

Crijevena mikrobiota: nova snaga u imunoterapiji tumora

Kereković, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:217:039870>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-22**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Karla Kereković

**Crijevna mikrobiota: nova snaga u
imunoterapiji tumora**

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Karla Kereković

**Intestinal microbiota: a new power in
cancer immunotherapy**

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad izrađen je u sklopu preddiplomskog studijskog programa Biologije na Zavodu za animalnu fiziologiju, biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Crijevna mikrobiota: nova snaga u imunoterapiji tumora

Karla Kereković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Tumor je heterogena nakupina stanica podložna velikom broju mutacija. Proučavanje nastanka tumora dovodi do razvika imunoterapija poput inhibicije imunskih kontrolnih točaka PD-1 i CTLA-4. Najveću prepreku prilikom liječenja tumora predstavlja razvitak rezistencije na postojeće imunoterapije. U cilju dokidanja rezistencije u imunoterapiji kontrolnih točaka, pažnja znanstvenika usmjerena je na crijevnu mikrobiotu kao potencijalnog modulatora imunskog odgovora i terapijske aktivnosti. Crijevna mikrobiota je kompleksna mikrobna zajednica podložna promjenama tijekom čitavog života. Neki od njezinih učinaka podrazumijevaju održavanje funkcije gastrointestinalnog sustava i modulacija imunskog sustava putem proizvodnje metabolita ili direktnom interakcijom s imunskim stanicama. Narušavanje stabilnosti crijevne mikrobiote i nastanak disbioze povezuje se negativnim učinkom na zdravlje, dok stabilna crijevna mikrobiota pokazuje protutumorski učinak. Razvitak metagenomskih analiza omogućio je istraživanje crijevne mikrobiote kao potencijalnog modulatora učinkovitosti imunoterapije. Određeni bakterijski rodovi i metaboliti povezuju se s prekidom rezistencije i poboljšanjem odgovora na imunoterapije putem njihove stimulacije imunskog sustava. Direktna modulacija crijevne mikrobiote može se vršiti putem transplantacije fekalne mikrobiote (FMT) koja pokazuje obećavajuće rezultate u budućem liječenju imunoterapije tumora. Točni mehanizmi kojima crijevna mikrobiota djeluje na mikrookoliš tumora nisu poznati, stoga su potrebna daljnja istraživanja koja će definirati točan utjecaj crijevne mikrobiote i omogućiti njezinu primjenu u klinici.

Ključne riječi: crijevna mikrobiota, imunoterapija, rak, mikrobna raznolikost, imunske kontrolne točke PD-1 i CTLA-4

(40 stranica, 11 slika, 2 tablice, 50 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Intestinal microbiota: a new force in cancer immunotherapy

Karla Kereković

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

A tumor is a heterogeneous aggregation of cells that undergo a large number of mutations. The study of tumor formation has led to the development of immunotherapies such as the inhibition of immune checkpoints PD-1 and CTLA-4. The biggest obstacle during tumor treatment is the development of resistance to existing immunotherapy. In order to overcome resistance in checkpoint immunotherapy, the attention of scientists is focused on intestinal microbiota as a potential modulator of immune response and therapeutic activity. The intestinal microbiota is a complex microbial community that is subjected to changes all throughout life. Some of its effects include maintaining the function of the gastrointestinal system and modulating the immune system through the production of metabolites or via direct interaction with immune cells. Disruption of the stability of the intestinal microbiota and the occurrence of dysbiosis is associated with a negative impact on health, while a stable intestinal microbiota exhibits an antitumor effect. The development of metagenomic analysis has enabled the investigation of intestinal microbiota as a potential modulator of the effectiveness of immunotherapy. Certain bacterial genera and metabolites are associated with eliminating resistance and improving response to immunotherapy through their stimulation of the immune system. Direct modulation of gut microbiota can be performed via faecal microbiota transplantation (FMT) which shows promising results in future tumor immunotherapy treatment. The exact mechanisms by which the intestinal microbiota affects the tumor microenvironment are not known, so further research is needed to define the exact influence of the intestinal microbiota and enable its clinical application.

Keywords: intestinal microbiota immunotherapy, cancer, microbial diversity, immune checkpoints PD-1 and CTLA-4 (40 pages, 11 figures, 2 tables, 50 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. CRIJEVNA MIKROBIOTA.....	2
2.1. STANICE CRIJEVNOG EPITELA.....	2
2.2. RAZVITAK RAZNOLIKOSTI I RASPODJELA CRIJEVNE MIKROBIOTE.....	5
2.2.1. <i>Razvoj crijevne mikrobiote od rođenja do uspostave stabilne mikrobiote</i>	<i>5</i>
2.2.2. <i>Kompozicija zdrave crijevne mikrobiote</i>	<i>8</i>
2.3. METODOLOGIJA ODREĐIVANJA SASTAVA CRIJEVNE MIKROBIOTE	8
3. IMUNOSNI SUSTAV I CRIJEVNA MIKROBIOTA	10
3.1. REGULACIJA UROĐENOG IMUNOSNOG SUSTAVA CRIJEVNOM MIKROBIOTOM .	11
3.1.1. <i>Receptori za prepoznavanje obrazaca (PRR) i njihovo djelovanje</i>	<i>11</i>
3.2. REGULACIJA STEČENOG IMUNOSNOG SUSTAVA CRIJEVNOM MIKROBIOTOM	13
3.2.1. <i>Imunoglobulin A (IgA)</i>	<i>13</i>
3.2.2. <i>Pomoćničke stanice T 17 (Th17).....</i>	<i>14</i>
3.2.3. <i>Regulatorne T stanice (Treg)</i>	<i>14</i>
4. CRIJEVNA MIKROBIOTA, RAK I IMUNOTERAPIJA	15
4.1. MIKROOKOLIŠ TUMORA	16
4.1.1. <i>Promoviranje tumorogeneze crijevnom mikrobiotom</i>	<i>16</i>
4.1.2. <i>Inhibiranje tumorogeneze crijevnom mikrobiotom</i>	<i>19</i>
4.2. IMUNOTERAPIJE.....	21
4.2.1. <i>Protein programirane stanične smrti 1 (PD-1).....</i>	<i>21</i>
4.2.2. <i>Utjecaj crijevne mikrobiote na PD-1/PD-L1 imunoterapiju</i>	<i>23</i>
4.2.3. <i>Protein povezan s citoskičnim T limfocitima 4 (CTLA-4)</i>	<i>26</i>
4.2.4. <i>Utjecaj crijevne mikrobiote na CTLA-4 imunoterapiju.....</i>	<i>28</i>
5. MODULACIJA MIKROBIOTE RADI POBOLJŠANJA ODGOVORA NA IMUNOTERAPIJE	31
5.1. TRANSPLANTACIJA FEKALNE MIKROBIOTE (FMT).....	31
5.2. PROBIOTICI I PREBIOTICI.....	32
5.3. DIJAGNOSTIČKE SPOSOBNOSTI MIKROBIOTE.....	33
6. ZAKLJUČAK.....	34
7. LITERATURA	34

1. UVOD

Unatoč velikome znanstvenom napretku, zbog visokog mutacijskog potencijala i razine heterogenosti, većina tipova raka je i dalje neizlječiva (Dai i sur., 2020). Kirurško uklanjanje tumora povećava potencijal izlječenja u slučajevima ranog stadija njegova razvitka. Takav pristup liječenja nije učinkovit kod tumora u kasnim stadijima gdje dolazi do razvitka metastaza (Bagheri i sur., 2022). Proučavanje interakcije tumora kasnog stadija (njegova mikrokoliša) s imunim odgovorom domaćina dovelo je do razvitka imunoterapija (Dai i sur., 2020; Wan i sur., 2021). U novije vrijeme, klasične imunoterapije uključuju liječenje monoklonalnim protutijelima (engl. *Monoclonal antibodies*, mABs), cjepiva za liječenje raka, inhibitore malih molekula, modulatore imunološkog sustava, prijenos stanica T te blokiranje imunoloških kontrolnih točaka (Zhou i sur., 2021). U mnogim istraživanjima naglasak je na istraživanju blokiranja imunih kontrolnih točaka (engl. *Immune checkpoint blockade*, ICB) radi njihove sposobnosti reaktivacije imunog sustava putem staničnih receptora, učinkovitosti protiv metastatskih tumora i opsežne bioaktivnosti prema različitim tipovima raka (Dai i sur., 2020, Zhou i sur., 2021). Ipak, veliki broj pacijenata ne odgovara na liječenje ICB te unatoč razvitku imunoterapija i kemoterapija pacijenti će postepeno stjecati otpornost na postojeće lijekove što dovodi do daljnje progresije raka zahvaljujući njenoj sposobnosti izbjegavanja imunog odgovora (Stancu, 2018; Dai i sur., 2020; Bagheri i sur., 2022).

Osim otkrića novih imunih kontrolnih točaka, razvitkom tehnologije sekvenciranja znanstvenici su se osvrnuli na proučavanje ljudske mikrobiote kao potencijalnog modulatora odgovora na liječenje imunoterapijama (Dai i sur., 2020). Cilj ovakvog pristupa je razviti nove pristupe koje će ukloniti rezistentnost na inhibitore kontrolnih točaka, a zasniva se na hipotezi da se heterogeni i kratkotrajni odgovor pacijenata na liječenje ICB djelomično zasniva na ulozi crijevne mikrobiote (Gharaibeh i Jobin, 2019; Bullman i sur., 2021). Crijevna mikrobiota se nalazi u gastrointestinalnom sustavu te je rezultat dugotrajne koevolucije s domaćinom, što se odražava u njezinom sudjelovanju u procesu probave, zaštite od patogena, detoksikaciji, proizvodnji raznih nutrijenata te u regulaciji imunog sustava (Wu i Wu, 2012). Ima ključnu ulogu tijekom razvoja urođenog i stečenog imunog sustava direktno putem predočavanja antigena i indirektno putem proizvodnje imunomodulatornih metabolita zbog čega se smatra jednim od ekstrinzičnih čimbenika tijekom razvoja tumora (Bullman i sur., 2021). S obzirom na to, provedena su mnoga istraživanja kako bi se zadovoljila visoka potreba za optimizacijom

imunoterapije raka s naglaskom na potencijalnu upotrebu mikrobiote kao biljega za prepoznavanje i liječenje bolesti – prognostički biomarker i cilj u imunoterapiji raka (Stancu, 2018).

2. CRIJEVNA MIKROBIOTA

Usporedbom uzoraka vlastite oralne i fekalne mikrobiote krajem 17. st., Anthonie Van Leeuwenhoek dolazi do spoznaje da između dvaju uzoraka postoji značajna razlika u mikrobnom sastavu. Ovakva spoznaja se smatra jednim od ranih početaka istraživanja raznovrsnosti ljudske mikrobiote (Ursell i sur., 2012). Pojam „mikrobiota“ označava populaciju mikroorganizama koji naseljavaju određeno mjesto i osim bakterija uključuje ostale mikrobe: viruse, gljive, arheje i eukariote (Protozoa) (Jandhyala, 2015). Blisko vezan pojam „mikrobiom“ odnosi se na cijeli genom pripadajuće mikrobiote (Bagheri i sur., 2022). Zbog sudjelovanja u ključnim fiziološkim procesima koji osiguravaju održavanje homeostaze domaćina, mnogi autori ljudsku mikrobiotu te pogotovo crijevnu mikrobiotu nazivaju „nevidljivim“ ili „zaboravljenim“ organom (Eckburg i sur., 2005, O'Hara i Shanahan, 2006, Dai i sur., 2020, Wan i sur., 2021).

Crijevna mikrobiota predstavlja ekosustav s najvećom zabilježenom gustoćom stanica (između 10 i 100 bilijuna mikroorganizama), reguliran kompleksnim i dinamičnim procesima koji se odvijaju u različitim fiziološkim mikrookolišima duž probavnog sustava. Kao rezultat javljaju se mikro-ekosustavi unutar kojih se oblikovanje populacija vrši kompetitivnim i mutualističkim mehanizmima (Bäckhed i sur., 2005, Turnbaugh i sur., 2007 i Zitvogel i sur., 2017).

2.1. STANICE CRIJEVNOG EPITELA

Gastrointestinalni sustav predstavlja organski sustav čija je primarna funkcija prerada i apsorpcija nutrijenata, sekrecija, pokretljivost i održavanje imunosne homeostaze. Histološki, crijeva se sastoje od četiri sloja povezana krvožilnim, živčanim i vezivnim tkivom koja uključuju (od lumena prema van): sluznicu, podsluznicu, sloj mišića i serozni sloj. Sluznicu kao prvi unutarnji sloj čine mukozni sloj, crijevni epitel, *lamina propria* i tanki mišićni sloj zbog čega čini strukturno i funkcionalno najkompleksniji sloj (JN i JY, 2010).

Mukozni sloj predstavlja prvu liniju obrane u nespecifičnom imunom sustavu zajedno s fizičkom barijerom crijevnog epitela. Uloga mukoznog sloja je smanjiti prijanjanje i prodor patogenih bakterija, zaštititi domaćina od probavnih enzima te istovremeno omogućiti optimalnu sredinu za preživljavanje i prvu liniju stjecanja tolerancije na komenzalne članove mikrobiote. Kao fizičku, neprobojnu barijeru stanice crijevnog epitela (engl. *Intestinal epithelial cells*, IEC) su povezane čvrstim spojevima koji se sastoje od integralnih proteina (okludin, kladin i *zonula occludens*) koji održavaju stabilnost i neprobojnost epitelne barijere uz omogućeni međustanični prijenos metabolita, iona i makromolekula (Ali i sur., 2020).

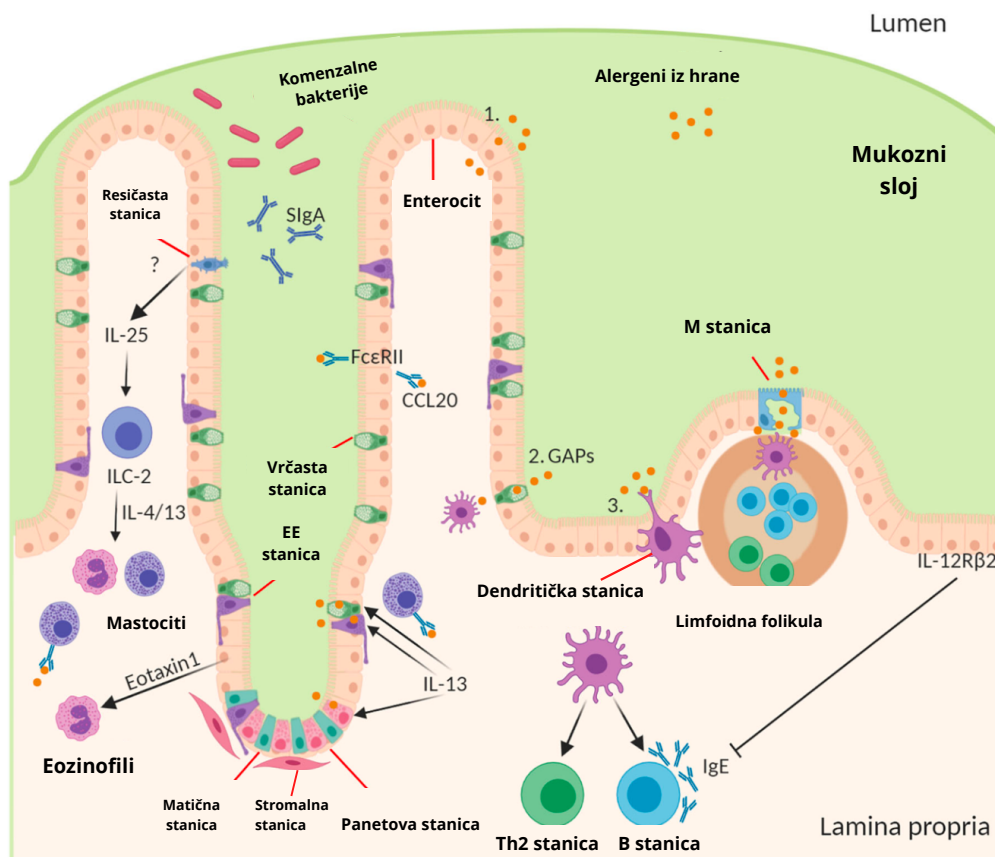
Enterociti i kolonociti su najbrojniji tipovi stanica u cijevnom epitelu (Slika 1.) (Noah i sur., 2011). Kao polarizirani podtipovi IEC apikalna strana im se sastoji od mnoštva mikrovila koji vrše digestivnu funkciju (Ali i sur., 2020). M stanice (engl. *Microfold cells*) su specijalizirane i rijetke stanice koje nalazimo smještenima iznad difuznog limfnog tkiva koje se nalazi u *lamina propria* (Slika 1.). Njihova uloga je sudjelovanje u transepitelnom prijenosu antigena limfocitima, makrofagima i dendritičkim stanicama (engl. *Dendritic cells*, DC) procesima fagocitoze, endocitoze ili transcitoze (Noah i sur., 2011, Ali i sur., 2020).

