

# Modulacija crijevne mikrobiote i učinkovitost imunoterapije u liječenju karcinoma - pregledni rad

---

Radoš, Laura

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:143379>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINA

Laura Radoš

MODULACIJA CRIJEVNE MIKROBIOTE I UČINKOVITOST IMUNOTERAPIJE U  
LIJEČENJU KARCINOMA - PREGLEDNI RAD

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINA

Laura Radoš

MODULACIJA CRIJEVNE MIKROBIOTE I UČINKOVITOST IMUNOTERAPIJE U  
LIJEČENJU KARCINOMA - PREGLEDNI RAD

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivana Mikolašević, dr. med.

Komentor rada: dr. sc. Marin Golčić, dr. med.

Diplomski rad ocjenjen je dana \_\_\_\_\_ u Kliničkom bolničkom centru Rijeka pred povjerenstvom u sastavu:

1. Doc. dr. sc. Vanja Licul, dr.med.
2. Izv. prof. dr. sc. Sanja Klobučar, dr. med.
3. Prof. dr. sc. Dražen Kovač, dr. med.

Rad sadrži 31 stranicu, 3 tablice, 43 literaturna navoda.

## **Zahvale**

*Veliko hvala profesorici Ivani Mikolašević i Marinu Golčiću na svakoj pruženoj prilici, pomoći i savjetu.*

*Svim nastavnicima i starijim kolegama koji su samnom podijelili svoje stručno znanje i životna iskustva, hvala što ste mi pružili okoliš u kojemu mogu biti bolja (buduća) liječnica, ali i bolja osoba.*

*Ovaj rad posvećujem mojim roditeljima Katarini i Josipu, bratu Ivanu i najbližim prijateljima, koji vjeruju u mene čak i kada ja sama u sebe ne vjerujem.*

## Popis skraćenica i akronima

AB – antibiotik

AE – eng. *antibiotic exposure*

CD8<sup>+</sup> - eng. *cluster of differentiation 8 positive*

CR – eng. *complete response*

CTLA-4 – eng. *cytotoxic-T-lymphocyte-associated protein*

DDD – eng. *defined daily dose*

DOT – eng. *antibiotic days of therapy*

ER – eng. *early responders*

FMT – eng. *fecal microbial transplantation*

HSD – eng. *high salt diet*

HZZO – Hrvatski zavod za zdravstveno osiguranje

IgG – imunoglobulin G

LGG – *Lactisaeibacillus rhamnosus*

LR – eng. *late responders*

LSD – eng. *low salt diet*

ND – eng. *normal diet*

NK stanica – eng. *natural killer cell*

NR – eng. *nonresponders*

NSCLC – eng. *non-small-cell lung cancer*

OR – eng. *objective response*

OS – eng. *overall survival*

PD – eng. *progression of disease*

PD-1 – eng. *programmed cell death 1*

PD-L1 – eng. *programmed cell death ligand 1*

PFS – eng. *progression-free survival*

PR – eng. *partial response*

R – eng. *responders*

RCC – eng. *renal cell carcinoma*

SCFA – eng. *short-chain fatty acids*

SD – eng. *stable disease*

Th1 – eng. *human T-helper type 1*

## Sadržaj

1. Uvod.....	8
2. Svrha rada .....	8
3. Pregled literature na zadanu temu.....	9
3.1. Sastav crijevne mikrobiote.....	9
3.2. Imunoterapijsko liječenje.....	9
3.3. Modulacija mikrobiote antibioticima i djelotvornost imunoterapije .....	10
3.4. Modulacija mikrobiote probioticima i prehrambenim navikama i djelotvornost imunoterapije .....	13
3.5. Fekalna transplantacija i djelotvornost imunoterapije .....	17
4. Rasprava.....	22
5. Zaključci .....	24
6. Sažetak .....	25
7. Summary .....	26
8. Literatura.....	27
9. Životopis .....	31



## 1. Uvod

Ljudska crijevna mikrobiota sastoji se od bakterija, gljivica, protozoa, arheja i virusa.(1) Mikrobiota ostaje u homeostazi pomoću pozitivnih i negativnih povratnih sprega, a može se modulirati antibioticima, probioticima, raznim načinima prehrane te fekalnom transplantacijom.(2) Funkcije crijevne mikrobiote dijelimo na strukturalne, metaboličke, neurološke i zaštitne.(1)

Povezanost imunološkog sustava i malignih bolesti ustanovljena je 1863., kada je Rupert Virchow prvi predložio ideju povezanosti upale i raka. Nakon toga, u razvoju imunoterapije postignuti su mnogi pomaci, a jedan od važnijih učinjen je ranih 1990-tih, kada su imunoglobulini *cytotoxic-T-lymphocyte-associated protein* (CTLA-4) i *programmed cell death 1* (PD-1) dokazani kao inhibitori aktivacije T limfocita koji su postali ključne mete moderne imunoterapije.(3) Imunoterapija je značajno povećala preživljenje pacijenata s uznapredovalim karcinomima, poput metastatskog melanoma, čije je 5-godišnje preživljenje 2009. bilo oko 10% (4), dok je danas moguće postići 5-godišnje preživljenje od 52% (5). Unatoč velikim pomacima koje je imunoterapija donijela modernom liječenju karcinoma, većina pacijenata će ipak progredirati na imunoterapiji te je potrebno naći način na koji bi se pojačala djelotvornost iste.(6) Jedna od mogućnosti postizanja boljeg odgovora na imunoterapiju je i kroz modulaciju crijevnog mikrobioma te je fokus ovog rada evaluacija imunološke funkcije mikrobiote i njen odnos na liječenje imunoterapijom u pacijenata sa uznapredovalim karcinomima.

## 2. Svrha rada

Svrha ovoga rada je usporediti aktualna istraživanja vezana uz modulaciju mikrobiote i analizirati utjecaj pojedinih načina modulacije mikrobiote na djelotvornost imunoterapije u pacijenata s karcinomom.

### 3. Pregled literature na zadanu temu

#### 3.1. Sastav crijevne mikrobiote

Sastav crijevne mikrobiote svake osobe drži se u relativnoj homeostazi, ali promjenjiv je ovisno o faktorima poput prehrane, okoliša, životnog stila, bolesti i lijekova, pogotovo antibiotika.(1) Moderna istraživanja učinka crijevne mikrobiote na imunoterapiju započinj 2015. kada je primijećeno da miševi sa sterilnim crijevima imaju lošiji klinički odgovor na liječenje karcinoma imunoterapijom od miševa s raznolikošću crijevnog mikrobioma. (7) Više kasnijih istraživanja pokazalo je heterogene rezultate vezane uz točan sastav mikrobiote koji promiče djelotvornost imunoterapije, a rezultati se tek djelomično preklapaju. Većina studija ipak ističe koljeno *Ruminococceae* (8, 9, 10, 11, 12) i ostale bakterije reda *Clostridales* (9, 10, 13) kao više reprezentirane u grupama koje su postigle klinički odgovor na imunoterapiju (eng. *responders* - R). Nekoliko studija povezala je R grupu i posebno s koljenom *Faecalibacterium* (9, 12, 13) te bakterijom *Akkermansia muciniphila* (10, 14, 15, 16, 17). Nekoliko njih složilo se i da je u grupama pacijenata koji nisu postigli klinički odgovor (eng. *nonresponders* – NR) više reprezentiran red *Bacteroidales* (8, 9, 11, 12). Jedan od načina kako mikrobiota može djelovati na učinak imunoterapije je i kroz lučenje metabolita inozina, triptofana, metabolita žučnih kiselina te kratkolančanih masnih kiselina, koji utječu na genetsku i epigenetsku regulaciju, tumorske signalne puteve, popravljanje DNA te na metabolizam stanica imunološkog sustava.(18) Neki metaboliti djeluju protumorski, neki antitumorski, a nečije je djelovanje ovisno o okolišu u kojem se isti nađe unutar tijela.(2, 18) Križnom reakcijom između mikrobiote crijeva i stanica imunološkog sustava pojačavaju se posredne funkcije urođenih imunoloških stanica, jača se antitumorsko djelovanje adaptivnih imunoloških stanica i podiže se imunogenost tumorskih stanica. Ovako crijevna mikrobiota može reprogramirati tumorski mikrookoliš i pojačati odgovor na imunoterapiju.(19)

