocita. Tretman miševa s vankomicinom, antibiotikom specifičnim za Gram-pozitivne bakterije, je smanjio konverziju  $T_H17$  induciranu pomoću CTX. Kod SPF miševa, broj laktobacila je pozitivno korelirao s  $T_H1$  i  $T_H17$  polarizacijom splenocita, a broj *Clostridium* skupine IV nije. Ovi rezultati upućuju na specifično udruživanje određenih mikrobioloških komponenti u lumenu crijeva (Viaud i sur. 2013).

CTX je u slezeni povećao uestalost „patogenih“  $T_H17$  ( $pT_H17$ ) stanica, koje dijele značajke sa  $T_H1$  stanicama (ekspresija transkripcijskog faktora T-bet u jezgri, citoplazmatska ekspresija IFN- $\gamma$  i izlaganje kemokinskog receptora CXCR3 na površini) i  $T_H17$  stanica (ekspresija ROR  $\gamma$  t, IL-17 i CCR6). Ovaj odgovor također ovisi o crijevnim mikrobima. Povećanje količine  $pT_H17$  stanica zahtijeva ekspresiju gena *MyD88* zaslužnog za diferencijaciju mijeloidnih stanica koji je potreban za uspjeh kemoterapija kod nekoliko tumorskih modela. Receptori Nod1 (*nucleotide-binding oligomerization domain-containing*) i

Nod2 nisu nužni za povećanje količine pT<sub>H</sub>17 u slezeni ni za usporavanje rasta tumora nakon CTX tretmana. Ovi rezultati potvrđuju sposobnost CTX da stimulira pT<sub>H</sub>17 stanice kroz kompleksni put koji uključuje crijevne bakterije i MyD88, što je u skladu s njegovim antitumorskim učinkom. Uz to, na brojnost pT<sub>H</sub>17 stanica, CTX potiče antigen-specifični imuni odgovor protiv simbiotskih bakterija. Stoga je istraženo mogu li Gram-pozitivne bakterijske vrste, koje su translocirane u sekundarne limfne organe nakon CTX tretmana, polarizirati CD4<sup>+</sup> T stanice prema T<sub>H</sub>1 ili T<sub>H</sub>17 putu. *Lactobacillus johnsonii* i *Enterococcus hirae* stimuliraju diferencijaciju CD4<sup>+</sup> T stanica u T<sub>H</sub>1 i T<sub>H</sub>17 stanice *in vitro*, u prisutnosti dendritičkih stanica poteklih iz koštane srži. *Escherichia coli* je pokazala slabiji efekt. Oralno davani *L. johnsonii* i *E. hirae*, ali ne i *L. plantarum* (koja nije detektirana u eksperimentima s translokacijom), olakšali su rekonstituciju pT<sub>H</sub>17 stanica u slezeni SPF miševa tretiranih s ATB. T<sub>H</sub>1 memorijski odgovor protiv *L. johnsonii* je detektiran u 50% miševa koji su primali CTX, ali ne i u kontrolnoj skupini, nakon *in vitro* restimulacije CD4<sup>+</sup> T-stanica sa dendritičkim stanicama iz koštane srži uz dodatak *L. johnsonii* (slabiji učinak s *E. hirae*). Uzimajući u obzir da disbioza inducirana s CTX doseže vrhunac kasno (7. dan), zaključeno je da je translokacija specifičnih Gram-pozitivnih simbiotskih bakterija nužna za posredovanje između akumulacije pT<sub>H</sub>17 stanica i T<sub>H</sub>1 memorijskih odgovora specifičnih za bakterije (Viaud i sur. 2013).