Između enterocita pronalazimo vrčaste stanice (engl. *Goblet cells*) (Slika 1.) koje izlučuju glikoproteinske mucine visoke molekulske mase (Ali i sur., 2020). Čine 10-15% stanica epitela u tankom crijevu te do 50% stanica epitela u debelom crijevu (Noah i sur., 2011). Mucini pridonose održavanju mukoznog sloja koji pruža fizičku i kemijsku zaštitu od sadržaja koji prolazi kroz lumen te zajedno s prisutnim imunoglobulinom A (IgA) omogućuje imobilizaciju bakterija, njihovu degradaciju i uklanjanje putem peristaltičkih kontrakcija (Ali i sur., 2020).

Panetove stanice su tip sekretornih stanica koje nalazimo u bazi crijevnih kripti (Slika 1.). Izlučivanjem antimikrobnih peptida poput lizozima, sekretorne fosfolipaze A2, kathericidina, alfa defenzina i drugih u lumen, štite epitelnu barijeru i održavaju mikrobnu homeostazu (Noah i sur., 2020, Ali i sur., 2011). Panetove stanice prevode signal nastao vezanjem mikrobnih liganda na receptore za prepoznavanje obrazaca (engl. *Pattern recognizing receptors*, PRR) na stražarskim stanicama u *lamina propria* u antimikrobni odgovor kojim reguliraju količinu komenzalnih i patogenih bakterija (Ali i sur., 2020).

Enteroendokrine stanice (engl. *Enteroendocrine cells*, EEC) imaju više podtipova, a čine 1% stanica crijevnog epitela gdje proizvode i izlučuju hormone kojima reguliraju apetit, pražnjenje želuca, razinu glukoze i serotonina (Noah i sur., 2011, Ali i sur., 2020). Resičaste stanice (engl. *Tuft cells*) su skupina rijetkih kemosenzornih stanica zaslužnih za aktivaciju tipa 2 imunskog odgovora proizvodnjom interleukina 25 (IL-25) i eliminacijom parazitskih nametnika (Ali i sur., 2020).

Uz IEC, prisutne su stanice koje nisu epitelnog tipa, a uključuju intraepitelne limfocite. Jedni od njih su i T stanice s gama delta T staničnim receptorom. Radi se o stanicama koje čine 1-5% cirkulirajućih limfocita dok na mjestima barijera kao što je crijevni epitel čine do 20% intraepitelnih limfocita u kolonu (Wo i sur., 2020). Na površini IEC mogu se pronaći receptori glavnog kompleksa histokompatibilnosti I (engl. *Major histocompatibility complex I*, MHC I) putem čega predočavaju antigen stanicama specifične imunosti koje nalazimo u *lamina propria* (Slika 1.) (Ali i sur., 2020).



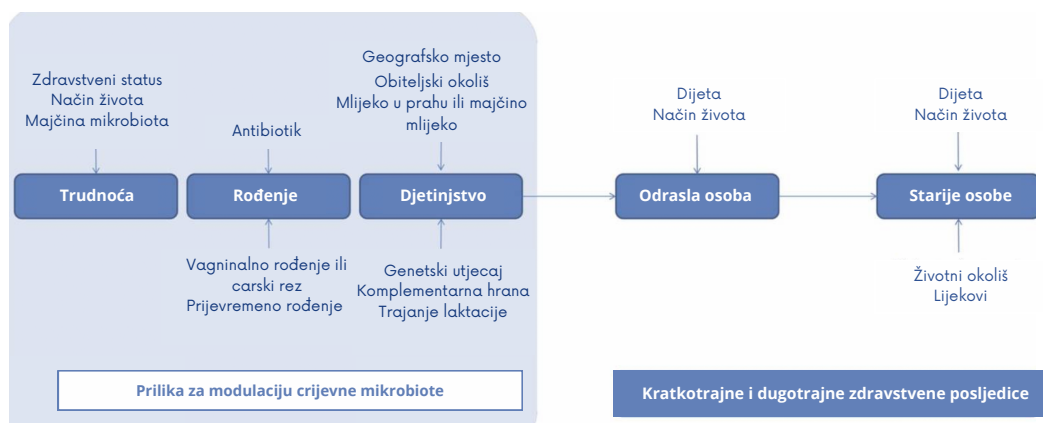
Slika 1. Struktura crijevnog epitela i njegova funkcija u apsorpciji antigena. Crijevni epitel se sastoji matičnih stanica, panetovih stanica, vrčastih stanica, resičastih stanica, enteroendokrinih stanica, enterocita (tanko crijevo), kolonocita (debelo crijevo) i M stanica koje se nalaze iznad limfoidnog folikula (preuzeto i prilagođeno prema Ali i sur., 2020).

2.2. RAZVITAK RAZNOLIKOSTI I RASPODJELA CRIJEVNE MIKROBIOTE

Razvitak novih tehnologija omogućio je raspravu o pitanjima u vezi mikrobiote koja dosada nisu mogla biti objašnjena (Ursell i sur., 2012). Nedavno istraživanje je analizom velikog broja uzoraka (18 348 uzoraka fekalnih 16S rRNA skupljenih tijekom cijele godine) 14 nasumičnih ljudi pokazalo velike razlike u mikrobnim zajednicama (Turnbaugh i sur., 2007). Za razliku od ljudskog genoma koji može biti 99.9% identičan između individualaca, mikrobiota se može razlikovati za 80-90%. Ovakve razlike služe kao novi skup podataka koji može biti korišten u novom pristupu personaliziranoj medicini (Ursell i sur., 2012).

2.2.1. Razvoj crijevne mikrobiote od rođenja do uspostave stabilne mikrobiote

Tijekom svakog stupnja razvoja postoji nekoliko čimbenika koji utječu na dinamičan razvoj mikrobiote i njezin sastav koji dalje tijekom odraslog života i starosti može imati utjecaj na zdravstveno stanje (Slika 2.) Nedavna istraživanja dokazala su prisutnost mikroorganizama tijekom razvitka *in utero*. Prisutnost mikroorganizama otkrivena je u amniotskoj tekućini, pupčanoj vrpci, fetalnoj membrani, placenti i mekoniumu za koje se prije mislilo da su sterilni. Za mekonium se pokazalo da mikrobiota može biti klasificirana dvama porodicama; *Enterobacteriaceae* i *Firmicutes*, za koje se smatra da koloniziraju probavni sustav putem progutane amniotske tekućine i nalikuju flori majčine maternice (Tanaka i Nakayama, 2017).



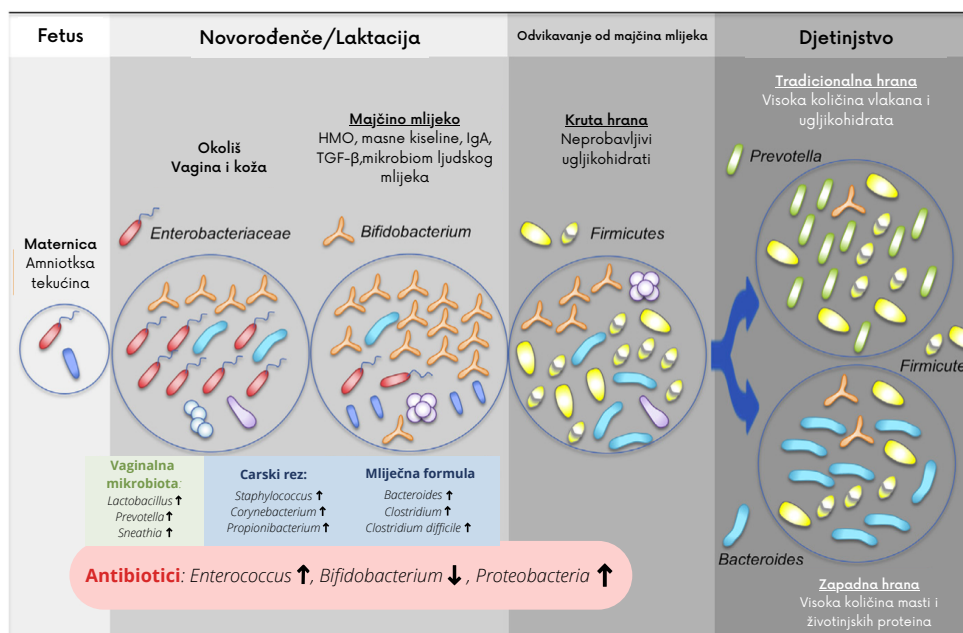
Slika 2. Čimbenici koji utječu na razvoj mikrobiote tijekom cijelog života. Prve 3 godine predstavljaju najvažnije razdoblje prilikom kojeg način prehrane može pozitivno utjecati na modulaciju mikrobiote, razvoj djeteta i daljnje zdravlje (preuzeto i prilagođeno prema Rodriguez i sur., 2015).

Sastav crijevne mikrobiote mladog djeteta također ovisi o načinu poroda i gastacijskom periodu. U slučaju djece rođene prijevremeno, primjećuju se niže razine *Bifidobacterium* i

Bacteroides i povećane razine *Enterococcus* i *Proteobacteria* za koje se smatra da su indikatori razvitka bolesti (Rodriguez i sur., 2015). Nadalje, kod djece rođene vaginalnim putem, 20 minuta nakon poroda crijevna mikrobiota je nalik majčinoj vaginalnoj flori dok je kod djece rođene carskim rezom nalik na kožnu mikrobiotu (Slika 2.) koja se povezuje s povećanim rizikom razvitka alergija i celijakije (Ursell i sur., 2012; Tanaka i Nakayama, 2017). Prije uspostave stabilne mikrobiote koja nastupa između treće i pete godine života, način prehrane novorođenčadi i uvođenje čvrste hrane čine dva ključna modulatora raznolikosti crijevne mikrobiote (Jandhyala i sur., 2015).

Majčino mlijeko i mlijeko u prahu (formula za bebe) predstavljaju dva glavna načina prehrane novorođenčadi. Majčino mlijeko sadrži masti, proteine, ugljikohidrate, endokanabinoide i imunoglobuline (Tanaka i Nakayama, 2017). Djeca hranjena majčinim mlijekom imaju povećanu prisutnost mliječno fermentirajućih bakterija; *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* zajedno sa pretežito aerobnim svojstava (Jandhyala i sur., 2015). Kao supstrat za fermentaciju u utrobi novorođenčadi koriste se galaktooligosaharidi (GOS) koji su glavni sastav oligosaharida majčinog mlijeka (engl. *Human milk oligosaccharides*, HMO). Produkt fermentacije su kratkolančane masne kiseline koje imaju ulogu u modulaciji imunološkog sustava (Morrison i Preston, 2015). Ovakav način prehrane povećava populaciju i promovira rast *Bifidobacterium infantis* koji se povezuje s povećanom sekrecijom IgA i protuupalnim djelovanjem. Osim toga, majčino mlijeko nije sterilno i sadrži mliječne bakterije poput *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* i *Weissella*. Također, sadrži komponente koje potiču razvitak imunskog sustava, selekciju bakterija koje koloniziraju probavni sustav te razvitak tolerancije na njih; IgA, IgG, lizozim, limfociti, laktoferin te regulatorne citokine, interleukin 10 (IL-10) i TGF- β (Tanaka i Nakayama, 2017).

Usprkos unaprjeđenju sastava mliječne formule dodatkom oligosaharida koji pomažu u uspostavi stabilne populacije *Bifidobacterium*, razna istraživanja ukazuju na prisutnost anaerobnih bakterija (Slika 3.) poput *Enterococcus*, *Enterobacteria*, *Bacteroides* i *Clostridia* (Jandhyala i sur., 2015, Tanaka i Nakayama, 2017). Iako *Bacteroides* sp. također može vršiti fermentaciju HMO, populacija *Bifidobacterium* je i dalje viša kod djece hranjene majčinim mlijekom što upućuje na njihov kompetitivni odnos (Jandhyala i sur., 2015).



Slika 3. Kolonizacija crijevne mikrobiote od novorođenčadi do djetinjstva s čimbenicima koji utječu na taj proces. Uspostava crijevne mikrobiote može početi *in vitro* te dalje se razvijati dinamičkim procesima u ranom djetinjstvu. Raznolikost crijevne mikrobiote se povećava s dobi dok ne postigne stabilnost. Na proces sazrijevanja utječu čimbenici poput načina poroda, prehrane, čvrste hrane i hrane konzumirane tijekom djetinjstva.

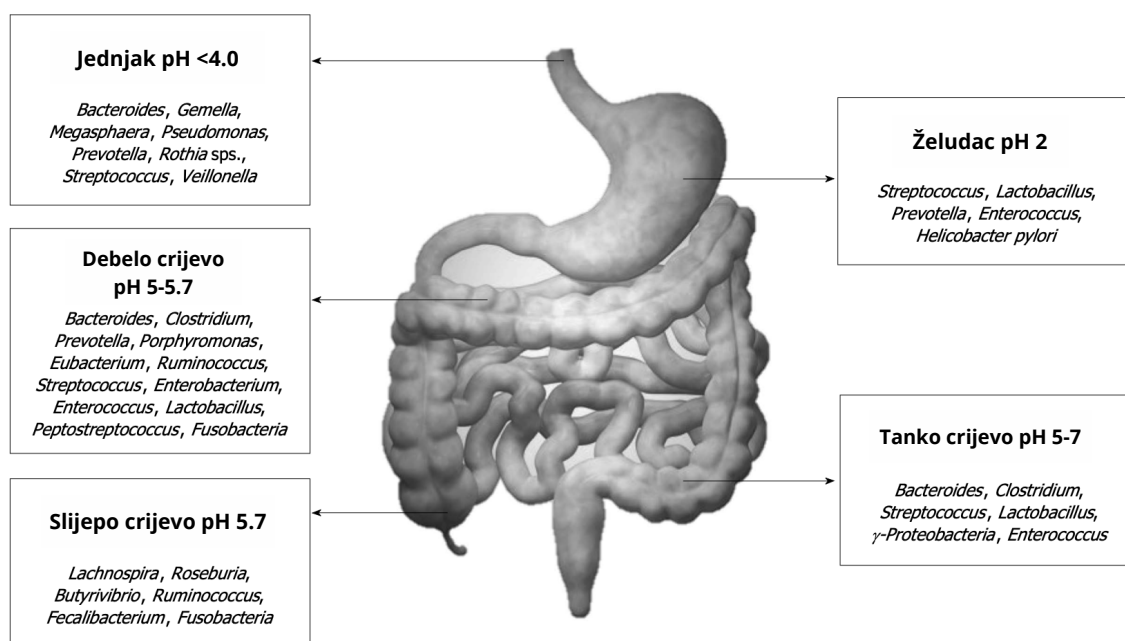
Trenutačno nema čvrstih dokaza koji povezuju razvitak određenih bolesti ili alergija s načinom prehrane tijekom ranog razvitka zbog kompleksnog odnosa domaćina i mikrobiote koji ostaje nepotpuno razjašnjen. Načina poroda i prekomjerno korištenje antibiotika povezuje se s povećanim rizikom od razvitka određenih bolesti i alergija. Istraživanja su također pokazala djelomični uspjeh u obnovi raznovrsnosti crijevne mikrobiote putem zamjene mlijeka u prahu pasteriziranim ljudskim mlijekom (Tanaka i Nakayama, 2017).