#### 3.2. Imunoterapijsko liječenje

Imunoterapijski lijekovi odobreni od strane Hrvatskog zavoda za zdravstveno osiguranje (HZZO) su: pembrolizumab, nivolumab, cemiplimab, atezolizumab, durvalumab, avelumab i ipilimumab.(6) Karcinomi koje se liječi imunoterapijski su: uznapredovali melanom, nesitnostanični karcinom pluća, metastatski kolorektalni karcinom, uznapredovali karcinom bubrega, pleuralni mezoteliom, karcinom urotela te hepatocelularni karcinom, iako se sukladno istraživanjima očekuje da će se ta lista proširivati.(6, 20) Imunoterapiju mogu

pratiti i brojne nuspojave, koje se gradiraju u one niskog gradusa (gradus 1 i 2) te visokog gradusa (gradus 3 i 4). Nuspojave mogu biti dermatološke, gastrointestinalne, endokrine, plućne, reumatološke, neurološke, okularne, renalne, srčane i hematološke, no može biti zahvaćen bilo koji organ u tijelu.(20) Nuspojave gradusa 3 ili više češće su u liječenju s anti-CTLA-4 imunoterapijom te iznose 31%, dok u liječenju s anti-PD-1 iznose 10%.(21)

### **3.3. Modulacija mikrobiote antibioticima i djelotvornost imunoterapije**

Antibiotici (AB) utječu na crijevnu mikrobiotu na način da uzrokuju disbiozu, to jest mijenjaju kompoziciju mikrobiote smanjujući raznolikost i bogatstvo sastava, opadanje količine nekih vrsta, a povećanje količine drugih, ovisno o samom AB i širini njegovoga spektra djelovanja.(22) AB s jakim i širokim djelovanjem obično uzrokuju najdugotrajnije učinke na sastav crijevne mikrobiote (21)

Derosa i sur. proučili su utjecaj uzimanja AB 30 i 60 dana prije početka imunoterapije na 239 pacijenata sa nesitnostaničnim karcinomom pluća (eng. *non-small-cell lung cancer* - NSCLC) i 121 pacijenata s karcinomom bubrega (eng. *renal cell carcinoma* - RCC). U 48 NSCLC i 16 RCC pacijenata koji su primili AB unutar 30 dana prije početka imunoterapije, najčešći AB bili su beta laktami. U RCC pacijenata koji su primali AB pokazala se veća šansa za primarnu progresiju bolesti (eng. *progression of disease* – PD) te kraće preživljenje bez progresije (eng. *progression-free survival* – PFS) i ukupno preživljenje (eng. *overall survival* – OS) naspram pacijenata koji nisu primali AB. U NSCLC pacijenata koji su primali AB, šansa za primarnu PD nije bila značajno veća, ali su PFS i OS bili kraći naspram pacijenata koji nisu primali AB. U 68 NSCLC i 22 RCC pacijenta koji su primali AB unutar 60 dana prije imunoterapije rezultati za RCC bili su slični, a rezultati za NSCLC razlikovali su se po tome da PFS u AB grupi nije bio smanjen.(23)

Jung Geum i sur. također su proučavali utjecaj AB 30 dana prije početka, ali i tijekom liječenja imunoterapijom u pacijenata s NSCLC. U studiju je uključeno 140 pacijenata, od kojih je 70 primalo AB. Pacijenti koji su primali AB pokazali su značajno kraći OS, ali ne i PFS. Posebno je proučen širokospektralni piperacilin/tazobaktam, koji je pokazao i kraći OS i kraći PFS u usporedbi s pacijentima koji nisu primali AB. Ova studija također je i kvantificirala uzimanje AB kroz dvije mjere; suma dana uzimanja AB (eng. *antibiotic days of therapy* - DOT) i definirane dnevne doze AB (eng. *defined daily dose* - DDD). Veći DOT korelirao je s manjim OS u svih AB, ali i PFS u uzimanju piperacilin/tazobaktam duljem od 2 tjedna, a veći DDD piperacilina/tazobaktama i glikopeptida je korelirao i s većim mortalitetom. Ova studija

ukazala je ne samo na negativan utjecaj AB na preživljenje pacijenta s imunoterapijom, već i na kraće preživljenje kod uzimanja širokospektralnih AB i kumulativne doze AB.(24)

Slične rezultate pokazali su Elkrief i sur. na 74 pacijenta s uznapredovalim melanomom, od kojih je njih 10 uzimalo AB 30 dana prije početka liječenja imunoterapijom, Najčešće korišteni AB bili su beta laktami. Pacijenti koji su primili AB imali su značajno kraći PFS, a nijedan nije imao objektivni odgovor (eng. *objective response* – OR) na terapiju, dok je 34 % pacijenata koji nisu primali AB imalo OR. Iako je postoji disbalans između skupine koja je primala AB i one koja nije primala AB, ova studija ukazala je da primanje AB prije početka imunoterapijskog liječenja može utjecati na djelotvornost toga liječenja.(25)

Mohiuddin i sur. također su proučavali pacijente s melanomom koji se liječe imunoterapijom, ali na velikom uzorku od 568 pacijenata s uznapredovalim melanomom, od kojih je njih 114 primalo AB unutar 90 dana prije početka imunoterapijskog liječenja, a stadij III i IV analizirani su zasebno. Najčešće korišteni AB bili su cefalosporini, a nakon njih penicilini i florokinoloni. Pacijenti u oba stadija koji su primali AB imali su značajno kraći OS od onih koji nisu primali AB, a slični rezultati pokazali su se i pri proučavanju onih u skupini koji su primali AB unutar 45 dana prije početka imunoterapije. Ova je studija jedina proučila i utjecaj AB na pojavu kolitisa koji zahtijeva intravenozne steroide kao nuspojave imunoterapije i ona je bila češća u korisnika AB.(26)

Routy i sur. proučili su utjecaj AB terapije na primarnu rezistenciju na anti-PD-1 na miševima. Prvo su miševi sa sarkomom ili melanomom bili liječeni imunoterapijom i podijeljeni u dvije skupine. Jedna je skupina dobivala širokospektralne AB, a druga nije primala AB te se zaključilo da je preživljenje i antitumorsko djelovanje imunoterapije bilo značajno smanjeno u skupini sa AB. Zato je proučeno 249 pacijenata s NSCLC, RCC i karcinomom urotela, od kojih je ukupno 69 primalo AB unutar 60 dana prije ili 30 dana poslije prve primjene imunoterapije. U pacijenata sve tri vrste tumora koji su primali AB značajno se smanjio PFS i OS te je potvrđena hipoteza da AB smanjuju djelotvornost imunoterapije.(17)

Studija Iglesias-Santamaria proučila je utjecaj ukupne izloženosti AB na djelotvornost imunoterapije u skupini od 102 pacijenta s uznapredovalim karcinomom. Pacijenti su bili podijeljeni na one koji su primali AB 4 tjedna prije ili poslije početka imunoterapije (33 pacijenta) te na one koji su primali AB u tijeku imunoterapije (60 pacijenata). Izračunavanjem mjere izloženosti AB (eng. *antibiotic exposure* – AE) objektivizirana je količina uzimanja AB jer je AE omjer koliko je dana pacijent primao AB naspram koliko je dana bio liječen imunoterapijom. Najčešće uzimani AB bili su beta laktami, a nakon njih florokinoloni, cefalosporini te makrolidi. Pacijenti koji su primali AB 4 tjedna prije početka imunoterapije i