Ispitivan je utjecaj antibiotika na sposobnost CTX da inhibira rast tumora. Dugotrajan tretman s antibioticima širokog spektra ATB je smanjio sposobnost CTX da izliječi P815 mastocitome kod singeničnih DBA2 miševa. Antitumorski učinak CTX na MCA205 sarkome je bio slabiji kod GF miševa nego SPF miševa. Potaknuti opažanjima da CTX inducira translokaciju Gram-pozitivnih bakterija koje koreliraju s T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>17 polarizacijom u slezeni, uspoređena je sposobnost nekoliko sastojaka ATB, vankomicina (uništava Gram-pozitivne bakterije) i kolistina (uništava uglavnom Gram-negativne bakterije), da utječu na inhibiciju rasta tumora induciranu pomoću CTX. Vankomicin, i slabije kolistin, su smanjili antitumorsku učinkovitost CTX na MCA205 sarkome. Koristeći transgeni tumorski model autohtone plućne karcinogeneze potvrđeno je inhibitorna uloga vankomicina na antitumorsku učinkovitost kemoterapije bazirane na CTX. Vankomicin je također spriječio CTX-induciranu akumulaciju pT<sub>H</sub>17 u slezeni i smanjio je učestalost CD3<sup>+</sup> T-stanica i T<sub>H</sub>1 stanica (Viaud i sur. 2013).

Prije spomenuti rezultati ističu povezanost između promjena sastava crijevnih mikroba uzrokovanih CTX, akumulacije pT<sub>H</sub>17 stanica u slezeni i uspjeha kemoterapije. Kako bi se

utvrdila veza između u ovih pojava, T<sub>H</sub>17 ili pT<sub>H</sub>17 populacije stanica su prebačene u miševe tretirane vankomicinom i ispitivana je njihovu sposobnost da ponovno uspostave smanjenje rasta tumora posredovano pomoću CTX. *Ex vivo* umnožene pT<sub>H</sub>17 stanice pokazale su obrazac ekspresije gena sličan CD4<sup>+</sup> T-stanicama induciranim pomoću CTX *in vivo*. Samo pT<sub>H</sub>17, ne i T<sub>H</sub>17, su mogle spriječiti negativan učinak vankomicina na terapijski učinak CTX. Ovi rezultati naglašavaju važnost pT<sub>H</sub>17 stanica za antitumorski imunološki odgovor pomoću CTX (Viaud i sur. 2013).

### 3.4. Kemoterapija kamptotekinom

Kamptotekin je citotoksični alkaloid izoliran iz drveta *Camptotheca acuminata*. Inhibira sintezu DNA i RNA u stanicama sisavaca. Uzrokuje fragmentaciju stanične DNA. Inhibira djelovanje topoizomeraze I (Hsiang i sur. 1985). Topoizomeraza I je važna za održavanje superzavijenosti DNA i aktivna je u stanicama koje se brzo dijele (Wallace i sur. 2010). Kamptotekin pokazuje slabu biološku dostupnost pa se često koriste njegovi derivati CPT-11 (irinotekan) i topotekan (Pizzolato i Saltz 2003). CPT-11 je jedan od tri najčešće korištena lijeka za rak debelog crijeva te se koristi i kod tumora pluća i mozga i nekih oblika leukemija i limfoma. Sadrži dipiperidino skupinu vezanu na karbamat koja povećava topljivost i dostupnost. Taj dio se uklanja *in vivo* kako bi nastao aktivni metabolit SN-38 (Wallace i sur. 2010).

CPT-11 uzrokuje teške proljeve zbog svoje kompleksne aktivacije i metabolizma. Neaktivni produkt metabolizma SN-38G se žučnim kanalima izlučuje u gastrointestinalni trakt gdje na njega djeluje enzim β-glukuronidaza koji proizvode simbiotske bakterije. Enzim uklanja glukuronidnu skupinu i time reaktivira SN-38 *in situ*. Koncentracije SN-38 u lumenu crijeva igraju važnu ulogu u pojavljivanju proljeva koji sprječava povećanje doze terapije i smanjuje efikasnost terapije kod 40% pacijenata. Efikasnost CPT-11 je moguće povećati upotrebom antibiotika koji smanjuju količinu mikroba u probavnom sustavu, ali taj pristup nije preporučljiv iz nekoliko razloga. Crijevne bakterije igraju važne uloge u metabolizmu ugljikohidrata, sintezi vitamina i obradi žučnih soli, sterola i ksenobiotika. Nadalje, eliminacija simbiotskih bakterija povećava šanse za infekciju nekom patogenom bakterijom, uključujući i entrohemoragijsku *Escherichia coli* i *Clostridium difficile*. Stoga je važno inhibirati aktivnost β-glukuronidaza, a pritom očuvati stalan sastav populacije mikroba (Wallace i sur. 2010).