Uvođenje čvrste hrane, primarno neprobavljivih ugljikohidrata, popraćena je s promjenom u sastavu bakterija s dominantnim porodicama *Bacteroides* i *Firmicutes*. Daljnji utjecaj na sastav mikrobiote odraslih i starijih osoba imaju način prehrane, stil života i korištenje antibiotika (Slika 2.) (Rodriguez i sur., 2015).

Osim toga, bitno je napomenuti da jednu od uloga u oblikovanju crijevne mikrobiote ima i genom domaćina. Trenutačna istraživanja provedena su na jednojajčanim i dvojajčanim blizancima (416 i 1126 parova) gdje je analizom 16S rRNA otkriveno mnogo nasljednih svojti od kojih se najviše ističe rod *Christensenellaceae* iz porodice *Firmicutes* (Cahana i Iraqi, 2020).

2.2.2. Sastav zdrave crijevne mikrobiote

S obzirom da ljudska mikrobiota i okoliš imaju vrlo dinamičku interakciju, jedan od izazova koji se pojavljuje je definiranje osnovne crijevne mikrobiote koja se zatim može iskoristiti u moduliranju njezina sastava (Ursell i sur., 2012). Zdravu mikrobiotu karakteriziraju dvije dominantne porodice *Bacteroides* i *Firmicutes* (Turnbaugh i sur., 2007; Ursell, 2012; Sredine i sur., 2014; Jandhyala i sur., 2015) koje slijede *Actinobacteria* i *Verrucomicrobia*. Iako ovaj omjer ostaje relativno stalan, bitno je napomenuti da se od jednjaka pa do rektuma izmjenjuje količina bakterija i njihova raznovrsnost (Slika 4.). Najveća količina bakterija i raznovrsnost zabilježena je u debelom crijevu gdje se omjer dvaju dominantnih porodica potencijalno povezuje s utjecajem crijevne mikrobiote na razvitak bolesti (Jandhyala, 2015). Također, rodovi *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* i *Akkermansia* čine rodove koji su zastupljeni u mukoznom sloju, dok su *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* i *Akkermansia* mikrobnih rodovi koji obitavaju u lumenu i otkrivaju se analizom fecesa (Jandhyala i sur., 2015).



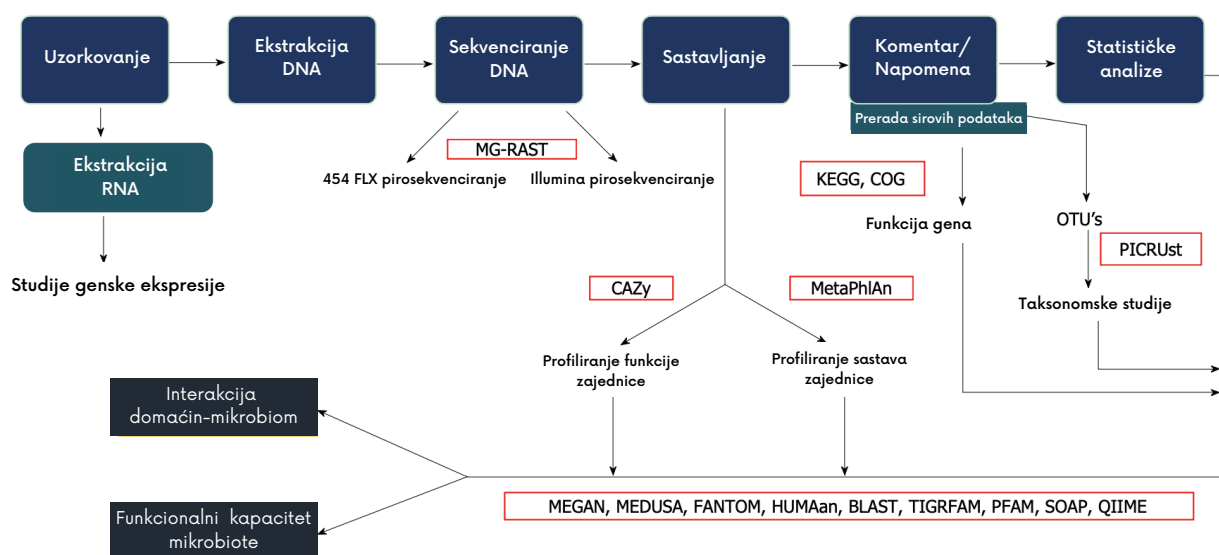
Slika 4. Distribucija normalne ljudske crijevne flore (preuzeto i prilagođeno prema Jandhyala i sur., 2015).

2.3 ANALIZA SASTAVA CRIJEVNE MIKROBIOTE

Prvi pokušaji izolacije i promatranja crijevne mikrobiote temeljili su se na uzgoju u petrijevim zdjelicama. Ovakav pristup omogućio je izolaciju samo 10%-15% članova

mikrobiote s obzirom na anaerobnu prirodu većine mikroorganizama. Poboljšanje tehnika anaerobnog uzgoja kultura, rezultiralo je uspješnim uzgojem dominantnih anaerobnih rodova, ali s obzirom da se radilo o kompleksnom i vremenski zahtjevnom procesu koji nije davao željene rezultate, crijevna mikrobiota se danas analizira na temelju sekvenciranja 16S rRNA, bioinformatičkih analiza (Slika 5.) i metabolomika (analiza mikrobnih produkata) (Jandhyala i sur., 2015)

Analiza crijevne mikrobiote započinje sakupljanjem uzoraka fecesa i DNA izolacijom. 16S rRNA gen kodira malu podjedinicu ribosoma. Male je veličine (1.5 Kb), visoko konzerviran s 9 hipervarijabilnih regija (od kojih se najčešće koriste V3, V4, V6 i V8) koje su specifične za svaku bakterijsku vrstu te omogućuju klasifikaciju i taksonomiju. Konzervirane regije također omogućuju razvitak početnica koje se vežu na zajedničke sekvence mnogih bakterija (Jandhyala i sur., 2015; Ames i sur., 2018). Metode sekvenciranja sljedeće generacije (engl. *Next generation sequencing*, NSG) je pojam koji obuhvaća različite tehnike sekvenciranja koje iako vrlo uspješne imaju nekoliko nedostataka. Problemi koji se javljaju uključuju odabir početnica, varijabilnost dobivenih rezultata, veliki financijski trošak, velika duljina trajanja i slično. Obrada dobivenih podataka bioinformatičkim analizama omogućuje organizaciju i interpretaciju velike količine podataka (Jandhyala i sur., 2015).



Slika 5. Proces analize mikrobiote. Slika pokazuje korake potrebne za bioinformatičku analizu. Omogućuje se promatranje interakcije između domaćina i mikroba zajedno s funkcionalnim učincima mikrobiote. MG-RAST (engl. *Metagenomics rapid annotation using subsystem technology*), CAZy (engl. *Carbohydrate active-enzymes*), MetaPhlAn (engl. *Metagenomic phylogenetic analysis*), KEGG (engl. *Kyoto encyclopaedia for genes and genomics*), COG (engl. *Clusters of orthologous group*), PICRUSt (engl. *Phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states*), MEGAN (engl. *Meta genome analyzer*), MEDUSA (engl. *Metagenomic data utilization and analysis*), FANTOM (engl. *Functional annotation and taxonomic analysis of metagenomes*), HUMAan (engl. *Human microbiome project unified metabolic analysis network*), BLAST (engl. *Basic local alignment search tool*), TIGRFAM (engl. *Protein sequence classification*), PFAM (engl. *Protein families*), SOAP (engl. *Short oligonucleotide analysis package*), QIIME (engl. *Quantitative insights into microbial ecology*) (preuzeto i prilagođeno prema Jandhyala i sur., 2015).

3. IMUNOSNI SUSTAV I CRIJEVNA MIKROBIOTA

Crijevna mikrobiota sudjeluje i utječe na metabolizam nutrijenata, lijekova i ksenobiotika, antimikrobnu zaštitu, ponašanje, imunomodulaciju i drugo (Foster i Neufeld, 2013, Jandhyala i sur., 2015). Imunomodulacija je dvosmjerna interakcija imunosnih stanica koje nalazimo u *lamina propria* i mikrobiote koja se nalazi u lumenu i mukoznom sloju. Stanice i tkiva imunosnog sustava koje sudjeluju u ovom procesu su limfno tkivo pridruženo crijevima (engl. *Gut associated lymphoid tissue*, GALT), regulatorne i efektorske T stanice, B stanice, urođene limfoidne stanice, makrofagi, DC i *lamina propria* (Jandhyala i sur., 2015, Zhou i sur., 2021). Crijevna mikrobiota sustavno održava homeostazu djelovanjem na imunosni odgovor u distalnim mukoznim površinama, perifernim limfnim čvorovima i slezeni, dok lokalno djeluje održavanjem mukozne barijere i interakcijom s okolnim limfnim tkivom (Fessler i sur., 2019, Zhou i sur., 2021).

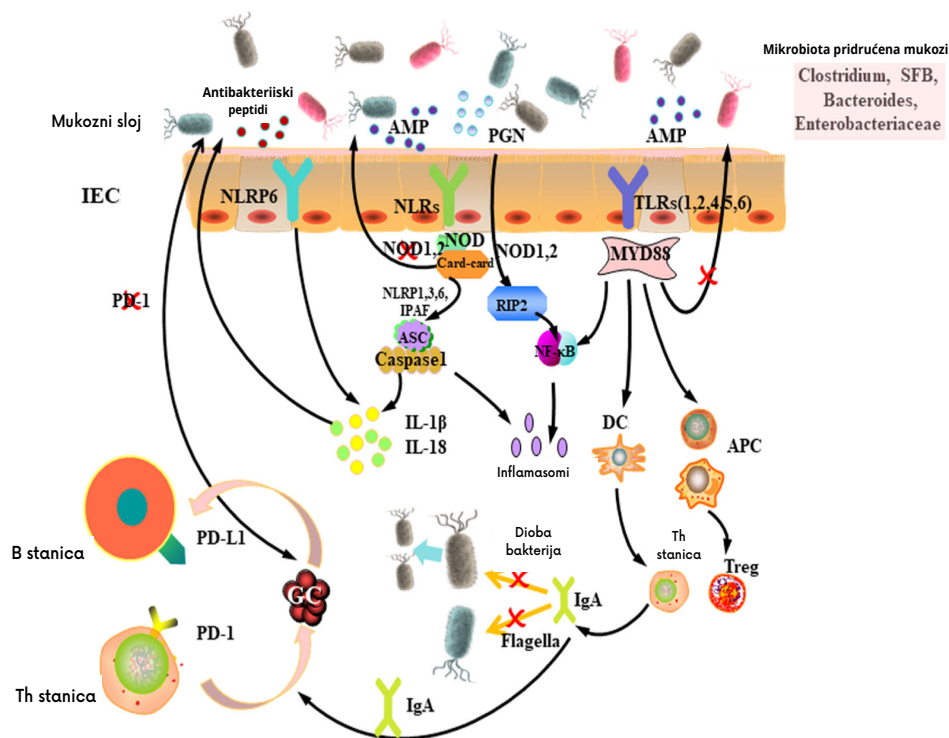
3.1. REGULACIJA UROĐENOG IMUNOSNOG SUSTAVA CRIJEVNOM MIKROBIOTOM

3.1.1. Receptori za prepoznavanje obrazaca (PRR) i njihovo djelovanje

Dnevni unos različitih antigena i mikroorganizama postavlja crijevnu sluznicu kao jednu od primarnih barijera protiv prodora patogena. Receptori za prepoznavanje obrazaca (engl. *Pattern recognizing receptors*, PRR) nalaze se na stanicama urođene imunosti i IEC te služe kao poveznica stečene i urođene imunosti, ali i za razlikovanje patogenih od komenzalnih bakterija (O'Hara i Shanahan, 2006; Zhou i sur., 2021). Receptori prepoznaju patogene molekularne obrasce (engl. *Pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) i molekularne obrasce povezane s oštećenjem tkiva (engl. *Damage-associated molecular patterns*, DAMP) koji indukcijom signala utječu na kolonizaciju mikrobiote. Dvije najčešće skupine receptora su receptori slični Tollu (engl. *Toll-like receptors*, TLR) i receptori slični NOD-u (engl. *NOD-like receptors*, NLR) koji se nalaze na membranama stanice ili u citosolu. TLR su podijeljeni ovisno o ligandu koji pokreće signalni put. TLR1, 2, 4, 5 i 6 prepoznaju izvanstanične mikrobnne obrasce (lipopolisaharidi, flagelin, nemetilirani CpG otoci, lipoglikani) dok TLR3, 7, 8 i 9 prepoznaju virusne čestice. Prijenos signala TLR3 i 4 odvija se preko čimbenika TRIF dok kod ostalih TLR odvija se putem proteinskog čimbenika MYD88. Aktivacija TLR2 ligandima (bakterijski lipoproteini ili lipopeptidi) uzrokuje formiranje heterodimera s TLR1 ili TLR6 koji se vežu sa proteinom Myd88 i pokreću signalni put koji rezultira aktivacijom transkripcijskog čimbenika, nuklearnog čimbenika kappa b (NF- κ B). Slično se događa i sa TLR4 koji za pokretanje istog signalnog puta zahtjeva lipopolisaharid kao ligand i TRIF povezanu adaptorsku molekulu (TRAM) kojom aktivira NF- κ B. Aktivacijom NF- κ B započinje lučenje proupalnih čimbenika (Slika 6.). Nedostatak signala Myd88 povećava količinu bakterija u mukoznom sloju i njihovu translokaciju u okolne limfne čvorove (mLNS) (Dai i sur., 2020).

NLR također otkrivaju prisutnost mikrobnih čestica. NOD1 i NOD2 su aktivirani komponentama peptidoglikana (PGN), od kojih je NOD2 aktiviran muramil dipeptidom i najčešće se koristi za prijenos upalnih signala koji uzrokuju otpuštanje proupalnih medijatora. Drugi tipovi NLR kao što su NLRP1, NLRP2, NLRP6 sudjeluju u formiranju inflamiasoma, aktivaciji kaspaze 1, oslobađanju IL-1 β , IL-18 i održavanju stabilnosti mukoznog sloja i antibakterijskih peptida. Nedostatak NOD1 i NOD2 receptora pokazuje povećanje populacije mikrobiote. Ovakvo povećanje populacije mikrobiote upućuje na ulogu PRR kao modulatora odgovora urođenog imunosnog sustava na crijevnu mikrobiotu (Dai i sur., 2020).