4 tjedna nakon početka imunoterapije nisu se značajno razlikovali u PFS i OS, a isti manjak razlike pokazao se i u usporedbi pacijenata koji su primali AB tijekom imunoterapije naspram onih koji nisu primali AB. Razlika u PFS i OS je bila značajna samo u usporedbi pacijenata koji su imali AE veći od medijana (koji je iznosio 11,1%) naspram onih koji su imali AE u medijanu ili ispod njega, pokazujući negativan utjecaj velikog AE. Upravo zato ova je studija zaključila da je duljina liječenja s AB bitnija od vremenskog okvira početka liječenja AB naspram početka imuterapije, no rezultati nisu pratili vrste AB. (27)

Pinato i sur. na 196 pacijenata s melanomom ili NSCLC ili drugom vrstom uznapređovalog karcinoma proučili su utjecaj AB unutar 30 dana prije početka liječenja imunoterapijom i tijekom imunoterapije na preživljenje. Najčešće propisani bili su beta laktami u trajanju do 7 dana. OS u pacijenata koji su primali AB prije početka imunoterapije bio je znantno manji naspram onih koji nisu primali AB, a šansa za loš odgovor na liječenje imunoterapijom bila je gotovo duplo veća naspram onih koji nisu primali AB. Pacijenti koji su primali AB u tijeku liječenja imunoterapijom nisu imali značajnije razlike u OS i odgovoru na terapiju od pacijenata koji nisu primali AB. S time je ova studija zaključila negativan efekt uzimanja AB unutar 30 dana prije početka liječenja na djelotvornost imunoterapije.(28)

Tinsley i sur. proučili su utjecaj uzimanja AB 2 tjedna prije i 6 tjedana poslije početka liječenja imunoterapijom u 291 pacijenata s melanomom, NSCLC ili RCC, od čega je ukupno 92 pacijenta primilo AB u tom vremenskom periodu. Pokazao se značajno manji PFS i OS u pacijenata koji su primali AB dulje od 7 dana naspram onih koji nisu ili koji su primili samo jednu dozu AB u sve tri vrste tumora. (29)

**Tablica 1.** Pregled studija vezana uz korištenje AB i imunoterapije

Studija	Vrsta karcinoma	Pacijenti bez AB	Pacijenti sa AB	Vremenski period uzimanja AB (u danima)	Medijan PFS (u mjesecima)		Medijan OS (u mjesecima)		Napomena
					Bez AB	Sa AB	Bez AB	Sa AB	
Derosa	RCC	105	16	-30	7.4	1.9	30.6	17.3	/
	NSCLC	191	48		3.8	1.9	24.6	7.9	
Jung Geum	NSCLC	70	70	-30 i tijekom cjelokupnog liječenja	/	/	/	/	Negativna asocijacija širokospektralnih AB na PFS i OS
Elkrief	Melanom	64	10	- 30	7.3	2.4	18.3	10.7	Razlika u OS nije statistički značajna
Mohiuddin	Melanom	454	114	-90	/	/	/	/	OS značajno skraćen u AB grupi
Routy	NSCLC, RCC, urotelni	180	69	Od -60 do +30	4.1	3.5	11.5	20.6	/
Iglesias-Santamaria	Melanom, NSCLC, RCC, urotelni, drugi	60	42	Od -28 do +28 ili tijekom cjelokupnog liječenja	5.8	4.4	13.3	13.8	Razlike nisu statistički značajne, ali oni s višim AE imali su kraći PFS i OS naspram medijana AE
Pinato	Melanom, NSCLC, drugi	167	29	-30	/	/	26	2	Gledalo se i korištenje AB u tijeku imunoterapije, ali nije pokazalo relevantnu razliku u PFS i OS
Tinsley	Melanom, NSCLC, RCC	199	92	Od -14 do +42	6.3	3.1	21.7	10.4	AB dulje od 7 dana medijan OS 6.3

\* znak „-“ = dani prije početka uzimanja imunoterapije, znak „+“ = dani nakon prve doze uzimanja imunoterapije, znak „/“ = informacija nije navedena ili ne vrijedi

### 3.4. Modulacija mikrobiote probioticima i prehranbenim navikama i djelotvornost imunoterapije

Uporabi probiotika za modulaciju mikrobiote korijenje seže još iz drevne Kine.(30) Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije, probiotici su proizvodi koji se sastoje od živih mikroorganizama koji kada se daju u odgovarajućim količinama daju zdravstvene dobrobiti domaćinu.(31) Prvi dostupni probiotici, krajem 1990-ih, sastojali su se većinski od *Saccharomyces* ili *Lactobacillus* sojeva, koji su smatrani korisnima u prevenciji infektivne dijareje ili infekcije bakterijom *Clostridium difficile* nakon korištenja AB. Nakon toga

razvijene su mnoge različite vrste probiotika koje su međusobno vrlo varijabilne, a u sebi sastoje  $10^8$  do  $10^{10}$  organizama, što smanjuje mogućnost međusobne usporedbe proizvoda, ali i adekvatnog proučavanja djelotvornosti pojedinačne vrste probiotika.(30) Trenutna istraživanja pokazuju da određeni probiotici i prebiotici pomažu u prevenciji i liječenju pojedinih bolesti, no i da je potrebno provesti više istraživanja o istima i klinički validirati više probiotika i prebiotika, obzirom na veličinu tržišta i širinu sastava pojedinih proizvoda.(32) Prehrambena vlakna su važni izvori energije za mikrobiotu crijeva, pozitivno su povezana uz dostupnost mikronutrijenata, formiranje stolice i mikrobna specifičnost. Prehrama obogaćena vlaknima pokazala se kao važan faktor u prevenciji i liječenju mnogih gastrointestinalnih poremećaja.(33)

Tomita i sur. proučili su retrospektivno na 118 pacijenata s NSCLC utjecaj probiotika *Clostridium butyricum*, od kojih je njih 39 uzimalo taj probiotik 6 mjeseci prije početka imunoterapijskog liječenja ili tijekom istog. 46 pacijenata također je uzimalo i AB, od toga je 22 pacijenata uzimalo i AB i probiotik *Clostridium butyricum*. Pacijenti koji su primali probiotik uz AB imali su značajno bolji PFS i OS naspram pacijenata koji su primali samo AB. U pacijenata koji nisu primali AB, oni koji su primali probiotik imali su bolji OS, ali ne i PFS od onih koji nisu uzimali probiotik. Ova studija pokazala je kako probiotik *Clostridium butyricum* ima značajnu ulogu u preživljenju pacijenata koji su primili AB, a manje značajnu ulogu u preživljenju pacijenata koji nisu primili AB.(34)

Dizman i sur. također su ispitali utjecaj *Clostridium butyricum* u prospektivnoj studiji od 29 pacijenata s RCC koji primaju kombinaciju nivolumab-ipilimumab. 19 pacijenata primalo je probiotik. PFS u pacijenata koji primaju probiotik bio je značajno duži naspram onih koji ne primaju probiotik, a OS nije proučen jer je zadnja analiza učinjena 12 tjedana nakon prve terapije. U analizi mikrobiote pacijenata R grupe nađena je značajno povećana količina *Bifidobacterium spp.*, ali to se nije uspjelo povezati s uzimanjem probiotika, vjerojatno jer se radilo o maloj skupini pacijenata. (35)