Enzim  $\beta$ -glukuronidaza odcjepljuje glukuronsku kiselinu s različitih supstrata. Koristi se u testovima u vodi. Njegova prisutnost ukazuje na kontaminaciju bakterijama. Enzim iz *E. coli* sadrži četiri monomera. C-terminalna domena (aminokiseline 207-603) stvara bačvu. Aktivno mjesto sadrži aminokiseline Glu<sup>413</sup> i Glu<sup>504</sup>. Enzim sadrži „bakterijsku petlju“ od 17 aminokiselina koja nije pronađena kod ljudskog ortologa. Aktivno mjesto svakog monomera  $\beta$ -glukuronidaze sadrži „bakterijsku petlju“ iz tog i susjednog monomera (Wallace i sur. 2010).

Glukaro- $\beta$ -laktam (GDL) je inhibitor  $\beta$ -glukuronidaze niskog afiniteta. Veže se u aktivno mjesto enzima i izaziva velike promjene u položaju aminokiselina. Pokazuje slabu inhibiciju *in vitro* i ne ometa aktivnost  $\beta$ -glukuronidaze bakterija *E. coli* koje se nalaze u kulturi. Pomoću u strukturne i kemijske biologije identificirani su slični selektivni inhibitori koji smanjuju toksičnost CPT-11 u probavilu, a ne ubijaju bakterije važne za zdravlje. Izabrani spojevi su možda nekompitivni inhibitori *in vitro*. Vežu se na „bakterijske petlje“ na ulazu u šupljinu aktivnog mjesta (Wallace i sur. 2010).

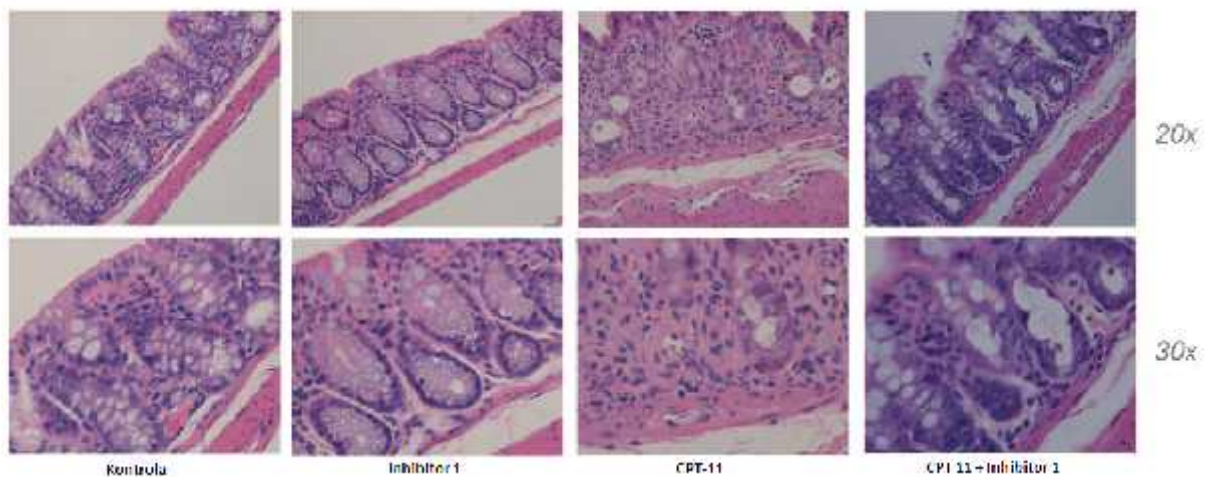
Inhibitori u koncentracijama u rasponu od 0 do 100  $\mu$ M nisu imali utjecaja na aktivnost  $\beta$ -glukuronidaze sisavaca (enzim iz jetre goveda). Od 284 bakterijske vrste koje nalazimo u gastrointestinalnom traktu ovjeka, 123 sadrže  $\beta$ -glukuronidazu. Od toga 110 vrsta sadrži ključne aminokiseline (361 i 365) sposobne za kontakt s inhibitorom. Za provjeru hipoteze da je „bakterijska petlja“ potrebna za efikasnost inhibitora, napravljena je  $\beta$ -glukuronidaza kojoj nedostaju aminokiseline od 360 do 376. Enzim mutanta nije bio inhibiran čak ni koncentracijama inhibitora od 100  $\mu$ M (Wallace i sur. 2010).