Stanice urođene imunosti kao što su DC i makrofagi imaju jedinstvene prilagodbe kojima sudjeluju u održavanju simbiotskih odnosa s komenzalnom mikrobiotom. DC koje se nalaze u Pejerovim pločama proizvode velike količine regulatornog IL-10 u usporedbi s DC koje se nalaze u slezeni. Makrofagi koji se nalaze u *lamini propria* razvijaju jedinstveni fenotip pod nazivom *upalna anergija*. U homeostatskim uvjetima u odgovoru na mikrobní podražaj putem TLR crijevni makrofagi ne proizvode proupalne citokine. Također, kod sterilnih miševa zámijećena je smanjena populacija crijevnih makrofaga te smanjenje kolićine neutrofila. Povratak sterilnih miševa u normalan okoliš nije mogao inducirati povratak uobićajene populacije neutrofila iako je u sličnim istraživanjima dokazano da indukcija signala peptidoglikanom putem NOD1 receptora potiće aktivnost neutrofila koštane srži. Prirodno-ubilaćke stanice (engl. *Natural killer cells*, NK) pridružene mukozi, na površini nose receptor NKp46⁺ i izlućuju IL-22. Takva populacija stanice nedostaje kod sterilnih miševa i upućuje na bitnu ulogu crijevne mikrobiote u promoviranju njihove diferencijacije (Wu i Wu, 2012).



Slika 6. TLR i NLR reguliraju imunofunkciju crijeva. Manjak TLR adaptorskog proteina MYD88 promijeniti će sastav mikrobiote na način da se povećava razina mikrobiote u mukoznom sloju. Manjak NOD1 dovodi do povećanja mikrobne populacije s povećanim brojem *Clostridium*, *Bacteroides*, segmentiranih filamentoznih bakterija i *Enterobacteriaceae*. Manjak NOD2 utjeće na povećanje bakterija mukoznog sloja što inducira upalne procese i nastanak kolorektalnog karcinoma. Mikrobiota proizvodi metabolite koji aktiviraju PRR što održava

stabilnost mukoznog sloja i antimikrobnih peptida. Aktivacija antigen predočnih stanica promovira diferencijaciju CD4+ T stanica u pomoćničke i regulatorne stanice T. Pomoćničke stanice T reguliraju funkciju crijevne mikrobiote putem ekspresije imunoglobulina A (IgA). Također, sekrecija IgA je regulirana vezanjem PD-1 na površini pomoćničkih stanica T na PD-L1 koji se nalazi na površini B stanicama (preuzeto i prilagođeno prema Dai i sur., 2020).

3.2. REGULACIJA STEČENOG IMUNOSNOG SUSTAVA CRIJEVNOM MIKROBIOTOM

3.2.1. *Imunoglobulin A (IgA)*

IEC i DC sudjeluju u indukciji imunskog odgovora putem mikrobnih senzora (TLR i NLR) koji uključuje lučenje IgA plazma stanica (Gutzeit i sur., 2014). Mukozni IgA se izlučuje na površinu crijevnog epitela i vezanjem ciljanih antigena sprječava njihovu direktnu interakciju s domaćinom. Plazma stanice produciraju IgA putem dvaju mehanizama koji su ovisni ili neovisni o T stanicama. Mehanizam ovisan o T stanicama odvija se većinom u Pejerovim pločama, gdje se prijenos antigena vrši od M stanica do DC koje induciraju diferencijaciju T folikularnih stanica. Lučenje IL-21 i koostimulatorni signal CD40 i CD40L promoviraju lučenje IgA. Neovisni mehanizam uključuje kooperaciju IEC, DC i intraepitelnih limfocita u *lamina propria* i izoliranim limfnim folikulima gdje lučenje čimbenika APRIL iz DC promovira lučenje IgA (Honda i Littman, 2016).

IgA ima veliku ulogu u održavanju simbiotskog odnosa mikrobiote i imunskog sustava (Dai i sur., 2020). Utječe na povećanje raznolikosti mikrobne zajednice kroz procese afinitetnog sazrijevanja i somatske rekombinacije gdje veže i odabire određene komponente mikrobiote (Honda i Littman, 2016). Mikrobiota koju primarno veže IgA je ona koja kolonizira mukozni sloj. U slučaju bakterije *Shigella flexeri*, IgA može potaknuti njezino odlaganje u mukozni sloj nakon čega putem aglutinacije promovira njezino uklanjanje. Također, vezanjem IgA za flagelin, ograničava se bakterijska pokretljivost (Dai i sur., 2020). Određene bakterije poput segmentiranih filamentoznih bakterija (engl. *Segmented filamentous bacteria*, SFB) i *Mucispirillum* povezuju se s indukcijom IgA odgovora ovisnog o stanicama T. Osim toga, zapaženo je da IgA regulira ekspresiju bakterijskih gena što je dokazano na primjeru komenzalne bakterije *Bacteroides thetaiotamicron*. U prisustvu IgA ne uzrokuje upalu, ali prilikom nedostatka IgA izlučuje visoku količinu genskih produkata uključenih u metabolizam dušikovog oksida koji pokazuje proupalno djelovanje (Honda i Littman, 2016).

Kako se raznovrsnost i kompleksnost mikrobiote povećava, tako se povećava i raznovrsnost IgA koji se dinamično prilagođava promjenama u sastavu mikrobiote na temelju ponovnog ulaska klonova B stanica u germinativni centar i procesa somatske rekombinacije klonova koji već postoje u njemu (Honda i Littman, 2016).

3.2.2. Pomoćničke stanice T 17 (Th17)

SFB se smatraju vrstom bakterija koje kroz blisku interakciju s crijevnim epitelom imaju ulogu u modulaciji stečene imunosti. SFB se nalaze u probavnom sustavu raznih kralješnjaka kao što su ribe, štakori i miševi, specifične su prema domaćinu u kojem se nalaze, no direktni dokazi o prisutnosti SFB u ljudima nisu postojali do 2018. kada Chen i sur. dokazuju njihovu prisutnost u uzorcima stanovnika Kine i Sjedinjenih američkih država. Ova spoznaja upućuje na njihovu ulogu modulacije imunskog sustava kao i kod promatranih miševa (Honda i Littman, 2016; Chen i sur., 2018). Vezanjem na površinu IEC, SFB mogu potaknuti lučenje proteina akutne faze upale, serumskog amiloida A koji potiče diferencijaciju Th17 stanica i lučenje IL-17 (Dai i sur., 2020).

Osim njih, indukciju Th17 stanica u ljudskoj mikrobioti može potaknuti *Bifidobacterium adolescentis* koji je također usko povezan s stanicama crijevnog epitela kao i patogene bakterije *Citrobacter rodentium* i *Escherichia coli* dokazane u mišjim modelima (Honda i Littman, 2016; Skelly i sur., 2019). Th17 stanice su diferencirane CD4⁺ T stanice koje su najbrojnije u *lamina propria* gdje čine 30-40% CD4⁺ T stanica. Osim lučenja IL-17a-f i IL-22, stimuliraju proizvodnju antimikrobnih peptida i formiranje tijesnih spojeva između IEC. Crijevna mikrobiota se smatra jednim od najbitnijih čimbenika koji utječu na diferencijaciju Th17 stanica, što je pokazano u sterilnim miševima gdje je zamijećena mala količina Th17 stanica u *lamina propria* (Honda i Littman, 2016).

3.2.3. Regulatorne T stanice (Treg)

Treg su podvrsta T stanica koje čine veliki udio T stanica u *lamina propria*. Djeluju protuupalno, inhibicijom aktivnost tipa 1 pomoćničkih T stanica (Th1) putem regulatornog citokina IL-10, zaslužnog za inhibiciju gama delta T stanica i Th17 stanica (Honda i Littman, 2016; Dai i sur., 2020). Istraživanja upućuju na ulogu komenzalne mikrobiote u diferencijaciji Treg stanica koje se nalaze u kolonu (Honda i Littman, 2016).

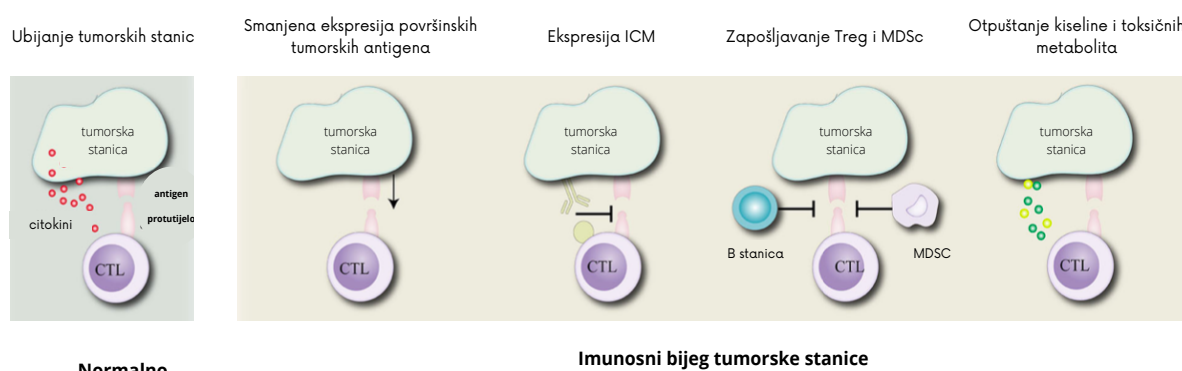
Nekoliko sojeva roda *Clorstridia* ima ulogu u sakupljanju velikog broja Treg u kolonu putem induciranja proizvodnje IL-10. Pokazano je da *Clostridia* ima mogućnost induciranja okoliša bogatog TGF- β koji omogućuje diferencijaciju Treg (Honda i Littman, 2016, Dai i sur., 2020). Produkti bakterija poput kratkolančanih masnih kiselina (engl. *Short-chain fatty acids*, SCFA) (butirat i propionat) inhibiraju aktivnost histonske deacetilaze koja promovira diferencijaciju naivnih T stanica u Treg. Butirat također može inducirati IEC da proizvode okoliš bogat TGF- β koji promovira diferencijaciju Treg (Dai i sur., 2020). *Bacteroides fragilis* ima ulogu u imunomodulaciji putem simbiotskog čimbenika polisaharida A (PSA) koji stimulira TLR2 na CD4+ T stanicama i uzrokuje lučenje IL-10, TGF- β i diferencijaciju Treg (Skelly i sur., 2019; Dai i sur., 2020). Povećana razina *Clostridium* i *Bacteroides fragilis* uzrokuju diferencijaciju inducibilnih Treg, podvrste crijevnih T stanica čija diferencijacija ovisi o stimulaciji mikrobnim antigenima (Dai i sur., 2020).

4. CRIJEVNA MIKROBIOTA, RAK I IMUNOTERAPIJA

Održavanje imunosne homeostaze zahtjeva koordinaciju imunosnih tkiva, stanica i utjecaje mikrookoliša (Dai i sur., 2020). Aktivacijom programirane stanične smrti, citotoksične CD8+ T stanice prepoznavanjem površinskih antigena, uklanjaju tumorske stanice (Stancu, 2018). Tumori izbjegavaju imunosnu kontrolu pomoću 4 glavna mehanizma (Slika 7.): ekspresijom imunosnih kontrolnih točaka, smanjenom ekspresijom tumorskih antigena, korištenjem imunosnih stanica i njihovih citokina radi izbjegavanja imunosnog odgovora te otpuštanjem toksičnih metabolita koji inhibiraju aktivnost imunosnih stanica u mikrookolišu tumora. Crijevna mikrobiota čini vrlo kompleksnu zajednicu koja može poticati ili suprimirati nastanak tumora. Razumijevanje jednog od mehanizama kojim tumor izbjegava imunosni odgovor dovodi do razvitka inhibitora imunosnih kontrolnih točaka (engl. *Immune checkpoint inhibitor*, ICI). Radi se o monoklonalnim protutijelima koja vezanjem na površinske receptore ili ligande sprječavaju supresiju imunosnih stanica (Wan i sur., 2021). Ipak, većina pacijenata razvija rezistentnost ili kratkotrajni odgovor na ICI. Isprva znanstvenici nisu bili sigurni kakav utjecaj mikrobiota ima na imunosni odgovor i liječenje tumora putem imunosnih kontrolnih točaka. U svojim istraživanjima na mišjim i ljudskim modelima, Sivan i sur. (2015) te Vétizou i sur. (2015) ukazuju na potencijal mikrobiote kao modulatora odgovora na ovaj tip imunoterapije tumora (Dai i sur., 2020).

4.1. MIKROOKOLIŠ TUMORA

Tumor predstavlja skupinu promijenjenih heterogenih stanica koje potiču niz fizioloških promjena unutar domaćina radi osiguravanja daljnjeg rasta i progresije. Mikrookoliš tumora neprestano napreduje i predstavlja vrlo kompleksni entitet. Tip mikrookoliša ovisi o tipu tumora, a sastoji se od imunskih stanica, stromalnih stanica, krvnih žila i izvanstaničnog matriksa. Komponente mikrookoliša i stanice raka razvijaju kompleksnu dvosmjernu interakciju koja podržava preživljavanje i progresiju stanica raka te angiogenezu radi opskrbe okoliša kisikom i nutrijentima. Ovakva obilježja upućuju na ulogu mikrookoliša tumora kao aktivnog promotora progresije raka (Anderson i Simon, 2020).



Slika 7. Mehanizmi kojima tumor izbjegava imunski odgovor. U normalnim uvjetima citotoksične T stanice ubijaju tumorske stanice izlučivanjem citokina i prepoznavanjem antigenskih determinanti na površini tumorskih stanica. Tumorske stanice smanjuju svoju imunogenost redukcijom ekspresije površinskih antigena, ekspimiranjem imunskih kontrolnih molekula, upotrebom imunskih stanica i izlučivanjem toksičnih metabolita. ICM; imunске kontrolne molekule (engl. *Immune checkpoint molecules*) (preuzeto i prilagođeno prema Wan i sur., 2021).

Utjecaj vanjskih čimbenika na razvitak tumora zapažen je 1967. kada Sacksteder opaža razvitak spontanih neoplazija u sterilnim miševima. Mikrobiota se smatra novom komponentom mikrookoliša tumora, ekstrinzičnim čimbenikom koji djelovanjem na imunski sustav potiče proupalne procese, održava stabilnost barijera, potiče lučenje bakterijskih toksina i metabolita koji pomažu u modulaciji imunskog odgovora zaslužnog za sprječavanje ili progresiju tumora (Bullman i sur., 2021; Kovács i sur., 2020).

4.1.1. Promoviranje tumorogeneze crijevnom mikrobiotom

Disbioza je proces koji uzrokuje promjenu u sastavu crijevne mikrobiote, a može biti potaknuta korištenjem antibiotika, načinom života i neujednačenom prehranom (Slika 8.). Promjene u sastavu crijevne mikrobiote kao što su smanjena raznolikost i stabilnost mikrobiote

moгу dovesti do povećane količine patogenih bakterija koje se povezuju s nastankom raka (Bhatt i sur., 2017). Nastanak tumora u organima koji dio gastrointestinalnog sustava (jetra, grudi, gušterača, usna šupljina i pluća) povezuju se s disbiozom crijevne mikrobiote zbog povezanosti putem krvožilnog sustava. Bitno je napomenuti da se svaki od organa nalazi u svome jedinstvenom okolišu kojeg karakterizira i specifična mikrobiota što čini dodatni čimbenik koji može utjecati na progresiju raka (Kovács i sur., 2020).

U nekoliko istraživanja kolorektalnog karcinoma u uzorcima je pronađena manja količina dvaju dominantnih rodova *Firmicutes* i *Bacteroides* te povećana količina *Fusobacterium sp.*, anaerobne bakterije povezane s upalom slijepoga crijeva (Bhatt i sur., 2017). *Fusobacterium nucleatum* pronađen je u mikrookolišu mnogih tumora gdje su utvrđena njegova imunosupresivna svojstva. Onemogućuje aktivnost citotoksičnih T stanica i NK stanica vezanjem bakterijskog proteina Fap2 na inhibitorni NK receptor TIGIT. Receptor TIGIT je također prisutan na memorijskim T stanicama gdje prisutnost *F. nucleatum* ometa lučenje IFN- γ (Zhou i sur., 2021; Bagheri i sur., 2022).