Gao i sur. proučili su utjecaj specifičnog probiotika na djelotvornost imunoterapije, ali ne na pacijentima, već na miševima. Probiotik koji je korišten je *Lactisaeibacillus rhamnosus* (LGG). Grupe miševa podijeljene su na one koji nisu primili liječenje, one koji su primili profilaktični probiotik uz anti-PD-1, one koji su bili liječeni probiotikom uz anti-PD-1 te one koji su liječeni samo s anti-PD-1. Pokazalo se da su obje skupine koje su primale probiotik imale bolje preživljenje i manju veličinu tumora od kontrolne skupine. Miševi koji su primali probiotike imali su i više vrsta bakterija koje su povezane sa kratkolančanim masnim

kiselinama (eng. *short-chain fatty acids* – SCFA), koje su povezane uz pozitivni antitumorski odgovor (18), od onih koji nisu primali probiotike. Ovo je istraživanje pokazalo da miševi koji su bili liječeni s anti-PD-1 uz probiotik LGG imaju bolji antitumorski odgovor naspram miševa koji nisu primali probiotik.(36)

Takada i sur. fokusirali su se na 294 pacijenata s NSCLC koji su primali monoterapiju anti-PD-1, od čega je 32 pacijenta ujedno uzimala i probiotik. Probiotici su pripadali *Bifidobacterium*, *Clostridium butyricum* i bakterije mliječne kiseline otporne na AB. Studija je pokazala da oni pacijenti koji su primali probiotike imaju dulji PFS od pacijenata koji nisu primali probiotike, ali značajne razlike u OS nema. Važno je naglasiti disbalans broja pacijenata sa i bez probiotika, što je moglo utjecati na rezultate.(37)

Za razliku od studija koje su pokazale pozitivno djelovanje probiotika na imunoterapiju, Spencer i sur. imali su suprotne rezultate. Fokusiralo se na pacijente koji primaju imunoterapiju te su ispitane njihove prehrambene navike i uzimanje probiotika. Od 158 pacijenata na imunoterapiji, njih je 49 uzelo probiotike te se nije pokazala značajna razlika u odgovoru na terapiju niti u sastavu mikrobiote. Također je ispitana prehrana vlaknima, koja je korelirala s unošenjem voća, povrća, mahunarki i cjelovitih žitarica, a od 128 ispitanih pacijenata, njih je samo 37 primalo dovoljno vlakana (20g na dan). Dovoljan unos vlakana uz neuzimanje probiotika pokazalo se kao najbolja kombinacija, obzirom da su ti pacijenti imali najdulji PFS. Nakon ovih rezultata, miševima s melanomom je učinjen FMT od CR pacijenta te je jedna grupa primala ili probiotik *Bifidobacterium longum* ili probiotik LGG. Miševi koji su primali probiotik imali su značajno manju količinu CD8<sup>+</sup> stanica u tumoru. Kako bi se potvrdila uloga prehrambenih vlakana, normalno uzgajanim miševima s melanomom liječenima imunoterapijom se davala prehrana bogata vlaknima i slaba vlaknima. Oni koji su uzimali puno vlakana pokazali su usporen tumorski rast. Takve razlike nije bilo u miševa sa sterilnim crijevima (eng. *germ free mice*) što je dokaz da utjecaj prehrane vlaknima ovisi o mikrobioti. Zaključeno je da je imunoterapija najbolje djelovala u skupini koja ima visok unos vlakana u prehrani, a ne uzima probiotike.(38)

Lam i sur. usporedili su na miševima utjecaj dijetе visokog unosa vlakana i zapadnjačke dijetе u djelotvornosti imunoterapije. Miševi hranjeni dijetom visokog udijela vlakana pokazali su manju progresiju tumora i veću aktivaciju intratumorskih dendritičkih stanica naspram miševa hranjenima zapadnjačkom dijetom (dijeta s velikim unosom masti i šećera). Zaključeno je da dijeta s visokim unosom vlakana obogaćuje bakteriju *Akkermansia muciphila* koja potiče aktivaciju NK stanica i dendritičkih stanica.(15)



Abbas Rizvi i sur. usporedili su utjecaj dijete raznolikog unosa soli na miševima s melanomom koji se liječe imunoterapijom. Jedna grupa miševa primala je manju količinu soli (eng. *low salt diet* - LSD), jedna je primala normalnu količinu soli (eng. *normal diet* - ND), a jedna visoku količinu soli (eng. *high salt diet* - HSD). HSD grupa pokazala je veću aktivnost *natural killer* (NK) stanica i interferona gama (IFN $\gamma$ ), koji su važni za intratumorski imunosni odgovor (9) te je imala značajno manju progresiju tumora i značajno veće preživljenje od LSD i ND grupe. Primijećena je veća količina serumske hipopurinske kiseline koja bi mogla biti korisna u anti-PD-1 djelotvornosti, a analizom mikrobiote primijećena je veća količina *Bifidobacterium spp.* Učinjena je FMT od HSD grupe na novu grupu miševa te je ta grupa pokazala 42% regresiju tumora naspram onih koji su primili FMT od NT grupe miševa. Zaključeno je da je HSD kontrirala hiponatrijemiji koja je česta u onkoloških pacijenata i obogatila *Bifidobacterium* koja bi mogla utjecati na bolji tumorski imunitet.(40)

Simpson i sur. su uspoređivali su prehrabene navike pacijenata s metastatskim melanomom liječenima s imunoterapijom iz tri različite države. U studiju je ušlo 103 pacijenta iz Nizozemske i Australije te 115 pacijenata iz SAD-a. Klinički odgovori pokazali su se boljima u pacijenata s crijevnom mikrobiotom u kojoj dominiraju *Ruminococcaceae* naspram onih u kojima dominira *Bacteroidaceae*. *Ruminococcaceae* su povezane s većom raznolikošću mikrobioma, većim unosom vlakana i nižim bazičnim C-reaktivnim proteinom (CRP), a *Bacteroidaceae* s manjom raznolikošću mikrobioma, manjim unosom vlakana i višim bazičnim CRP. Pacijenti iz Australije i SAD-a, gdje vlada zapadnjačka dijeta imali su većinski sastave mikrobiote gdje dominira *Bacteroidaceae*, dok su Nizozemci, gdje vlada dijeta visoke količine vlakana, imali većinski sastave mikrobiote gdje dominira *Ruminococcaceae*. Ovime se pokazalo koliko dijeta velik utjecaj ima na sastave mikrobiote, a time i djelotvornost imunoterapije prilikom liječenja karcinoma.(11)

Golčić i sur. su, za razliku od ostalih studija koje su prehrabene navike uspoređivale na temelju R i NR, uspoređivali utjecaj prehrane na 15 pacijenata koji su imali kompletni odgovor (eng. *complete response* – CR) na imunoterapiju kako bi proučili postoje li razlike između onih 10 pacijenata s ranim odgovorom (eng. *early responders* – ER) i pet pacijenata s kasnim odgovorom (eng. *late responders* – LR) na imunoterapiju. Svi pacijenti imali su uznapredovali melanom i liječeni su imunoterapijom te postigli CR. U ER grupu ušli su pacijenti koji su ostvarili CR unutar 9 mjeseci od početka imunoterapije. Svi su pacijenti imali dovoljan unos prehrabnenih vlakana i povišeni unos soli, a LR grupa pokazala je unošenje više flavona i manje proteina i slatkiša naspram ER grupe. U LR grupi postojala je veća međusobna raznolikost sastava mikrobiote članova grupe naspram ER grupe. Najzastupljenije bakterije u

ER grupi bile su *Barnesiella intestihominis* i *Bacteroidetes finegldii* te *Sutterella wadsworthensis*. Kod LR grupe bile su više zastupljene *Coprococcus comes* i *Bifidobacterium pseudocatenulatum* uz manju zastupljenost *Prevotellaceae*. Ova studija jedina se fokusirala na razlike unutar grupe pacijenata koji su imali kompletni odgovor na imunoterapiju i dokazala da R nisu homogena grupa. (41)