Većina vrsta mikroba u probavilu su obligatni anaerobi pa je ispitivan utjecaj na bakterije *E. coli* u anaerobnim uvjetima i na druge važne anaerobne vrste. Inhibitori su djelovali na *E. coli* i u anaerobnim i aerobnim uvjetima te su smanjili aktivnost enzima dvaju obligatnih anaeroba *Bacteroides vulgatus* i *Clostridium ramosum* koji nastanjuju probavilo sisavaca. Utvrđeno je da inhibitori ne utječu na vijabilnost *Lactobacillus reuteri* i *Bifidobacterium infantis* koje ne sadrže gen za  $\beta$ -glukuronidazu. Nadalje, inhibitori pri koncentraciji od 100  $\mu$ M nisu pokazivali značajnu utjecaj na vijabilnost dvaju staničnih linija ljudskog tumora debelog crijeva (HCT116, Caco-2) i jedne mišje linije tumora debelog crijeva (CMT93) (Wallace i sur. 2010).

Ispitivana je sposobnost inhibitora 1 da spriječi proljev i oštećenja probavila uzrokovana uzimanjem CPT-11. Zdravi Balb/cJ miševi stari 6-8 tjedana su podijeljeni u 4



skupine po 16 jedinki. Prva skupina je primila 50  $\mu$ l destilirane vode intraperitonealno i 1% dimetil sulfoksid oralno dva puta dnevno. Skupina 2 je dobivala 10  $\mu$ g Inhibitora 1 oralno dvaput dnevno. Skupina 3 je dobivala CPT-11 intraperitonealno jedanput dnevno (50 mg po kilogramu mase tijela). Skupina 4 je dobivala Inhibitor 1 i CPT-11 u istoj dozi i prema istom rasporedu kao skupine 2 i 3. Simptomi su se pojavili nakon 7 dana. Od 8. do 10. dana sve životinje iz skupine 3 su imale proljev i krvavi proljev. Niti jedna životinja iz skupina 1 i 2 nije imala proljev tijekom cijelog eksperimenta. 11. dan su se životinje iz skupine 3 eutanazirane. Životinje iz skupine 4 su pokazivale slabije simptome od životinja iz skupine 3. Ispitivanje uzoraka tkiva debelog crijeva je pokazalo da Inhibitor 1 štiti epitel probavila i strukturu žlijezda od oštećenja uzrokovanih pomoću CPT-11. Miševi iz skupina 1 i 2 imale su zdravu strukturu žlijezda i netaknut epitel što je prikazano na Slici 5. Uzimanje CPT-11 oštećuje ova tkiva, uništavaju žlijezde i uzrokuju priljev upalnih stanica.



**Slika 5.** Uzorci tkiva debelog crijeva miševa izloženih različitim tretmanima (preuzeto iz: Wallace i sur. 2010).

## 4. Zaključak

Otprije je poznato da mikrobi igraju važnu ulogu u zdravlju ovjeka. Oblikuju naš imunološki i održavaju probavni sustav te nas štite od patogena. Nedavna istraživanja na miševima su pokazala da mikrobi u probavilu utječu na nekoliko vrsta antitumorskih terapija. U nedostatku određenih mikroba, smanjuje se učinkovitost terapije. Ovi rezultati bi mogli imati veliki utjecaj na liječenje tumora. Jedna od posljedica klasičnih terapija je oslabljen imunološki sustav što čini organizam podložnijim infekcijama. Kako bi se infekcije spriječile, pacijenti obično primaju antibiotike koji uništavaju i korisne bakterije. Stoga je potreban oprez prilikom uzimanja antibiotika tijekom terapije. No, još je prerano za davanje mikroba oboljelima od tumora. Znanstvenici su oprezni oko primjene rezultata dobivenih na miševima na ljude. Bakterije u probavilu miša se razlikuju od onih u probavilu ovjeka i detalji o utjecaju bakterija na uništavanje stanica tumora su još uvijek nisu dovoljno istraženi. Ove rezultate nije moguće ekstrapolirati na ljude bez prethodnog istraživanja. Potrebna su istraživanja na zdravim ljudima kako bi se ispitao utjecaj mikroba iz probavila na makrofage i monocite sa i bez korištenja antibiotika. Potrebno je ispitati korelaciju između upotrebe antibiotika i uspješnosti kemoterapije. U budućnosti se možda moguće pomoću sastava bakterija u crijevima odrediti najbolji mogući pristup liječenju tumora ili transplantacijom stranih bakterija povećati učinkovitost terapije.