Enterotoksična *Bacteroides fragilis* producira toksin (BFT) koji podržava nastanak Th17 ovisnog kolitisa (Bhatt i sur., 2017) i povezuje se s nastankom raka debela crijeva u mišjim i ljudskim modelima (Wan i sur., 2021). Produkcija toksina BFT i lučenje IL-17 utječe na epitelne stanice u kolonu, cijepanje E-kadherina koji promovira ekspresiju protoonkogeno MYC (Bagheri i sur., 2022), diferencijaciju mijeloidnih supresivnih stanica koje generiraju dušikov oksid (NO) i inhibiraju proliferaciju T stanice u mikrookolišu tumora (Zhou i sur., 2021).

Helicobacter pylori je jedna od 10 poznatih patogenih bakterija za koje je dokazano da promoviraju tumorogenezu u debelom crijevu (Kovács i sur., 2020). Uzrokuje smanjenu količinu klorovodične kiseline (Wan i sur., 2021) i povećanu količinu acetaldehida zbog visoke aktivnosti alkoholne dehidrogenaze. Povećane količine acetaldehida u mukoznom sloju uzrokuju poremećaj u apsorpciji nutrijenata i povećan rizik nastanka polipa i tumora (Kovács i sur., 2020). Pomoću *H. pylori* dokazano je da mikrobiota ima specifičan utjecaj ovisno o organu u kojem se nalazi. Iako povećava rizik nastanka tumora u želudcu i plućima, u jednaku smanjuje rizik nastanka adenokarcinoma (Wan i sur., 2021).

Produkcija bakterijskih toksina poput kolibaktina *E. coli* (Bhatt i sur., 2017) također utječe na tumorogenezu, oštećenjem molekule DNK što uzrokuje nastanak mutacija (Bhatt i sur., 2017). Bakterijski toksini *Enterococcus faecalis* uzrokuju nakupljanje reaktivnih oblika kisika koji indirektno oštećuju DNK nastankom vodikova peroksida (Wan i sur., 2021; Bhatt i sur., 2017).

Dijeta zajedno s mukozom pridruženom mikrobiotom regulira stabilnost mukozne barijere i sprječava translokaciju mikroba u okolna tkiva. Oslabljena mukozna barijera kao posljedica disbioze ili korištenja antibiotika može potaknuti sistematski imunosni odgovor. Prehrana koja sadrži malu količinu vlakana modulira sastav crijevne mikrobiote na način da smanjuje količinu fermentirajućih, butirat-producirajućih bakterija te povećava količinu *Akkermansia muciniphila* i *Bacteroides caccae* koje su zaslužne za razaranje mukoznog sloja u takvim uvjetima. *Citrobacter rodentium* je mukozni patogen koji uzrokuje oštećenje crijevnog epitela i kolitis te se povezuje s nastankom kolorektalnog karcinoma. Osim toga, smanjena količina butirata uzrokuje oštećenja čvrstih spojeva u crijevnom epitelu zbog njegove uloge promotora proizvodnje proteina okludina i kladina koji čine čvrste spojeve. Ovi učinci promoviraju proces prijelaza epitel-mezenhim (engl. *Epithelial-mesenchymal transition*, EMT) gdje stanice crijevnog epitela gube svoj polaritet i funkciju (Bhatt i sur., 2017; Bagheri i sur., 2022).

Acetat je kratkolančana masna kiselina koje je prisutna u velikim koncentracijama u sustavnoj cirkulaciji glodavaca i miševa. U stanicama raka eksprimirana je acetil-CoA sintetaza koja katalizira nastanak acetil-CoA iz acetata. Ovim putem se podupiru anaboličke reakcija u stanicama raka dojke, jajnika, pluća i glioblastoma te upućuju na ulogu acetata kao onkometabolita (Zitvogel i sur., 2017).

Crijevna mikrobiota također sudjeluje u proizvodnji žučnih kiselina i sumporovodika. Sumprovodnik štetno utječe na kolonocite, inhibira energetske razgradnju butirata i oštećuje epitelnu barijeru. Povezanost crijevne mikrobiote i žučnih soli je kompleksna. Članovi roda *Clostridium* (*Clostridium scindens*) imaju mogućnost konverzije primarnih u sekundarne žučne kiseline (deoksilna i litokolna kiselina). Uzrokuju proizvodnju reaktivnih oblika kisika i dušika kojima oštećuju DNK i djeluju kancerogeno. Ipak, neke žučne soli imaju suprotan učinak. Ursodeoksilna kiselina koju proizvodi *Ruminococcus gnavus* inhibira proizvodnju

reaktivnih oblika kisika i štiti stanice od štetnog utjecaja drugih žučnih kiselina poput deoksilne kiseline (Louis i sur., 2014; Zitvogel i sur., 2017).

4.1.2. Inhibiranje tumorogeneze crijevnom mikrobiotom

Pravilna prehrana, korištenje probiotika i zdravi način života promoviraju stabilnu mikrobiotu koja utječe na supresiju tumora (Slika 8.). Mikrobiota pridružena mukozi svojim metabolitima promovira stabilnost mukoznog sloja što je dokazano promatranjem crijevnog epitela sterilnih miševa gdje je zamijećena manja količina vrčastih stanica i tanji mukozni sloj (Bagheri i sur., 2022).

Vrste roda *Lactococcus* djeluju protutumorski tijekom razvoja tumora održavanjem citotoksične aktivnosti NK stanica (Kovács i sur., 2020). *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium lactis* pojačavaju fagocitnu aktivnost peritonealnih makrofaga i leukocita (Bagheri i sur., 2022). *Bifidobacterium*, *Bacteroides thetaiotaomicron* i *Bacteroides fragilis* djeluju protiv tumora poboljšavajući aktivnost citotoksičnih T stanica i DC (Kovács i sur., 2020). Utjecaj stabilne mikrobiote pokazan je tijekom kolonizacije miševa s 11 sojeva izoliranih iz ljudskog fecesa zdrave osobe. Zamijećen je razvitak otpornosti na tumore zahvaljujući lučenju IFN- γ citotoksičnih CD8+ T stanica (Bagheri i sur., 2022).

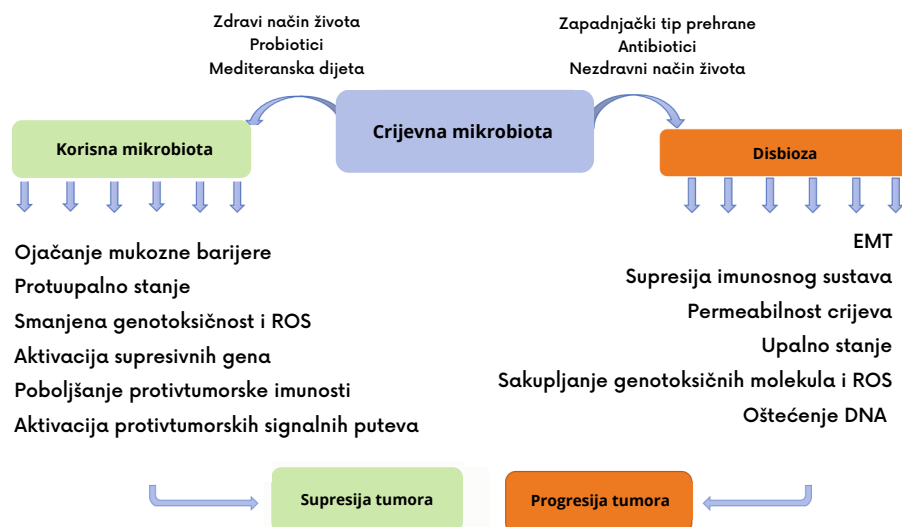
Soj *E. coli* KUB-36 ima sposobnost proizvodnje 7 SCFA i djeluje protuupalno supresijom lučenja TNF- α , IL-6, IL-8 i IL-1 β . *Lactobacillus johnsonii* smanjuje razinu NK i T stanica te povećava razinu protuupalnih citokina (Bagheri i sur., 2022).

SCFA su bakterijski produkti fermentacije neprobavljivih ugljikohidrata u debelom crijevu (Kovács i sur., 2020). SCFA su primarni izvor energije za stanice crijevnog epitela, zaslužne su za održavanje cjelovitosti epitela, regulaciju ekspresije proteina čvrstih spojeva i proizvodnju mukozne sluzi. SCFA moduliraju aktivnost neutrofila, makrofaga, mastocita, DC, T i B limfocita putem kojih djeluju protuupalno (Kovács i sur. 2020; Siddiqui i Cresci, 2021). Acetat, propionat i butirat čine 3 najzastupljenije SCFA. Proizvodnja butirata povezuje se s *Faecalibacterium prausnitzii* koja također djeluje protuupalno inhibiranjem transkripcijskog čimbenika NF- κ B i lučenja IL-8 te pokazuje mogućnost supresije angiogeneze i smanjenu ekspresiju čimbenika angiogeneze (Kovács i sur., 2020; Qiu i sur., 2021; Bagheri i sur., 2022). *Eubacterium hallii*, *Eubacterium rectale*, *Roseburia inulinivorans* i *Ruminococcus obeum* su

također butirrat-producirajuće bakterije (Kovács i sur., 2020). Butirat inducira diferencijaciju Treg stanica koje suprimiraju progresiju tumorskih stanica ulaskom u mikrookoliš tumora. Butirat suprimira tumorsku aktivnost inhibicijom histonske deacetilaze epigenetičkom regulacijom putem receptora za slobodne masne kiseline na stanicama raka (Bhatt i sur., 2017, Kovács i sur., 2020). Osim toga, ima utjecaj na matične stanice debelog crijeva gdje negativno utječe na njihovu proliferaciju i regeneraciju. U normalnim uvjetima butirat ne dopire do matičnih stanica koje se nalaze na dnu kripke jer biva iskorišten u okolnim stanicama crijevnog epitela. Ovo upućuje na ulogu butirata kao inhibitora progresije raka matičnih stanica debelog crijeva (Zitvogel i sur., 2017).

Vitamin B se ne može sintetizirati u ljudskim stanicama, nego mora biti unesen putem hrane ili sintetiziran putem crijevne mikrobiote. Crijevna mikrobiota sintezom vitamina B nadomješta njegov manjak. Nije poznato imaju li svi tipovi vitamina protutumorsko djelovanje, ali vitamin B6 (piridoksin) stimulira imunološki nadzor nad tumorskim stanicama što upućuje na potencijalnu terapijsku ulogu vitamina (Zitvogel i sur., 2017).

Prikaz navedenih učinaka crijevne mikrobiote omogućen je metagenomskim analizama koje upućuju na buduću ulogu mikrobiote kao ciljanog čimbenika u personaliziranoj medicini. Ipak, ovim analizama nije moguće utvrditi jeli promjena u sastavu mikrobiote uzrok ili posljedica raka te imaju li bakterijske zajednice (biofilmovi) ulogu u ovom procesu. Osim toga, postoji mali broj istraživanja koji dugotrajno promatra promjene u mikrobioti tijekom tumorogeneze i koji analiziraju uzorke mikrobiote pridružene mukozni umjesto uzoraka fecesa (Bhatt i sur., 2017).



Slika 8. Mehanizam modulacije karcinogeneze mikrobiotom. Najbitniji čimbenici kojima dolazi do disbioze su nezdravi način života, često korištenje antibiotika, zapadnjačka dijeta koja sadrži visoke količine životinjskog mesa i malo masti. Disbioza je predispozicija za razvitak određenih tipova raka. Disbioza mehanički gradi okoliš za razvitak tumora putem indukcije prijelaza epitel-mezenhim (EMT), supresije protutumorske imunosti i crijevne permeabilnosti. Na taj način povećava ulazak patogena u krvotok, upalne procese koji zauzvrat povećavaju količinu reaktivnih oblika kisika i genotoksičnih substanci koje oštećuju DNK i potiču razvitak tumora. S druge strane, zdravi način života, dijeta obogaćena vlaknima i probiotici djeluju protutumorski povećanjem razine korisne mikrobiote koja potiče pojačanje mukoznog sloja, jačanje imunosti, smanjenje upale i razine genotoksičnih tvari. Stoga mikrobiota genetski i epigenetski aktivira supresiju tumora (preuzeto i prilagođeno prema Bagheri i sur., 2022).

4.2. IMUNOTERAPIJE

Cilj imunoterapija je obnova aktivnosti citotoksičnih T stanica kako bi mogle ponovno odgovoriti i ukloniti promijenjene maligne stanice (Qiu i sur., 2021). Točan mehanizam kojim crijevna mikrobiota djeluje na imunoterapije nije jasan (Dai i sur., 2020). Zamijećeno je da imunoterapija ne djeluje na sterilne životinje niti one kojima nedostaju ključni bakterijski sojevi zaslužni za sazrijevanje imunskog sustava. Ovakav pristup potvrđuje ulogu mikrobiote kao neizostavnog čimbenika potrebnog za funkcionalni imunski sustav (Bagheri i sur., 2022).

4.2.1. *Protein programirane stanične smrti 1 (PD-1)*

Imunosne kontrolne točke reguliraju aktivnost i diferencijaciju T stanica (Buchbinder i Desai, 2016). Protein programirane stanične smrti (engl. *Programmed cell death protein 1*, PD-1) je kostimulatorna molekula koju nalazimo na T stanicama, B stanicama, NK stanicama i DC (Dai i sur., 2020, Buchbinder i Desai, 2016). Ligandi koji se vežu na receptor PD-1 su ligandi proteina programirane stanične smrti 1 i 2 (PD-L1, PD-L2), eksprimirani na imunskim stanicama (makrofagi, dendritičke stanice) te u manjoj mjeri na stanicama tkiva. U homeostatskim uvjetima PD-1 je eksprimiran tijekom kasne faze aktivacije T stanica unutar perifernih tkiva gdje inhibitornim signalom sprječava prekomjernu stimulaciju imunskog odgovora i nastanak autoimunosti (Slika 9.) (Wang i sur., 2018, Buchbinder i Desai, 2016), Dai i sur., 2020). U mikrookolištu tumora kao mehanizam izbjegavanja imunološkog odgovora koristi se ekspresija PD-L1 (Slika 7.) (Wang i sur., 2018).

Citotoksične CD8⁺ T stanice prepoznaju promijenjene antigenske determinante na površini tumorske stanice koju zatim uklanjaju indukcijom apoptoze. Tumor može izbjeći ovaj mehanizam povećanom ekspresijom PD-L1 na svojoj površini (Wang i sur., 2018). Vežanje PD-1 i PD-L1 na površini tumora dovodi do inhibicije i apoptoze tumor-specifičnih T stanica

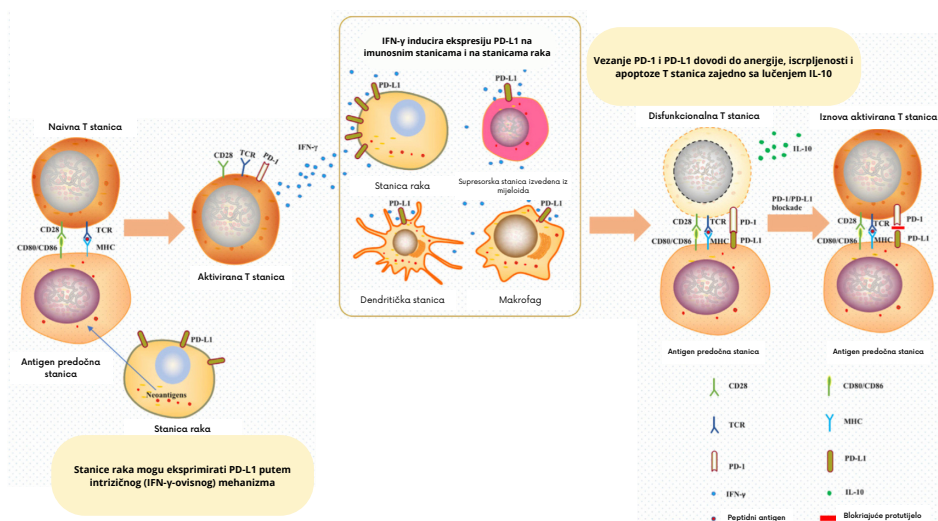
(Dai i sur., 2020). Interakcija PD-1 i PD-L1 iskorištena je za razvitak novog tipa imunoterapije koja uključuje liječenje monoklonalnim protutijelima koja blokiraju PD-1 ili PD-L1 (Slika 9.) (Wang i sur., 2018). Trenutačno postoji 5 odobrenih lijekova koja sadrže monoklonalna protutijela za inhibiciju PD-1 i PD-L1. Oni uključuju atzeolizumab, avelumab i durvalumab za PD-L1 te nivolumab i pembrolizumab za PD-1 (Wang i Xu, 2018).