**Tablica 2.** Pregled studija vezanih uz različite prehrambene navike i imunoterapiju

Studija	Vrsta karcinoma	Vrsta prehrambene modulacije	Pacijenti bez modulacije	Pacijenti s modulacijom	Medijan PFS (u usporedbi s drugom grupom)		Medijan OS (u usporedbi s drugom grupom)		Napomena
					Bez modulacije	S modulacijom	Bez modulacije	S modulacijom	
Tomita	NSCLC	Probiotik <i>Clostrydium butiricum</i>	79	39	↓	↑	↓	/	Medijan s OS nije dosegnut
Dizman	RCC	Probiotik <i>Clostrydium butiricum</i>	10	19	↓	↑	/	/	Medijan PFS/OS nije dosegnut
Takada	NSCLC	Probiotici	32	262	↓	↑	=	=	Razlika u OS nije dostigla značajnost
Spencer	Melanom	Probiotici	109	49	↑	↓	/	/	Medijan PFS/OS nije dosegnut
		Dovoljan unos vlakana	37	91	↓	↑	/	/	
		Probiotici + dovoljan unos vlakana	22	101	↑	↓	/	/	

\* OS i PFS nisu izraženi u apsolutnim brojkama zato što je velika razlika u načinu izražavanja rezultata studija, a u mnogima medijan OS ne postoji jer je većina pacijenata bila živa prilikom zadnjeg uzimanja informacija

\* znak „/“ = informacija nije navedena ili ne vrijedi, znak „=“ = nema značajne razlike

\* u tablicu su stavljene samo studije na ljudima bez Simpson i Golčić zbog drugačijeg opisa rezultata

### 3.5. Fekalna transplantacija i djelotvornost imunoterapije

FMT je proces kojim se prenosi fekalni materijal iz donora u primatelja, a može se odraditi preko nazogastrične sonde, nazojejunalne sonde, endoskopijom, kolonoskopijom, klistirom ili u obliku oralne kapsule. FMT se koristi za liječenje rekurentnih infekcija bakterijom *Clostridium difficile*, a u ispitivanju je i kao opcija liječenja ulcerativnog kolitisa, sindroma iritabilnog crijeva i drugih gastrointestinalnih oboljenja. FMT sa sobom donosi i rizike, kao što je neželjeno unošenje patogena.(2)

Prvi pokušaji FMT povezani s učinkovitošću imunoterapijskog liječenja napravljeni su u 2015. godine na miševima. Sivan i sur. primijetili su različit rast melanoma genetski jednakih miševa iz dvije različite ustanove. Podijelili su miševе iz dviju ustanova na grupe imena JAX i TAC. TAC grupa je pokazala agresivniji rast melanoma naspram JAX grupe, a pretpostavljeno je da je uzrok vanjski faktor. Miševi TAC smješteni su u isti okoliš kao JAX grupa te je primijećeno da melanom u ovome slučaju raste sličnom brzinom. Uz pretpostavku da je sastav mikrobiote uzrok razlike između rasta melanoma u dvije grupe, TAC grupi učinjen FMT iz JAX grupe, rezultirajući sporijim rastom tumora u miševa primatelja i infiltracijom antigen specifičnih T stanica u tumor. Analizom mikrobiote otkriveno je da je *Bifidobacterium spp.* poveznica s antitumorskim odgovorom, specifično jedan takson najbliži *B. breve*, *B. longum* i *B. adolescentis*.(16)

Routy i sur. proučili su korelaciju sastava mikrobiote u 60 pacijenata s NSCLC i 40 pacijenata s RCC. U obje skupine *Akkermansia muciniphila* pokazala je korelaciju s pozitivnim kliničkim odgovorom, a u NSCLC R pacijenata nađene su više količine *Ruminococcus spp.*, *Alistipes spp.* i *Eubacterium spp.*, sa manjom količinom *Bifidobacterium adolescentis*, *B. longum* i *Parabacteroides distasonis*. Učinili su FMT iz pacijenata koji su imali R odgovor i onih koji su imali NR odgovor na miševе. Miševi primatelji od R grupe imali su manji rast tumora i bolji odgovor na imunoterapiju, a sličan rezultat postigli su i miševi koji su primili samo *A. muciniphila*.(17)

Gopalakrishnan i sur. proučili su sastav mikrobiote pacijenata s melanomom te učinili FMT R grupe i NR grupe na miševе. U sastavu mikrobiote grupe R nađeno je više *Ruminococcaceae* obitelji, od čega je *Faecalibacterium* korelirao sa značajno duljim PFS, a u grupi NR nađeno je više *Bacteroidales*. Miševi koji su primili FMT R grupe pokazali su više *Faecalibacterium* i veću infiltraciju CD8<sup>+</sup> stanica u tumor te manje supresivnih mijeloidnih stanica naspram miševa koji su primili FMT od NR donora.(8)

Nakon što se FMT pokazala sigurnom i uspješnom na miševima, prvu studiju FMT i imunoterapije na ljudima proveli su Baruch i sur. 2020. godine na 10 pacijenata s anti-PD-1 refrakternim metastatskim melanomom, ispitujući sigurnost i djelotvornost FMT u liječenju metastatskog melanoma s anti-PD-1. Za davanje uzorka odabrana su dva donora, oboje pacijenti koji su liječenjem metastatskog melanoma s anti-PD-1 postigli objektivni klinički odgovor dulji od godinu dana. Primatelji su 72h prije FMT primili otprije poznat pre-FMT protokol, oralnu kombinaciju širokospektralnih AB vankomicina i neomicina. Pet pacijenata primilo je FMT od prvog donora, a pet pacijenata primilo je FMT od drugog donora. FMT je inicijalno dan kolonoskopski i u obliku oralnih kapsula, a nakon toga svakih 14 dana oralna

kapsula uz anti-PD-1 ciklus. R su bili pacijenti koji su postigli OR, što je u ovome istraživanju bio smanjenje tumorske mase za barem 30%, a ono se pokazalo kod tri pacijenta, od čega su dva pacijenta imali parcijalni odgovor (eng. *partial response* - PR), a jedan pacijent imao je CR na terapiju. Svi su pacijenti imali PFS dulji od 6 mjeseci, a radi se o primateljima prvoga donora. NR su bili svih pet primatelja drugog donora te dva primatelja prvog donora. Jedan NR pacijent je isključen iz istraživanja zbog krvarenja u metastatsku leziju mozga, koje je bilo nepovezano s FMT. Primatelji prvog donora imali su veću relativnu količinu *Bifidobacterium adolescentis*, a primatelji drugog donora imali su veću relativnu količinu *Ruminococcus bromii*. Sastav mikrobiote R i NR unutar grupe prvog donora nije se značajno razlikovao niti funkcionalno niti metabolički. Svih pet primatelja pokazalo je infiltraciju crijeva s antigen prezentirajućim stanicama, a intratumorski je pokazalo pojačanu regulaciju gena za signalne puteve IFN $\gamma$ , aktivaciju T stanica, aktivaciju dendritičkih stanica te odgovor *T-helper type* (Th1) stanica, dok se isto nije pokazalo u skupini drugog donora. Od imunoterapijski vezanih nuspojava, nekoliko pacijenata imalo je nuspojave gradusa 1, a nuspojave viših gradusa nisu prijavljene. Od FMT nuspojava, samo je jedan pacijent imao blagu nadutost (gradus 1). Iako se pokazala značajna i neobjašnjena razlika između odgovora na FMT prvog i drugog donora, studija se nije fokusirala na razloge zašto postoje te razlike, već je uspjela dokazati da je FMT sigurna metoda uz anti-PD-1 liječenje.(42)