## 5. Literatura

- Ahmed A.R., Hombal S.M., 1984. Cyclophosphamide (Cytosan). A review on relevant pharmacology and clinical uses. *J Am Acad Dermatol.* **11**, 1115-1126.
- Anderson D., Bishop J.B., Garner R.C., Ostrosky-Wegman P., Selby P.B., 1995. Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mutat Res.* **330**, 115-181.
- Baker D.E., 2003. Oxaliplatin: a new drug for the treatment of metastatic carcinoma of the colon or rectum. *Rev Gastroenterol Disord.* **3**, 31-38.
- Benson A.K., Kelly S.A., Legge R., Ma F., Low S.J., Kim J., Zhang M., Oh P.L., Nehrenberg D., Hua K., et al. 2010. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 18933–18938.

- Blattman J.N., Greenberg P.D., 2004. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science* **305**, 200-205.
- Carpentier A.F., Auf G., Delattre J.Y., 2003. CpG-oligonucleotides for cancer immunotherapy: Review of the literature and potent applications in malignant glioma. *Frontiers in Bioscience* **8**, 115-127.
- Clemente J.C., Ursell L.K., Wegener Parfrey L., Knight R., 2012. The impact of the gut microbiota on human health: An Integrative View. *Cell* **148**, 1258-1267.
- Costello E.K., Lauber C.L., Hamady M., Fierer N., Gordon J.I., and Knight R., 2009. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* **326**, 1694–1697.
- Dominguez-Bello M.G., Costello E.K., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Fierer N., Knight R., 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 11971–11975.
- Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M., 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* **140**, 883-899.
- Hsiang Y.H., Hertzberg R., Hecht S., Liu L.F., 1985. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase. *J Biol Chem.* **260**, 14873-14878.
- Ibrahim A., Hirschfeld S., Cohen M.H., Griebel D. J., Williams G.A., Pazdur R., 2004. FDA drug approval summaries: oxaliplatin. *The Oncologist* **9**, 8-12.
- Iida N., Dzutsev A., Stewart C.A., Smith L., Bouladoux N., Weingarten R.A., Molina D.A., Salcedo R., Back T., Cramer S., Dai R., Kiu H., Cardone M., Naik S., Patri A.K., Wang E., Marincola F.M., Frank K.M., Belkaid Y., Trinchieri G., Goldszmid R.S., 2013. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science* **342**, 967-970.
- Jahrsdörfer B., Weiner G.J., 2008. CpG oligodeoxynucleotides as immunotherapy in cancer. *Update Cancer Ther.* **3**, 27-32.
- Jiménez E., Marín M.L., Martín R., Odriozola J.M., Olivares M., Xaus J., Fernáandez L., Rodríguez J.M., 2008. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol.* **159**, 187–193.
- Koenig J.E., Spor A., Scalfone N., Fricker A.D., Stombaugh J., Knight R., Angenent L.T., Ley R.E., 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108** (Suppl 1), 4578–4585. Published online July 28, 2010. 10.1073/pnas.1000081107.
- Lee K.Y., Mazmanian S.K., 2010. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* **330**, 1768-1773.