Liječenje navedenim lijekovima pokazalo je obećavajuće rezultate, ali velika količina pacijenata pokazuje rezistentnost ili kratkotrajni odgovor na lijekove, čak i u slučajevima kombinacije dvaju lijekova (Dai i sur., 2020). Ostali problemi ovog tipa imunoterapija su visoka cijena proizvodnje i mogući razvitak nuspojava vezanih uz imunoterapije (engl. *Immunotherapy-related adverse events*, irAE).

Tablica 1. 10 irAE specifičnih za PD-L1/PD-1 inhibitore i 10 specifičnih irAE za CTLA-4 inhibitor *

Specifično za PD-1/PD-L1 inhibitore	Specifično za CTLA-4 inhibitore
Akutna ozljeda bubrega	Sindrom akutnog respiratornog stresa
Dermatitis	Akutna adrenalna insuficijencija
Embrio-fetalna toksičnost	Angiopatija
Hiperglikemija	Blefaritis
Hiponatremija	Cushingov sindrom
Limfopenia	Endokrina oftalmopatija
Tip 1 dijabetes mellitus	Hipogonadizam
Upala urinarnog sustava	Promjena mentalnog statusa
Svrbljivi osip	Neurosenzorna hipoakuzija
Makulopapulozni osip	Perikarditis

*preuzeto i prilagođeno prema Wang i sur., 2018



Slika 9. Uloga receptora programirane stanične smrti (PD-1) i liganda programirane stanične smrti (PD-L1) u izbjegavanju tumora i imunoterapiji raka. U mikrookolišu tumora T stanice su aktivirane nakon prepoznavanja tumorskih antigena putem antigen predočnih stanica. IFN- γ kojeg proizvode aktivirane T stanice, inducira ekspresiju PD-L1 na tumorskim i imunskim stanicama. Nakon toga interakcija PD-1 i PD-L1 između T stanica i antigen predočnih stanica dovodi do nastanka nefunkcionalnih T stanica. Korištenje protutijela za blokiranje PD-1/PD-L1 inhibira ovaj proces i omogućava nastavak efektorske uloge T stanica (preuzeto i prilagođeno prema Wang i sur., 2018).

Razvitak irAE povezuje se s korištenjem lijekova za inhibiciju imunskih kontrolnih točaka gdje biološki mehanizam kojim lijekovi uzrokuju oštećenje organa nije poznat. Štetni učinci mogu biti specifični prema tipu imunoterapije (Tablica 1.) ili općeniti zbog različitih karakteristika bolesti, genetike pacijenta, demografije i drugih čimbenika (Wang i Xu, 2018).

4.2.2. Utjecaj crijevne mikrobiote na PD-1/PD-L1 imunoterapiju

Radi pokušaja uklanjanja rezistencije u imunoterapiji kontrolnih točaka, znanstvenici su se osvrnuli na crijevnu mikrobiotu kao potencijalnog modulatora imunskog odgovora i terapijske aktivnosti (Dai i sur., 2020). Sivan i sur. (2015.) su proveli jedno od prvih istraživanja na mišjim modelima gdje su predložili mogućnost poboljšanja učinka terapije tumora (blokiranje PD-L1) moduliranjem sastava crijevne mikrobiote.

Pokus se temeljio na usporedbi rasta potkožnog melanoma u genetski identičnim miševima uzgojenima u Jackson laboratoriju (JAX) i Tackson farmi (TAC). Miševi TAC i JAX imaju različiti sastav komenzalnih mikroba. Zamijećen je agresivniji rast tumora u miševa TAC te veća akumulacija intratumorskih CD8+ citotoksičnih stanica T i jači odgovor tumor-

specifičnih stanica T u miševa JAX. Kako bi dokazali da li je mikrobiota uzrok ovakvog rasta tumora, miševi JAX i TAC su smješteni zajedno u nastambu nakon čega je zamijećeno da obje skupine poprimaju fenotip JAX. Također su zamijetili da oralni prijenos fekalne suspenzije iz miševa JAX u TAC suprimira rast tumora dok je prijenos fekalne suspenzije u suprotnom smjeru imao zanemarivi utjecaj na rast tumora. Terapeutski utjecaj crijevne mikrobiote je testiran davanjem kombinacije fekalnog materijala miševa JAX i protutijela protiv PD-L1, miševima TAC. Zamijećen je usporeni rast tumora, povećana razina tumor-specifičnih stanica T i povećani ulaz stanica T u mikrookoliš tumora. Ovi rezultati upućuju na utjecaj sastava mikrobiote u poboljšanju odgovora na imunoterapije. Analiziranje bakterijskih vrsta pokazalo je značajnu razliku u prisutnosti 257 rodova između miševa TAC i JAX.

Pronađene su vrste roda *Bifidobacterium*, od kojih su najzastupljenije *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* i *Bifidobacterium adolescentis*. Komercijalno dostupna kombinacija *B. longum* i *B. breve* dana je sama ili zajedno s PD-1 lijekom miševima TAC kako bi se testiralo imaju li ove vrste mogućnost poboljšanja zaštitne imunosti. Miševima kojima je dana kombinacija probiotika s imunoterapijom imali su poboljšanu kontrolu tumora, indukciju tumor-specifičnih T stanica u periferiji i povećanu razinu antigen-specifičnih CD8+ stanica T (Sivan i sur., 2015).

Predloženi mehanizam za inhibiciju tumora osniva se na aktivaciji DC (putem *Bifidobacterium*) koje poboljšavaju efektorsku funkciju CD8+ stanica T (Wang i sur., 2018). Prag podražaja DC je smanjen u prisutnosti *Bifidobacterium* i njihova osjetljivost na antigene se povećava (Tablica 2.). Pri manjim koncentracijama antigena DC induciraju povećanu razinu IFN- γ i CD8+ stanica T što zajedno s odgovarajućom imunoterapijom stvara sinergistički protutumorski učinak (Dai i sur., 2020). Osim toga, predloženi mehanizam smanjenja ekspresije PD-1 i PD-L1 povezuje se s velikom količinom nemetiliranih CpG otoka u bakterijskoj DNK koji su zaslužni za pojačanje aktivnosti CD8+ stanica T putem IL-12 (Wang i sur., 2018).

Istraživanja sastava mikrobiote tijekom liječenja provedena su i na ljudskim fekalnim uzorcima. U istraživanju kojeg provode Frankel i sur. (2017.) pokazano je da pacijenti koji pokazuju odgovor na liječenje nivolumabom (blokiranje PD-1) imaju stolicu obogaćenu *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides thetaiotamicron* i *Holdemania filiformis*. Učinci

Faecalibacterium i *Bacteroides* na imunoterapije prikazani su u Tablici 2. U drugim istraživanjima kod pacijenata koji odgovaraju na imunoterapiju zamijećene su povećane razine *Clostridiales* (Wang i sur., 2018).

Istraživanje koje su proveli Routy i sur. (2018.) je također bilo temeljeno na promatranju učinaka crijevne mikrobiote u terapiji blokiranja PD-1. U 140 pacijenata s različitim tipovima raka (rak pluća, bubrega i mokraćnog mjehura) u fekalnim uzorcima je pronađena povećana količina *Akkermansia muciniphila*. Mehanizam njezina utjecaja na blokiranje PD-1 nije razjašnjen, ali se osniva na povećanju CD4+ memorijskih T stanica u tumoru koje eksprimiraju kemokinske receptore povezane sa preživljavanjem u kasnijim stadijima raka (Wang i sur., 2018; Dai i sur., 2020).

Neodavno istraživanje koje su proveli Mao i sur. (2021.) temeljilo se na promatranju utjecaja crijevne mikrobiote na liječenje raka hepatobilijarnog sustava PD-1 imunoterapijom. Fekalni uzorci 65 pacijenata skupljeni su između 2018. i 2020. prije početka imunoterapije te dan prije primitka nove doze svaka tri tjedna, nakon čega su pohranjeni i analizirani. U pacijentima koji su pokazivali klinički pozitivan odgovor pronađena je veća količina *Lachnospiraceae* i *Alistipes sp.*, *Ruminococcus calidus*, *Erysipelotichaceae*. U pacijentima koji nisu pokazivali pozitivan klinički odgovor pronađene su povećane količine *Veillonellaceae*. *Lachnospiraceae* i *Erysipelotichaceae* su butirat-producirajuće bakterije koje se povezuju s pozitivnim odgovorom na PD-1 imunoterapiju kao i *Ruminococcaceae* čija se prisutnost smatra pozitivnim prognostičkim biljekom. U ovom istraživanju istaknuta su dva zapažanja. Prvo je heterogenost odgovora na dvije dominantne porodice *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. U slučaju porodice *Firmicutes* odgovor je bio pozitivan dok je porodica *Bacteroides* davala heterogene rezultate (Slika 10). Drugo, povezanost mikrobiote sa irAE. Pacijenti s teškim oblikom kolitisa imali su smanjenu raznolikost mikrobiote i obogaćenje s *Prevotellamassilia timonensis* iz porodice *Bacteroidetes*. Obogaćenje crijevne mikrobiote specifičnim vrstama može poslužiti u budućem razvitku biomarkera za predviđanje nastanka kolitisa.

Tablica 2. Regulacija crijevne mikrobiote u imunoterapiji raka*

Mikrobiota (ili produkti)	Imunosna regulacija	Utjecaj na imunoterapiju raka
<i>Bifidobacteria</i>	Promoviranje sazrijevanja DC Aktivacija limfocita Povećavanje razine proupalnih citokina i IFN- γ Inicijacija proliferacija antigen specifičnih CD8+ T stanica	Pojačava PD-1 blokadu
<i>B.fragilis</i>	Aktivacija Th1 stanica Promoviranje proliferacije Treg Promoviranje sazrijevanja DC	Pojačava CTLA-4 blokadu
<i>A. muciniphilia</i>	Povećanje CD4+ T stanica	Pojačava PD-1 blokadu
<i>Escherichia Clostridium</i>	Induciranje diferencijacije Treg i inhibicija upale	Pojačava CTLA-4 blokadu
<i>Faecalibacterium</i>	Promoviranje proliferacije CD4+ ili CD8+ T stanica Promoviranje proizvodnje Treg stanica i ekspresije kostimulatornih molekula	Pojačava PD-1 blokadu Pojačava CTLA-4 blokadu
<i>Bacteroides</i>	Povećanje Treg i imunosupresivnih stanica Uzrokovanje sistematskog upalnog procesa putem TLR	Očekivana PD-1 blokada Očekivana CTLA-4 blokada
<i>Kratkolančane masne kiseline</i>	Promoviranje diferencijacije Treg	Pojačava CTLA-4 blokadu

*preuzeto i prilagođeno prema Dai i sur., 2020.

4.2.3. Protein povezan s citotoksičnim T limfocitima 4 (CTLA-4)

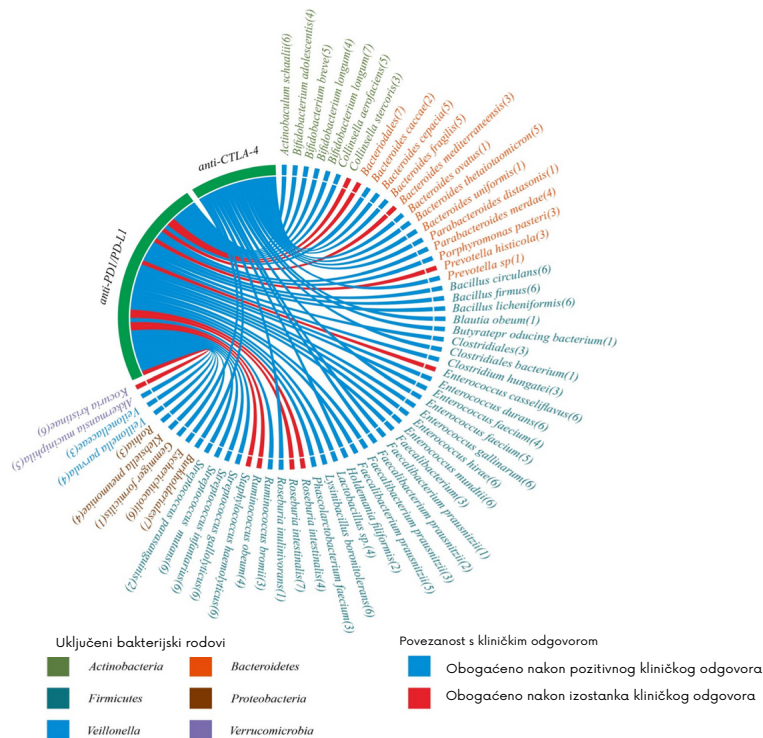
Protein povezan s citotoksičnim T limfocitima 4 (engl., *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4*, CTLA-4 ili CD152) je imunomodulatorna površinska molekula koja se nalazi na površini T stanica gdje negativno regulira njihovu aktivaciju i time čini još jednu imunosnu kontrolnu točku (Kim i Choi, 2022). Aktivacija stanica T je složeni proces koji zahtjeva više stimulacijskih signala. Vezanje T staničnog receptora (engl. *T cell receptor*, TCR) i MHC II dovodi do nastanka prvog signala koji nije dostatan za pokretanje imunosne reakcije. Vezanje kostimulatornih molekula B7.1 ili B7.2 (CD80 ili CD86) na antigen predočnim stanicama i CD28 na T stanicama dovodi do nastanka signala progresije koji potiče imunosni odgovor, proliferaciju T stanica, lučenje IL-2, povećanog metabolizma, ekspresije gena za preživljavanje i slično (Kim i Choi, 2022; Buchbinder i Desai, 2016).

CTLA-4 se poput CD28 nalazi na stanicama T i na sebe veže iste ligande CD80 i CD86, ali sa puno većim afinitetom što dovodi do kompetitivnog vezanja koje može spriječiti nastanak signala progresije CD28/B7. O vezanju ovih dvaju receptora, ovisiti će hoće li doći do aktivacije ili anergije T stanice (Slika 11.). Zanimljivo je da regulaciju ekspresije CTLA-4 na naivnim stanicama T vrši TCR. Stimulacijski signali TCR i CD28/B7 potiču egzocitozu vezikula s CTLA-4 i njihovu ekspresiju na površini stanice (Buchbinder i Desai, 2016).

CTLA-4 ima bitnu ulogu u održavanju supresivne uloge Treg stanica na kojima je konstitutivno ekspimiran. Treg stanice utječu na aktivnost efektorskih T stanica putem antigen predočnih stanica na kojima smanjuju ekspresiju liganda B7. Smanjena ekspresija liganda B7 na površini antigen predočnih stanica dovodi do nedostatka kostimulatornog signala CD28/B7 na efektorskim T stanicama (Buchbinder i Desai, 2016).