Drugi po redu koji se bavili FMT na ljudima je bili su Davar i sur. u 2021. Na 16 pacijenata s anti-PD-1 refrakternim melanomom istražila je utjecaj FMT od donora koji su imali OR na anti-PD-1 terapiju. Za formaciju uzorka koristila se stolica sedam donora. Donori su bili četiri pacijenta s melanomom koji su postigli CR i tri pacijenta koji su postigli PR. Jedan od 16 primatelja nakon FMT isključen je iz istraživanja jer mu je bolest progredirala nepovezano za FMT. Od 15 preostalih primatelja, grupi NR pripalo je devet pacijenata, a R je pripalo šest pacijenata. Kriteriji za pripadnost grupi R bili su OR ili stabilnost bolesti (eng. *stable disease* – SD) dulji od 12 mjeseci. Od 6 R pacijenata, OR imalo je tri pacijenta, a tri pacijenta postigli su SD dulje od 12 mjeseci. Jedan od R pacijenata doživio je incident nevezan uz studiju te preminuo. Sastav mikrobiote u svih primatelja promijenio se nakon FMT. U skupini NR polovica primatelja su imala sastav mikrobiote sličan donorima, dok je druga polovica imala sastav koji se značajno razlikovao od njihovih donora. S druge strane, sastavi mikrobiote u cijeloj R grupi ravnomjerno se promijenili u onu sličnu donoru. Humoralni odgovor vezan uz FMT pokazao je značajno višu razinu IgG specifičnu za bakterije u R grupi naspram NR grupe. U grupi R značajno se povećala količina Firmicutes (*Lachnospiraceae* i *Ruminococceaceae*) i Actinobacteria (*Bifidobacteriaceae* i *Corinobacteriaceae*), a smanjila

količina *Bacteroidetes*. Sistemske i intratumorske u grupi R nađene su više količine aktiviranih i diferenciranih CD8<sup>+</sup> T stanica, a smanjene količine cirkulirajućih IL-8. Promjene u cirkulirajućim citokinima i kemokinima primijećene su kod R i NR, ali značajnije u R. Jedan je pacijent zbog upale mekih tkiva morao primiti oralne AB, što je uzrokovalo progresiju bolesti, ali je godinu dana kasnije primio FMT istoga donora te je to rezultiralo s SD. Od nuspojava primijećene su većinski one gradusa 1, dok su dva pacijenta prijavila osjećaj zamorenosti, a jedan je pacijent imao perifernu motornu neuropatiju koja je zbrinuta bolnički (gradus 3). Iz ove studije može se zaključiti da FMT može pozitivno utjecati na sposobnost antitumorskog odgovora u pacijenata koji imaju imunološku sposobnost odgovoriti na anti-PD-1 terapiju, ali nemaju idealni sastav mikrobiote koji bi pritom pomogao.(12)

Najnoviju studiju o FMT i djelotvornosti imunoterapije na ljudima objavili su Routy i sur. u 2023., koja je na 20 pacijenata s uznapredovalim melanomom ispitala sigurnost FMT zajedno s anti-PD-1 u pacijenata koji dosad nisu bili liječeni imunoterapijom, za razliku od Baruch i Davar čije su studije učinjene na pacijentima koji su prije liječeni s anti-PD-1, ali su pokazali rezistenciju na liječenje. Donori su bili troje zdravih muškaraca. 17 pacijenata imalo je nuspojave vezane uz imunoterapiju, a od toga njih pet nuspojave gradusa 3 (artritis, izmorenost i pneumonitis). OR se pokazao na 13 pacijenata (grupa R), od toga je četiri pacijenta postiglo CR, a devet pacijenata je postiglo PR. Unutar NR grupe dvoje je pokazalo SD dulje od 6 mjeseci, jedan SD kraće od 6 mjeseci, a četiri pacijenta PD. Implantacija je bila uspješna kod svih primatelja, no kompozicija mikrobiote se nakon 1 mjesec vraćala na onu sličnu prije FMT u grupi NR, dok se u grupi R i nakon 6 mjeseci nije vraćala početnoj kompoziciji, već se razvijala u sve sličniju donorskoj. R grupa pokazala je povišenu količinu *Eubacterium ramuleus*, *Eubacterium siraeum* i *Ruminococcus callidus*, a smanjenu količinu *Enterocloster boltae* naspram NR grupe. R grupa pokazala je i promjene u metabolitima plazme u vidu povećanja histidina, a smanjenja laktične i sukcinilske kiseline. Od intratumorskih promjena, u većini R pacijenata pokazala se veća infiltracija CD8<sup>+</sup> T stanica, no tri R pacijenata imalo je jednu od najmanjih infiltracija tim stanicama. Značajna razlika je bila u aktivaciji tih CD8<sup>+</sup> stanica, koja je bila veća u R grupi. U NR grupi intratumorski je nađena veća količina mijelosupresivnih stanica naspram R grupe. Studija je dokazala da je FMT u pacijenata s uznapredovalim melanomom koji prije nisu liječeni anti-PD-1 sigurna te da je FMT uz anti-PD-1 potencijalno dobra kombinacija terapije kao primarna opcija u liječenju uznapredovalog melanoma. Rezultati studije testirani su i na miševima sa sarkomom i melanomom, kojima je učinjena FMT ili od donora, tri R pacijenta ili jednog NR pacijenta. Miševi koji su primili donaciju od donora te donaciju od R skupljenu 3 mjeseca nakon FMT su svi pokazali uspješnost

anti-PD-1, dok su neuspješnost pokazali miševi koji su primili donaciju od NR skupljenu nakon 1 i 3 mjeseca te od R nakon jednog mjeseca. Ovo je dokazalo da je sastav mikrobiote zdravih donora te sastav mikrobiote koji se u R razvio nakon 3 mjeseca pogodan za djelotvornost anti-PD-1.(43)

**Tablica 3.** Pregled studija vezane uz FMT i imunoterapiju

Studija	Broj donora	Broj primatelja	Količina FMT	Pre-FMT tretman	Klinički odgovor				FMT nuspojave		Nuspojave imunoterapije	
					CR	PR	SD	PD	Gr. 1-2	Gr. 3-4	Gr. 1-2	Gr. 3
Baruch	2	10	1 kolonoskopski + 7 oralne kapsule	Vankomicin + neomicin	1	2	0	7	1	0	nekoliko	0
Davar	7	15	1 kolonskopski	/	1	2	3	9	/	/	15	3
Routy	3	20	1 oralne kapsule	Polietilenglikolni laksativ	4	9	1	5	8	0	12	5

\*znak „/“ = informacija nije navedena ili ne vrijedi

\*u tablicu su stavljene samo studije na ljudima

## 4. Rasprava

Iako imunoterapija predstavlja veliki pomak u liječenju pacijenata s karcinomom, djelotvornost iste potrebno je povećati, a mogući način je modulacijom crijevne mikrobiote. Crijevna mikrobiota može utjecati na djelotvornost imunoterapije kroz lučenje metabolita te pojačavanjem urođenog i adaptivnog imunološkog odgovora na tumorske stanice. Više je načina na koji je moguće modulirati sastav crijevne mikrobiote. Sve su studije koje su proučavale utjecaj AB na djelotvornost imunoterapije bile retrospektivne. Dok su Derosa, Elkrief, Mohiuddin, Routy i Pinato proučavali vrijeme davanja i pritom se usredotočili na određeni vremenski period prije i/ili poslije davanja prvog ciklusa imunoterapije, Jung Geum, Iglesias-Santamaria i Tinsley pokušali su kvantificirati doze AB, kroz DOT i DDD, AE i diferenciranje duljine davanja AB dulje ili kraće od 7 dana. Sve studije zaključile su da AB negativno utječu na djelotvornost imunoterapije, ali pokazuju suprotne stavove. Derosa, Elkrief, Mohiuddin, Routy, i Tinsley zaključili su da je uzimanje AB prije početka imunoterapije negativno utjecalo na djelotvornost imunoterapije, dok Jung Geum, Mohiuddin, Tinsley i Iglesias-Santamaria zaključuju da je veća količinska izloženost AB puno značajnija od vremenske točke početka uzimanja AB. Proučeni vremenski raspon uzimanja AB rangira od 3 mjeseca prije prvog ciklusa imunoterapije pa do cijelog tijeka uzimanja imunoterapije. Karcinomi koji su proučeni bili su melanom, karcinom bubrega, nesitnostanični karcinom pluća i manja količina ostalih karcinoma. AB koji su bili proučeni također se razlikuju u širini spektra i duljini uzimanja. Najnegativniji utjecaj na djelotvornost imunoterapije pokazali su širokospektralni AB poput piperacilin/tazobaktam i glikopeptida. Rezultati ovih studija ukazuju da AB u tijeku i/ili prije imunoterapije negativno utječu na djelotvornost imunoterapije, ali nije moguće odrediti koji točno AB i u kojoj mjeri su štetni. Zasad je jasno da ukupna količina AB i širok spektar AB imaju negativniji utjecaj zbog toga što uzrokuju jaču disbiozu u crijevima.