- Nasidze I., Li J., Quinque D., Tang K., and Stoneking M., 2009. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res.* **19**, 636–643.
- Ozben T., 2007. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **96**, 2181–2196.
- Palmer C., Bik E.M., DiGiulio D.B., Relman D.A., Brown P.O., 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* **5**, 1556-1573.
- Peterson J., Garges S., Giovanni M., McInnes P., Wang L., Schloss J.A., Bonazzi V., McEwen J.E., Wetterstrand K.A., Deal C., et al; NIH HMP Working Group., 2009. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* **19**, 2317–2323.
- Pizzolato J.F., Saltz L.B., 2003. The camptothecins. *The Lancet* **361**, 2235-2242.
- Ravel J., Gajer P., Abdo Z., Schneider G.M., Koenig S.S., McCulle S.L., Karlebach S., Gorle R., Russell J., Tacket C.O., et al. 2011. Vaginal microbiome microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108** (Suppl 1), 4680–4687.
- Reyes A., Haynes M., Hanson N., Angly F.E., Heath A.C., Rohwer F., Gordon J.I., 2010. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* **466**, 334–338.
- Shirota Y., Shirota H., Klinman D.K., 2012. Intratumoral injection of CpG-oligonucleotides induces the differentiation and reduces the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* **188**,1592-1599.
- Siddik Z.H., 2003. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**, 7265–7279.
- Viaud S., Saccheri F., Mignot G., Yamazaki T., Daillère R., Hannani D., Enot D.P., Pfirschke C., Engblom C., Pittet M.J., Schlitzer A., Ginhoux F., Apetoh L., Chachaty E., Woerther P.L., Eberl G., Bérard M., Ecobichon C., Clermont D., Bizet C., Gaboriau-Routhiau V., Cerf-Bensussan N., Opolon P., Yessaad N., Vivier E., Ryffel B., Elson C.O., Doré J., Kroemer G., Lepage P., Gomperts Boneca I., Ghiringhelli F., Zitvogel L., 2013. The Intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science* **342**, 971-976.
- Vicari A.P., Chiodoni C., Vaure C., Ait-Yahia S., Dercamp C., Matsos F., Reynard O, Taverna C., Merle P., Colombo M.P., O’Garra A., Trinchieri G.,Caux C., 2002. Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by CpG immunostimulatory oligonucleotide and anti–interleukin 10 receptor antibody. *J. Exp. Med.* **196**, 541-549.
- Wallace B.D., Wang H., Lane K.T., Scott J.E., Orans J., Koo J.S.,Venkatesh M., Jobin C., Yeh L., Mani S., Redinbo M.R., 2010. Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme. *Science* **330**, 831-835.

[www.cancer.org](http://www.cancer.org)

[www.jeccr.com](http://www.jeccr.com)

## 6. Sažetak

Ljudsko tijelo je dom za  $10^{14}$  mikroba i  $10^{15}$  virusa. Mikrobi naseljavaju sve površine tijela koje su u dodiru s okolišem. Održavanje stalnog sastava mikrobnih populacija je važno za zdravlje ovjeka. Duga koevolucija dovela je do složenih interakcija između ljudskog imunološkog sustava i simbiotskih mikroba. U odsustvu pojedinih vrsta mikroba, imunološki sustav se ne može normalno razviti. Neke terapije tumora stimuliraju naš imunološki sustav. Upalni odgovori igraju odličnu ulogu u različitim fazama razvoja tumora i u reakcijama tumora na terapije. Nedavna istraživanja na miševima su pokazala da mikrobi utječu na nekoliko vrsta antitumorskih terapija koje se često koriste u liječenju ovjeka: imunoterapiju CpG-oligonukleotidima i kemoterapiju spojevima platine, ciklofosfamidom i kampo-tekinom. Pacijenti obično nakon terapije dobivaju antibiotike kako bi se spriječila infekcija do koje dolazi zbog oslabljenog imunološkog sustava. Upotreba antibiotika dovodi do smanjenja broja određenih bakterija što rezultira smanjenom učinkovitošću terapije. Ovi rezultati bi mogli imati veliki utjecaj na terapije tumora u budućnosti.

## 7. Summary

Human body is home to  $10^{14}$  microbes and  $10^{15}$  viruses. Microbes colonize all of the surfaces of the body that are exposed to the environment. It is important for human health to maintain constant composition of microbial populations. Long coevolution has led to complex interactions between human immune system and symbiotic microbes. In the absence of certain species of microbes, immune system will not develop normally. Some tumor therapies stimulate our immune system. Inflammatory responses play decisive roles at different stages of tumor development and reactions to therapy. Recent studies on mice showed that gut microbes affect few types of antitumor therapies which are often used in human treatment: CpG-oligonucleotide immunotherapy and platinum, cyclophosphamide and camptothecin chemotherapy. Cancer patients usually get antibiotics after therapy to prevent possible infections due to weakened immune system. The use of antibiotics reduces the number of certain bacteria which results in decreased therapy efficiency. These findings could have major impact on tumor therapies in the future.