Stanice raka mogu također ekspimirati B7 ligand na svojoj površini te dovesti do inaktivacije stanica T. S obzirom na ekspresiju CTLA-4 u ranom stadiju razvoja T stanica i njegovo vezanje na ligand B7 visokim afinitetom, razvijen je tip imunoterapije koji inhibira takvu kontrolnu točku i sudjeluje u reaktivaciji protutumorskog učinka stanica T (Dai i sur., 2020).

Trenutačni odobreni lijek za inhibiciju CTLA-4 u imunoterapiji je monoklono protutijelo, ipilimumab koji se koristi za liječenje metastatskog melanom. Uz njega postoji i tremelimumab koji je u drugoj fazi testiranja za liječenje raka pluća. Ipilimumab ima identične izazove i prednosti kao lijekovi za inhibiciju PD-1/PD-L1. Iako predstavlja veliki potencijal u liječenju raka, veliki financijski trošak, rezistencija ili neosjetljivost pacijenata i razvitak irAE (Tablica 1.) jedni su od problema koji se pojavljuju korištenjem ovog lijeka (Dai i sur., 2020; Buchbinder i Desai, 2016).



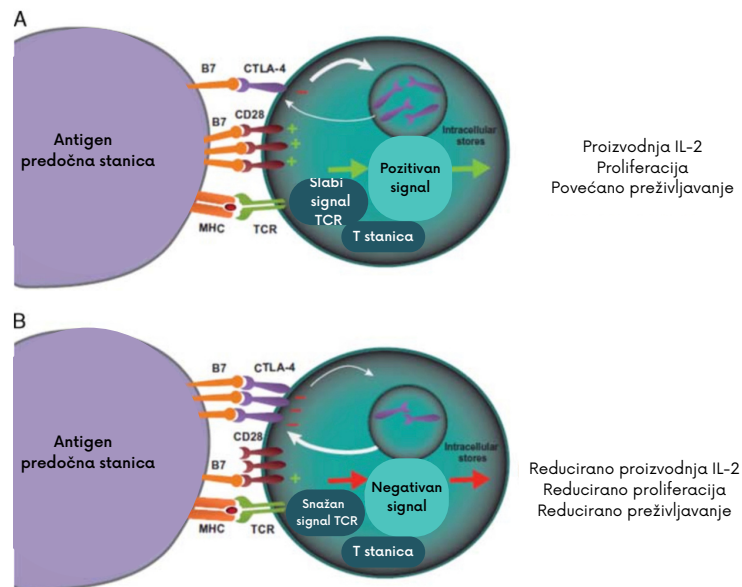
Slika 10. Razlika u obogaćenosti mikrobiote tijekom imunoterapije. *Circos* dijagram pokazuje različite utjecaje članova mikrobiote na liječenje ICB. Plava traka predstavlja članove mikrobiote čija količina je povišena tijekom liječenja, dok crvena traka predstavlja članove koji su obogaćeni tijekom neuspjelog liječenja ICB. Brojevi u zagradi predstavljaju izvor reference. (1) Chaput i sur. (2) Frankel i sur. (3) Gopalakrishnan i sur. (4) Matson i sur. (5) Routy i sur. (6) Routy i sur. (7) Temraz i sur. (preuzeto i prilagođeno prema Dai i sur., 2020).

4.2.4. Utjecaj crijevne mikrobiote na CTLA-4 imunoterapiju

Iako točan mehanizam kojim CTLA-4 protutijela uzrokuju protutumorski učinak nije jasan, podaci istraživanja upućuju na pojačanu aktivaciju i proliferaciju efektorskih T stanica te na smanjenje supresije Treg stanicama (Buchbinder i Desai, 2016).

Vétizou i sur. (2015.) provode jedno od prvih istraživanja koje pokazuje utjecaj crijevne mikrobiote na blokiranje CTLA-4. Zamijetili su da se prilikom korištenja ipilimumaba razvijaju protutijela na članove crijevne mikrobiote i da dolazi do nastanka irAE (kolitis) povezanih s poremećajima u crijevnoj mikrobioti. Njihovi rezultati su također uputili na ulogu crijevne mikrobiote kao ključnog čimbenika u odgovoru na imunoterapije. U sterilnim miševima je zamijećeno da dolazi do progresije tumora unatoč administracije CTLA-4 protutijela. U miševima koji su imali uklonjene određene patogene, zamijećena je sporija progresija tumora. Ipak, liječenje antibioticima (streptomycin, kolistin i ampilicin) uzrokovali

su nedostatak odgovora na CTLA-4 protutijela u miševima s rakom debelog crijeva i melanomom.



Slika 11. Inhibicija stanica T putem CTLA-4. Stanice T su aktivirane putem vezanja TCR i antigena predočenog putem kompleksa MHC zajedno sa CD28/B7 kostimulacijom. (A) U slučaju slabe stimulacije TCR, prevladava vezanje CD28 na B7 što uzrokuje pozitivan signal, proizvodnju IL-2, proliferaciju i povećanu stopu preživljavanja. (B) U slučaju snažnog TCR signala, povećava se ekspresija CTLA-4. CTLA-4 je u kompeticiji s CD28 za vezanje na B7. Povećano vezanje CTLA-4 na B7 uzrokuje negativan signal koji ograničava proizvodnju i proliferaciju IL-2 što ograničava preživljavanje stanica T.

Istraživanje utjecaja CTLA-4 protutijela na crijevnu mikrobiotu pokazalo je da CTLA-4 protutijelo narušava staničnu ravnotežu u crijevima povećanjem stanične smrti IEC nakon 24 sata davanja lijeka. Osim toga, analizom 16S rRNA ustanovljeno je da jedna injekcija CTLA-4 protutijela mijenja sastav mikrobiote sa smanjenom količinom *Bacteroidales* i *Burkholderiales* i povećanjem *Clostridiales*. Povećanje je zamijećeno na razini vrsta s porastom *Bacteroides thetaiotaomicron* i *Bacteroides uniformis*, dok se razina *B. fragilis* nije znatno promijenila. Zbog povećanja vrsta roda *Bacteroides*, sterilnim miševima i miševima koji su prijašnje hranjeni antibioticima, davana je kombinacija *B. thetaiotaomicron*, *B. fragilis*, *Burkholderia cepacia* ili kombinacija *Burkholderia cepacia* i *B. fragilis* gdje je zamijećena obnova odgovora na CTLA-4 imunoterapiju. Kako bi se odredila klinička važnost ovih otkrića analizirana je poveznica specifičnih *Bacteroides* vrsta s odgovorom na CTLA-4 imunoterapiju. *Bacteroides* su podijeljeni na tri skupina (A, B, C) na temelju algoritma grupiranja fekalnih bakterija. Zamijećeno je da pacijenti s melanomom koji pozitivno odgovaraju na ipilimumab pripadaju grupi C koja se sastoji od imunogenih *Bacteroides* koje obnavljaju učinkovitost

protutijela CTLA-4. Ovakvi rezultati upućuju na ulogu ipilimumaba kao modulatora sastava *Bacteroides* spp. koji zatim djeluje na njegovu protutumorsku aktivnost (Vétizou i sur., 2015).

B. fragilis se smatra jednom od imunoregulatornih članova roda *Bacteroides*. Oralno primanje *B. fragilis* inducira Th1 imunosni odgovor. Aktivacija Th1 stanica poboljšava njihov odgovor na bakterijske antigene i nove tumorske antigene. Osim toga, smanjuje toksičnost CTLA-4 imunoterapije promoviranjem proliferacije i diferencijacije Treg stanica kao i *Faecalibacterium* (Tablica 2.). Aktivacija DC u *lamina propria* potiče apsorpciju *B. fragilis* što potiče sazrijevanje DC i lučenje IL-12 koji potiče Th1 stanični odgovor (Dai i sur., 2020).

Butirat i propionat utječu na aktivaciju Treg na način da potiču njihovu diferencijaciju. *Escherichia* i *Clostridium* također mogu imati pozitivan učinak na diferencijaciju Treg i inhibiciju upalnog procesa (Tablica 2.). Treg stanice sadrže veliku količinu CTLA-4 koji odlučuju hoće li doći do inhibicije aktivnosti određenih stanica, ali s druge strane korisne su tumorskim stanicama radi izbjegavanja imunosnog odgovora. Ipak, povećana razina CTLA-4 povećava osjetljivost na blokiranje CTLA-4 i smanjuje imunosupresiju tumorskih tkiva (Dai i sur., 2020).

Radi poboljšanja odgovora na imunoterapije koriste se kombinacije lijekova za CTLA-4 i PD-1/PD-L1. Prvo globalno istraživanje provedeno je 2017. godine na 39 pacijenata s melanomom koji su primili kombinaciju ipilimumaba i nivolumaba (PD-1 inhibitor) ili samo nivolumab. Kod pacijenata koji su pozitivno odgovorili na kombinaciju imunoterapija povećana je količina *Holdemania filiformis*, *Bacteroides thetaiotaomicron* i *Faecalibacterium prausnitzii*, dok je kod nivolumab imunoterapije povećana razina *Dorea formicogenerans*. CTLA-4 imunoterapija se većinom koristi u kombinaciji s PD-1/PD-L1 imunoterapijom radi postizanja optimalnih rezultata kod pacijenata koji zbog individualnih razlika u rezistentnosti na lijekove, ne pokazuju pozitivne rezultate liječenjem monoterapijama (samo CTLA-4 ili PD-1/PD-L1). Kombinacija CTLA-4 i PD-1/PD-L1 imunoterapija pokazala se uspješnom u povećanju dugotrajnih, klinički pozitivnih rezultata (Dai i sur., 2020; Zhou i sur., 2021).

5. MODULACIJA MIKROBIOTE RADI POBOLJŠANJA ODGOVORA NA IMUNOTERAPIJE

5.1. TRANSPLANTACIJA FEKALNE MIKROBIOTE (FMT)

Transplantacija fekalne mikrobiote (engl. *Fecal microbiota transplantation*, FMT) podrazumijeva izravnu modulaciju crijevne mikrobiote i smatra se potencijalnim alatom za optimizaciju imunoterapije tumora (Dai i sur., 2020). Prijenos mikrobnih zajednica izoliranih iz fekalnih uzoraka zdravog donora u želudac, debelo i tanko crijevo primatelja odvija se putem kolonoskopije, oralnih kapsula, klistiranja i nazogastrične sonde. Kako bi razvitak FMT napredovao kao nova vrsta terapije potrebno je odrediti kako odabrati pogodne uzorke za FMT, precizno povezati primarnu rezistentnost na imunoterapije sa disbiozom i uspostaviti način određivanja kompatibilnosti donora i primatelja (Bullman i sur., 2021).

Dva nedavna klinička ispitivanja upućuju na ulogu FMT u prekidu rezistencije na imunoterapiju kontrolnih točaka. U prvom ispitivanju koje provode Baruch i sur. (2021.) između 2018. i 2019. godine FMT je korištena u kombinaciji s imunoterapijom za PD-1 (nivolumab). Deset pacijenata s melanomom i rezistencijom na PD-1 imunoterapiju zaprimili su FMT od dvaju pacijenata (donor 1 i donor 2) koja su pokazivala pozitivan odgovor na PD-1 imunoterapiju. Primatelji su liječeni antibioticima prije FMT koju su zaprimali svaka dva tjedna i naizmjenice putem kolonoskopije. Pacijenti su pokazivali pozitivan odgovor nakon FMT uzorka donora 1, za razliku od uzorka donora 2 gdje nije došlo do značajnih promjene u odgovoru na imunoterapiju. Prema metagenskoj analizi, promjena crijevne mikrobiote se dogodila u svim pacijentima, ali s naglaskom na povećanu količinu *Bifidobacterium adolescentis* tijekom primanja uzorka donora 1 i *Ruminococcus bromii* tijekom primanja uzorka donora 2. Obje vrste su povezane s pozitivnim odgovorom na imunoterapije te je daljnjim analizama u svim pacijentima utvrđena povećana ekspresija gena za prezentaciju antigena na crijevnom endotelu kao i povećana količina IFN- γ i aktivacija citotoksičnih T stanica tijekom primanja uzorka od donora 1.

Drugo ispitivanje kojeg provode Davar i sur. (2021.) između 2018. i 2020. godine obuhvaća 16 pacijenata s melanomom koji pokazuju rezistentnost na PD-1 imunoterapiju i kombinaciju PD-1 i CTLA-4 imunoterapije. Uzorci za FMT ekstrahirani su od 7 donora od kojih su 3 imala parcijalni odgovor i 4 koja su imala pozitivan odgovor na imunoterapiju. Pacijenti su zaprimili samo jednu FMT putem kolonoskopije zajedno s korištenjem

pembrolizumaba (inhibitor PD-1) svaka tri tjedna. Od 16 pacijenata, 3 pacijenata pokazuju pozitivne rezultate dok drugih 3 pacijenata pokazuju stabilnost bolesti preko 12 mjeseci. Ovakvi rezultati upućuju na ulogu FMT kao modulatora sastava crijevne mikrobiote. Promjena sastava prouzročila je obogaćenje sa *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Bifidobacteriaceae* i *Coriobacteriaceae* za koje se smatra da su putem sustavnog imunosnog odgovora prouzročile promjene u mikrokolišu tumora i omogućile uklanjanje rezistentnosti na PD-1 imunoterapiju.

Iako rezultati ovih dvaju istraživanja pokazuju obećavajući utjecaj FMT na modulaciju crijevne mikrobiote, veliki naglasak je stavljen na potrebu za novim i većim kliničkim ispitivanjima. U budućim ispitivanjima očekuje se otkrivanje bakterijskih sojeva i njihovih karakteristika koje se dosljedno mogu povezati s poboljšanim odgovorom na imunoterapije (Bullman i sur., 2021).

5.2. PROBIOTICI I PREBIOTICI

Prebiotici su supstrati koje selektivno koriste mikroorganizmi domaćina na način koji se odražava pozitivno na zdravlje domaćina. Kao prebiotici najčešće se koriste fruktan i galaktan koje mikrobiota fermentacijom prevodi u SCFA čiji je utjecaj opisan u prijašnjim poglavljima. Probiotici su selektirana skupina živih bakterija koje u odgovarajućem omjeru imaju pozitivan učinak na zdravlje domaćina (Gibson i sur., 2017, Wan i sur., 2021). Dosada nije utvrđena kombinacija bakterija koja može stvoriti protutumorski mikrokoliš (Zitvogel i sur., 2017).

Jedna od glavnih uloga crijevne mikrobiote je apsorpcija i metabolizam nutrijenata. Kod pacijenata s rakom zapaženo je da stabilnost mikrobiote povećava sposobnost borbe protiv tumora. Ipak, kod većine pacijenata dolazi do poremećaja u sastavu mikrobiote (disbioze) koja onemogućava pravilnu apsorpciju nutrijenata i njihovo energetske iskorištavanje (Dai i sur., 2020).

Lactobacillus i *Bifidobacterium* su dva najčešća roda koja se koriste prilikom izrade probiotika. Iz roda *Lactobacillus* često se koriste *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* i *L. acidophilus* radi njihove sposobnosti aktivacije DC i NK stanica, smanjenja proupalnih pomoćničkih T 17 stanica i poticanja diferencijacije tipa 1 regulatornih T stanica. *B. breve* i *B. longum* također potiču sazrijevanje DC i lučenje IL-12. Oba roda su komercijalno dostupna

u obliku mliječnih proizvoda ili kapsula. Njihovo korištenje također može poboljšati probavu nutrijenata fermentacijom neprobavljivih ugljikohidrata i nastanak SCFA. Bitno je napomenuti da uzimanje probiotika čini samo jedan od mnogih čimbenika koji oblikuju stabilnu mikrobiotu koja djeluje protutumorski (Slika 8.). Prehrana može potaknuti promjene u sastavu mikrobiote što je pokazano putem roda *Clostridium*. Dijeta obogaćena mastima potiče *Clostridium scindens* na proizvodnju sekundarnih žučnih soli dok dijeta obogaćena vlaknima ju potiče na proizvodnju butirata (Bhatt i sur., 2017; Zitvogel i sur., 2017; Wan i sur., 2021)

Lactobacillus i *Bifidobacterium* su samo neki od mnogih bakterijskih rodova koji pokazuju protutumorsko djelovanje modulacijom njegova mikrokoliša. Daljnji razvitak probiotika zahtjeva identifikaciju i izolaciju protutumorskih bakterijskih vrsta koje će omogućiti nastanak novog tipa probiotika (kompleksnih mikrobni ekosustava) ili farmakoloških čimbenika koji oponašaju njihovo djelovanje u prisutnosti tumora (Zitvogel i sur., 2017; Bullman i sur., 2021).