Puno je manje istraživanja koja su se bavila utjecajem probiotika i prehrane na djelotvornost imunoterapije. Kao što je već spomenuto, postoje velike razlike u vrstama probiotika koje su dostupne na tržištu, a teško je i točno znati koji pacijenti su se kako hranili, obzirom da su gotovo sve studije na ljudima retrospektivne i ovise o upitnicima koje su pacijenti ispunjavali, za razliku od studija vezanih uz AB, koje su informacije o istima dobivali iz službene medicinske dokumentacije. Tomita i Dizman zaključili su da je da je probiotik *Clostridium butyricum* koristan u ljudskih pacijenata koji se liječe imunoterapijom. Takada je zaključio da određeni probiotici imaju pozitivan utjecaj na PFS, ali ne i OS u ljudi, ali se

rezultati moraju čitati s oprezom obzirom na disbalans dviju ispitanih grupa. Gao na modelima miševa zaključuje da je LGG koristan u djelotvornosti imunoterapije, no Spencerovi rezultati se nisu podudarali s time. Njihovo ispitivanje na miševima koji su primali ili *Bifidobacterium longum* ili LGG pokazalo negativan utjecaj tog probiotika na intratumorski imunosni odgovor, a dio studije na ljudima također je pokazao da uzimanje komercijalnih probiotika negativno korelira s odgovorom na imunoterapiju, a kao najbolja kombinacija pokazala se prehrana s visokim udjelom vlakana bez uzimanja probiotika. Prehrana s visokim udjelom prehrambenih vlakana korelirala je pozitivno s djelotvornosti imunoterapije i kod Lam i Simpson, ali i Golčić, s time da Golčić nije imao kontrolnu skupinu, ali primarni cilj nije bio pronaći razlike R i NR već razlike unutar heterogene skupine samo R pacijenata. Abbas Rizvi jedina je studija koja se fokusirala na unos soli i potvrdila da HSD u miševa korelira s boljim odgovorom na imunoterapiju, a Golčić et al. su u svojoj grupi samo R pacijenata definirali da su svi unosili veliku količinu soli kroz prehranu. Na temelju ovih studija može se zaključiti da prehrana s visokim udjelom vlakana modulira mikrobiotu na način da doprinosi boljoj djelotvornosti imunoterapije, a prehrana s visokim udjelom soli bi također mogla utjecati pozitivno. Obzirom na međusobnu raznolikost komercijalno dostupnih probiotika te rezultata navedenih studija, sigurnija opcija bila bi ne uzimati probiotik u tijeku imunoterapije, s time da bi oni mogli imati pozitivan utjecaj nakon uzimanja AB jer popravljaju disbiozu koju AB uzrokuju. Čini se da se *Clostridium butyricum* pokazao kao jedini probiotik za kojega se stručnjaci slažu da uistinu može imati pozitivan utjecaj na djelotvornost imunoterapije u pacijenata s karcinomom, iako su potrebna randomizirana prospektivna istraživanja da isto potvrde.

Postoje samo tri studije na ljudima koje su proučavale FMT uz imunoterapiju i imale su istu limitaciju, a to je malen uzorak pacijenata. Sva tri istraživanja pokazala da je FMT siguran uz imunoterapiju, što je svakoj i bio primaran cilj. Sigurnost FMT uz imunoterapiju dokazana je time što od ukupno 45 pacijenata samo je 7 imalo nuspojave gradusa 3, a nuspojava većega gradusa nije bilo. Specifične FMT-vezane nuspojave nisu navedene kod Davar, a u ostalim studijama bilo je 9 nuspojave niskoga gradusa. Ukupno je 23 od 45 pacijenata pokazalo objektivni klinički odgovor, od čega pet CR, 13 PR i četiri SD. Važno je napomenuti da je Routy gledao SD > 6 mjeseci, a Davar SD > 12 mjeseci te da je uvidom u rezultate Davar na vremenskoj točki 6 mjeseci nakon FMT zapravo bilo pet pacijenata, a ne tri, no dva su pacijenta ubrzo nakon doživjeli PD, pa su zato i uračunati u PD grupu pacijenata. Nije korištena usporedba R i NR zato što je Baruch SD pacijente svrstao u grupu R, dok su ostale dvije studije SD pacijente svrstale u NR. Razlike su se također našle i u postupku FMT te pripremi prije



FMT. Baruchovi pacijenti su primili kolonoskopske FMT na 0. dan davanja anti-PD-1, a na 1. dan i svakih 14 dana nakon toga pacijenti su primali oralne kapsule, uz cikluse anti-PD-1. Davar i Routy su se pak odlučili na jednokratnu FMT, prvi kolonoskopski, a drugi u obliku oralnih kapsula. Dok Davarovi pacijenti nisu imali posebnu pripremu za FMT, Baruchovi pacijenti su primali širokospektralne oralne AB 72h prije, a Routy pacijenti su dan prije FMT i tjedan dana prije prve anti-PD-1 koristili laksative. Ovi rezultati ukazuju da je FMT realna adjuvantna opcija uz imunoterapiju u pacijenata s uznapredovalim melanomom, ali su potrebne nove studije koje bi ocijenile idealnu pripremu za FMT i način davanja FMT te točne indikacije, kako bi se maksimizirali benefiti ovog načina liječenja.

## **5. Zaključci**

Unatoč velikoj uspješnosti imunoterapije, koja je postala prekretnica u liječenju pojedinih karcinoma, čak i u uznapredovalom stadiju, potrebno je pronaći načine kako pojačati djelotvornost imunoterapije, a jedan od mogućih načina je modulacija crijevne mikrobiote. Korištenje AB uz liječenje karcinoma imunoterapijom nije preporučljivo zato što može negativno utjecati na djelotvornost terapije uzrokujući disbiozu u crijevima. Postoje oprečna mišljenja o sigurnosti probiotika tijekom imunoterapijskog liječenja te je potrebno provesti još studija na više vrsta probiotika. Prehrana bogata vlaknima pozitivno utječe na djelotvornost imunoterapije. FMT je sigurna adjuvantna opcija za liječenje imunoterapijom, ali je potrebno još kliničkih dokaza i standardizacija procesa.