5.3. DIJAGNOSTIČKE SPOSOBNOSTI MIKROBIOTE

S obzirom da mikrobiota može potaknuti tumorogenezu u određenim uvjetima, njezina analiza može biti potencijalno korištena kao prognostička klinička metoda (Bagheri i sur., 2022). Istraživanje koje provode Poore i sur. (2020) ukazuje na potencijal mikrobiote kao biljega za dijagnozu raka. Analizom krvi i tkiva otkriveno je da postoji povezanost između različitih tipova raka i mikrobiote te da razvitak ovakvog dijagnostičkog pristupa može biti vrlo značajan pacijentima. Nedostatak ovakve metode je otkrivanje podrijetla pronađenih nukleinskih kiselina te mnoge tehnološke i biološke prepreke koje je potrebno riješiti prilikom razvitka ove metode (Poore i sur., 2020).

Disbioza crijevne mikrobiote također može služiti kao čimbenik za rano predviđanje nastanka tumora. Abaliza određenih bakterijskih vrsta može poslužiti kao biljeg ranog razvitka određenih karcinoma. Jedna od njih je enterotoksična *B. fragilis* koja se povezuje s nastankom kolorektalnog karcinoma. U jednom od dva objavljena nova klinička ispitivanja pronađeno je da korištenje fekalnih biomarkera može predvidjeti razvitak raka želuca s preciznošću preko 90% putem identifikacije *Desulfovibrio*, *Escherichia*, *Faecalibacterium*, i *Oscillospira* (Bagheri i sur., 2022).

H. pylori se smatra uzročnikom 70% slučajeva raka želuca, ali nije korisna kao biljeg jer samo 1-4% populacije koja ima prisutnu ovu bakteriju, razvija rak želuca. Ovo je jedan od razloga zašto se dijagnosticiranje raka putem mikrobiote ne koristi kao klinički odobrena metoda. Potrebna su nadolazeća istraživanja koja će ustanoviti može li se crijevna mikrobiota koristiti kao prognostički biomarker za razvitak malignih bolesti (Bagheri i sur., 2022).

6. ZAKLJUČAK

Crijevna mikrobiota predstavlja složen i heterogeni ekosustav koji je prisutan od rođenja. Proizvodnjom metabolita i sudjelovanjem u probavnim procesima, utječe na održavanje cjelovitosti mukoznog sloja i pridonosi održavanju homeostaze. Fiziološki utjecaj crijevne mikrobiote povezuje se s njezinom ulogom u razvitku i regulaciji imunskog sustava. Zbog imunomodulatornih svojstava, smatra se da crijevna mikrobiota ima značajan utjecaj na imunoterapiju tumora. Iako točni mehanizmi kojima crijevna mikrobiota utječe na mikrookoliš tumora nisu poznati, zamijećeno je da njezina modulacija putem FMT i probiotika predstavlja novi potencijalni pristup u poboljšanju učinkovitosti imunoterapije i prekida rezistencije na nju. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdili točni mehanizmi djelovanja crijevne mikrobiote i omogućio razvitak specifičnih terapijskih proizvoda poput imunoterapijskih probiotika.

7. LITERATURA

Ali A., Tan H. Y., Kaiko G. E. 2020. Role of the Intestinal Epithelium and Its Interaction With the Microbiota in Food Allergy. *Front. Immunol.* 11:604054.

Anderson N. M., Simon M. C. 2010. The Tumor Microenvironment. *Curr. Biol.* 30(6), 921–925.

Bäckhed F., Ley R. E., Sonnenburg J. L., Peterson D. A., Gordon J. I. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* 307(5717), 1915–1920.

Bagheri Z., Moeinzadeh L., Razmkhah M. 2022. Roles of Microbiota in Cancer: From Tumor Development to Treatment. *J. Oncol.* 2022:3845104. 1

Bhatt A. P., Redinbo M. R., Bultman S. J. 2017. The role of the microbiome in cancer development and therapy. *C.A. Cancer. J. Clin.* 67(4), 326–344.

Bullman S., Eggermont A., Johnston C. D., Zitvogel L. 2021. Harnessing the microbiome to restore immunotherapy response. *Nat. Cancer.* 2(12), 1301–1304.

Cahana I., Iraqi F. A. 2020. Impact of host genetics on gut microbiome: Take-home lessons from human and mouse studies. *Animal. Model. Exp. Med.* 3(3), 229–236.

Chen B., Chen H., Shu X., Yin Y., Li J., Qin J., Chen L., Peng K., Xu F., Gu W., Zhao H., Jiang L., Li L., Song J., Elitsur Y., Yu H. D., Jiang M., Wang X., Xiang C. 2018. Presence of Segmented Filamentous Bacteria in Human Children and Its Potential Role in the Modulation of Human Gut Immunity. *Front. Microbiol.* 9:1403.

Dai Z., Zhang J., Wu Q., Fang H., Shi C., Li Z., Lin C., Tang D., Wang D. 2020. Intestinal microbiota: A new force in cancer immunotherapy. *Cell. Commun. Signal.* 18(1), 90–116.

Eckburg P. B., Bik E. M., Bernstein C. N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S. R., Nelson K. E., Relman D. A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 308(5728), 1635–1638.

Fessler J., Matson V., Gajewski T. F. 2019. Exploring the emerging role of the microbiome in cancer immunotherapy. *J. Immunother. Cancer.* 7(1):108.

Foster J. A., McVey Neufeld K. A. 2013. Gut-brain axis: How the microbiome influences anxiety and depression. *Trends. Neurosci.* 36(5), 305–312.

Gharaibeh R. Z., Jobin C. 2019. Microbiota and cancer immunotherapy: In search of microbial signals. *Gut.* 68(3), 385–388.

Gutzeit C., Magri G., Cerutti A. 2014. Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunol. Rev.* 260(1), 76–85.

Honda K., Littman D. R. 2016. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature*. 535(7610), 75–84.

Jandhyala S. M., Talukdar R., Subramanyam C., Vuyyuru H., Sasikala, M., Reddy D. N. 2015. Role of the normal gut microbiota. *World. J. Gastroenterol.* 21(29), 8836–8847.

Kovács T., Mikó E., Ujlaki G., Sári Z., Bai P. 2020. The Microbiome as a Component of the Tumor Microenvironment. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1225, 137–153.

Louis P., Hold G. L., Flint H. J. 2014. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat. Rev. Microbiol.* 12(10), 661–672.

Noah T. K., Donahue B., Shroyer N. F. 2011. Intestinal development and differentiation. *Exp. Cell. Res.* 317(19), 2702–2710.

O'Hara A. M., Shanahan F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO. Rep.* 7(7), 688–693.

Qiu Q., Lin Y., Ma Y., Li X., Liang J., Chen Z., Liu K., Huang Y., Luo H., Huang R., Luo L. 2021. Exploring the Emerging Role of the Gut Microbiota and Tumor Microenvironment in Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* 11: 612202.

Sacksteder M. R. 1976. Brief Communication: Occurrence of Spontaneous Tumors in the Germfree F344 Rat. *J. Natl. Cancer. Inst.* 57(6), 371–1373.

Shreiner A. B., Kao J. Y., Young V. B. 2015. The gut microbiome in health and in disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 31(1), 69–75.

Skelly A .N., Sato Y., Kearney S., Honda, K. 2019. Mining the microbiota for microbial and metabolite-based immunotherapies. *Nat. Rev. Immunol.* 19(5), 305–323.

Stancu A. L. 2018. Gut Microbiome and the Response to Immunotherapy in Cancer. *Discoveries.* 6(3), e84.

Tanaka M., Nakayama J. 2017. Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergol Int.* 66(4), 515–522.

Turnbaugh P. J., Ley R. E., Hamady M., Fraser-Liggett C. M., Knight R., Gordon J. 2012. The Human Microbiome Project. *Nature.* 449(7163), 804-810.

Ursell L. K., Metcalf J. L., Parfrey L.W., Knight R. 2012. Defining the human microbiome. *Nutr. Rev.* 70(1), 38–44.

Wan X., Song M., Wang A., Zhao Y., Wei Z., Lu Y. 2021. Microbiome Crosstalk in Immunotherapy and Antiangiogenesis Therapy. *Front. Immunol.* 12:747914.

Wo J., Zhang F., Li Z., Sun C., Zhang W., Sun G. 2020. The Role of Gamma-Delta T Cells in Diseases of the Central Nervous System. *Front. Immunol.* 11:580304.

Wu H. J., Wu E. 2012. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut. Microbes.* 3(1), 4-14.

Zhou C. B., Zhou Y. L., Fang J. Y. 2021. Gut Microbiota in Cancer Immune Response and Immunotherapy. *Trends. Cancer.* 7(7), 647–660.

Zitvogel L., Daillère R., Roberti M. P., Routy B., Kroemer G. 2017. Anticancer effects of the microbiome and its products. *Nat. Ver. Microbiol.* 15(8), 465–478.

Ames N. J., Ranucci A., Moriyama B. i Wallen G. R. 2017. The Human Microbiome and Understanding the 16S rRNA Gene in Translational Nursing Science. *Nurs. Res.* 66(2), 184–197.

Rao J. N., Wang J. Y. (2010): Regulation of Gastrointestinal Mucosal Growth. Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA).

Rodríguez J. M., Murphy K., Stanton C., Ross R. P., Kober O. I., Juge N., Avershina E.,

Rudi K., Narbad A., Jenmalm M. C., Marchesi J. R., Collado M. C. 2015. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb. Ecol. Health. Dis.* 26:26050.

Siddiqui M. T., Cresci G. A. M. 2021. The Immunomodulatory Functions of Butyrate. *J. Inflamm. Res.* 14, 6025–6041.

Buchbinder E. I., Desai A. 2016. CTLA-4 and PD-1 Pathways Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am. J. Clin. Oncol.* 39(1), 98–106.

Gibson G. R., Hutkins R., Sanders M. E., Prescott S. L., Reimer R. A., Salminen S. J., Scott K., Stanton C., Swanson K. S., Cani P. D., Verbeke K., Reid G. 2017. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14(8), 491–502.

Mao J., Wang D., Long J., Yang X., Lin J., Song Y., Xie F., Xun Z., Wang Y., Wang Y., Li Y., Sun H., Xue J., Song Y., Zuo B., Zhang J., Bian J., Zhang T., Yang X., Zhang L., Sang X., Zhao H. 2021. Gut microbiome is associated with the clinical response to anti-PD-1 based immunotherapy in hepatobiliary cancers. *J. Immunother. Cancer.* 9(12): e003334.

Routy B., Le Chatelier E., Derosa L., Duong C. P. M., Alou M. T., Daillère R., Fluckiger A., Messaoudene M., Rauber C., Roberti M. P., Fidelle M., Flament C., Poirier-Colame V., Opolon P., Klein C., Iribarren K., Mondragón L., Jacquelot N., Qu B., Ferrere G., Clémenson C., Mezquita L., Masip J. R., Naltet C., Brosseau S., Kaderbhai C., Richard C., Rizvi H., Levenez F., Galleron N., Qinquis B., Pons N., Ryffel B., Minard-Colin V., Gonin P., Soria J. C., Deutsch E., Loriot Y., Ghiringhelli F., Zalcman G., Goldwasser F., Escudier B., Hellmann M. D., Eggermont A., Raoult D., Albiges L., Kroemer G., Zitvogel L. 2018. Gut microbiome influences efficacy of PD-1–based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* 359(6371), 91–97.

Sivan A., Corrales L., Hubert N., Williams J. B., Aquino-Michaels K., Earley Z. M., Benyamin F. W., Lei Y. M., Jabri B., Alegre M. L., Chang E. B., Gajewski T. F. 2015.

Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* 350(6264), 1084–1089.

Vétizou M., Pitt J. M., Daillère R., Lepage P., Waldschmitt N., Flament C., Rusakiewicz S., Routy B., Roberti M. P., Duong C. P., Poirier-Colame V., Roux A., Becharef S., Formenti S., Golden E., Cording S., Eberl G., Schlitzer A., Ginhoux F., Mani S., Yamazaki T., Jacquelot N., Enot D. P., Bérard M., Nigou J., Opolon P., Eggermont A., Woerther P. L., Chachaty E., Chaput N., Robert C., Mateus C., Kroemer G., Raoult D., Boneca I. G., Carbonnel F., Chamaillard M., Zitvogel L. 2015. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* 350(6264), 1079–1084.

Wang Q., Xu R. 2019. Immunotherapy-related adverse events (irAEs): extraction from FDA drug labels and comparative analysis. *JAMIA. Open.* 2(1), 173–178.

Wang Y., Ma R., Liu F., Lee S. A., Zhang L. 2018. Modulation of Gut Microbiota: A Novel Paradigm of Enhancing the Efficacy of Programmed Death-1 and Programmed Death Ligand-1 Blockade Therapy. *Front. Immunol.* 9:374.

Kim G. R., Choi J. M. 2022. Current Understanding of Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 (CTLA-4) Signaling in T-Cell Biology and Disease Therapy. *Mol. Cells.* 45(8), 513-521.

Frankel A. E., Coughlin L. A., Kim J., Froehlich T. W., Xie Y., Frenkel E. P., Koh A. Y. 2017. Metagenomic Shotgun Sequencing and Unbiased Metabolomic Profiling Identify Specific Human Gut Microbiota and Metabolites Associated with Immune Checkpoint Therapy Efficacy in Melanoma Patients. *Neoplasia.* 19(10), 848-855.

Poore G. D., Kopylova E., Zhu Q., Carpenter C., Fraraccio S., Wandro S., Kosciolk T., Janssen S., Metcalf J., Song S. J., Kanbar J., Miller-Montgomery S., Heaton R., McKay R., Patel S. P., Swafford A. D., Knight R. 2020. Microbiome analyses of blood and tissues suggest cancer diagnostic approach. *Nature.* 579, 567–574.

Baruch E. N., Youngster I., Ben-Betzalel G., Ortenberg R., Lahat A., Katz L., Adler K., Dick-Necula D., Raskin S., Bloch N., Rotin D., Anafi L., Avivi C., Melnichenko J.,

Steinberg-Silman Y., Mamtani R., Harati H., Asher N., Shapira-Frommer R., Brosh-Nissimov T., Eshet Y., Ben-Simon S., Ziv O., Khan M. A. W., Amit M., Ajami N. J., Barshack I., Schachter J., Wargo J. A., Koren O., Markel G., Boursi B. 2021. Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients. *Science*. 371(6529), 602-609.

Davar D., Dzutsev A. K., McCulloch J. A., Rodrigues R. R., Chauvin J. M., Morrison R. M., Deblasio R. N., Menna C., Ding Q., Pagliano O., Zidi B., Zhang S., Badger J. H., Vetizou M., Cole A. M., Fernandes M. R., Prescott S., Costa R. G. F., Balaji A. K., Morgun A., Vujkovic-Cvijin I., Wang H., Borhani A. A., Schwartz M. B., Dubner H. M., Ernst S. J., Rose A., Najjar Y. G., Belkaid Y., Kirkwood J. M., Trinchieri G., Zarour H. M. 2021. Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients. *Science*. 371(6529), 595-602.