## 6. Sažetak

Crijevna mikrobiota važan je dio ljudskoga tijela čiji sastav može utjecati na djelotvornost imunoterapije. U zadnjih nekoliko godina, modulacija crijevne mikrobiote u cilju poboljšanja djelotvornosti imunoterapije postala je aktualna tema u znanstvenoj zajednici, ali postoji nedostatak istraživanja iz ovoga područja. U ovom diplomskom radu cilj je bio analizirati aktualnu literaturu vezanu uz modulaciju crijevne mikrobiote i djelotvornost imunoterapije u liječenju karcinoma. Analizirani su zasebno utjecaji AB, probiotika i prehrane te fekalne transplantacije. Iz osam aktualnih studija koje su proučile utjecaj AB na djelotvornost imunoterapije da se zaključiti da upotreba AB, pogotovo širokoga spektra i/ili u većoj količini, uzrokuje disbiozu crijevne mikrobiote zbog čega se djelotvornost imunoterapije može smanjiti. Pomoću pet aktualnih studija o probioticima i imunoterapiji, može se uvidjeti da bi disbiozu mogli popraviti probiotici i tako utjecati na poboljšanje imunoterapije, no upotreba komercijalnih probiotika bez dokaza disbioze u crijevima nije još dovoljno ispitana kako bi joj se potvrdila sigurnost za pacijente s karcinomom koji se liječe imunoterapijom. Prehrana koja se sastoji od dovoljne količine vlakana preporučljiva je od strane četiri aktualne studije o utjecaju prehrane s višom količinom vlakana i djelotvornosti imunoterapije. Prema dvije studije, dijeta s višim udjelom soli pozitivno korelira sa uspješnosti imunoterapije. Fekalna transplantacija je prema trima jedinim ljudskim studijama sigurna i realna adjuvantna opcija za liječenje pacijenata s karcinomom uz imunoterapiju, ali je potrebno standardizirati protokole liječenja i uspostaviti još kliničkih dokaza o uspješnosti ovakve vrste liječenja. Modulacijom sastava mikrobiote uistinu se može promijeniti djelotvornost imunoterapije, ali u budućnosti treba organizirati više studija na ljudima koje bi precizno odredile točne vrste i postupke modulacije mikrobiote i istražile ih detaljnije.

## 7. Summary

The intestinal microbiota is an important part of the human body and its composition can affect the effectiveness of immunotherapy. In the last few years, the modulation of intestinal microbiota in order to improve the effectiveness of immunotherapy has become a current topic in the scientific community, but there is a lack of research in this area. In this thesis, the goal was to analyze the current literature related to the modulation of intestinal microbiota and the effectiveness of immunotherapy in the treatment of cancer. The effects of antibiotics, probiotics, diet and faecal microbial transplantation were analyzed separately. From eight current studies that studied the influence of antibiotics on the effectiveness of immunotherapy, it was concluded that the use of antibiotics, especially broad-spectrum and/or use of antibiotics in larger quantities, causes dysbiosis of the intestinal microbiota, which can reduce the effectiveness of immunotherapy. Using five current studies on probiotics and immunotherapy, it can be seen that dysbiosis could be repaired by probiotics and thus affect the improvement of immunotherapy, but the use of commercial probiotics without evidence of intestinal dysbiosis has not yet been sufficiently tested to confirm its safety for cancer patients who are treated with immunotherapy. A diet consisting of a sufficient amount of fiber is recommended by four current studies on the impact of a diet with a higher amount of fiber and the effectiveness of immunotherapy. According to two studies, a diet with a higher salt content positively correlates with the success of immunotherapy. According to the only three human studies, fecal transplantation is a safe and realistic adjuvant option for the treatment of cancer patients with immunotherapy, but it is necessary to standardize treatment protocols and establish more clinical evidence of the success of this type of treatment. Modulating the composition of the microbiota can indeed change the effectiveness of immunotherapy, but in the future, more human studies should be organized to precisely determine the exact types and procedures of microbiota modulation and investigate them in more detail.

## 8. Literatura

1. Adak A, Khan MR. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell Mol Life Sci.* 2019;16(3):473-493.
2. Soto Chervin C, Gajewski TF. Microbiome-based interventions: therapeutic strategies in cancer immunotherapy. *Immunooncol Technol.* 2020; 8:12-20.
3. Galon J, Bruni D. Tumor Immunology and Tumor Evolution: Intertwined Histories. *Immunity.* 2020;52(1):55-81.
4. Garbe C, Eigentler TK, Keilholz U, Hauschild A, Kirkwood JM. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist.* 2011;16(1):5-24.
5. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P et al. Long-Term Outcomes With Nivolumab Plus Ipilimumab or Nivolumab Alone Versus Ipilimumab in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol.* 2022;40(2):127-137.
6. Tan S, Li D, Zhu X. Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomed Pharmacother.* 2020;124:109821.
7. Viaud S, Daillère R, Boneca IG, Lepage P, Langella P et al. Gut microbiome and anticancer immune response: really hot Sh\*t! *Cell Death Differ.* 2015;22(2):199-214.
8. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science.* 2018;359(6371):97-103.
9. Lee KA, Thomas AM, Bolte LA, Björk JR, de Ruijter LK et al. Cross-cohort gut microbiome associations with immune checkpoint inhibitor response in advanced melanoma. *Nat Med.* 2022;28(3):535-544.
10. Botticelli A, Vernocchi P, Marini F, Quagliariello A, Cerbelli B et al. Gut metabolomics profiling of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients under immunotherapy treatment. *J Transl Med.* 2020;18(1):49.
11. Simpson RC, Shanahan ER, Batten M, Reijers ILM, Read M et al. Diet-driven microbial ecology underpins associations between cancer immunotherapy outcomes and the gut microbiome. *Nat Med.* 2022;28(11):2344-2352.
12. Davar D, Dzutsev AK, McCulloch JA, Rodrigues RR, Chauvin JM et al. Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients. *Science.* 2021;371(6529):595-602.

13. Wang H, Rong X, Zhao G, Zhou Y, Xiao Y et al. The microbial metabolite trimethylamine N-oxide promotes antitumor immunity in triple-negative breast cancer. *Cell Metab.* 2022;34(4):581-594.
14. Nomura M, Nagatomo R, Doi K, Shimizu J, Baba K et al. Association of Short-Chain Fatty Acids in the Gut Microbiome With Clinical Response to Treatment With Nivolumab or Pembrolizumab in Patients With Solid Cancer Tumors. *JAMA Netw Open.* 2020;3(4):e202895.
15. Lam KC, Araya RE, Huang A, Chen Q, Di Modica M et al. Microbiota triggers STING-type I IFN-dependent monocyte reprogramming of the tumor microenvironment. *Cell.* 2021;184(21):5338-5356.e21.
16. Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K et al. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science.* 2015;350(6264):1084-9.
17. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science.* 2018;359(6371):91-97.
18. Wang J, Zhu N, Su X, Gao Y, Yang R. Gut-Microbiota-Derived Metabolites Maintain Gut and Systemic Immune Homeostasis. *Cells.* 2023;12(5):793.
19. Lu Y, Yuan X, Wang M, He Z, Li H et al. Gut microbiota influence immunotherapy responses: mechanisms and therapeutic strategies. *J Hematol Oncol.* 2022;15(1):47.
20. Naimi A, Mohammed RN, Raji A, Chupradit S, Yumashev AV et al. Tumor immunotherapies by immune checkpoint inhibitors (ICIs); the pros and cons. *Cell Commun Signal.* 2022;20(1):44.
21. Khoja L, Day D, Wei-Wu Chen T, Siu LL, Hansen AR. Tumour- and class-specific patterns of immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitors: a systematic review. *Ann Oncol.* 2017;28(10):2377-2385.
22. Patangia DV, Anthony Ryan C, Dempsey E, Paul Ross R, Stanton C. Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. *Microbiologyopen.* 2022;11(1):e1260.
23. Derosa L, Hellmann MD, Spaziano M, Halpenny D, Fidelle M et al. Negative association of antibiotics on clinical activity of immune checkpoint inhibitors in patients with advanced renal cell and non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2018;29(6):1437-1444.

24. Geum MJ, Kim C, Kang JE, Choi JH, Kim JS et al. Broad-Spectrum Antibiotic Regimen Affects Survival in Patients Receiving Nivolumab for Non-Small Cell Lung Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(5):445.
25. Elkrief A, El Raichani L, Richard C, Messaoudene M, Belkaid W et al. Antibiotics are associated with decreased progression-free survival of advanced melanoma patients treated with immune checkpoint inhibitors. *Oncoimmunology*. 2019;8(4):e1568812.
26. Mohiuddin JJ, Chu B, Facciabene A, Poirier K, Wang X et al. Association of Antibiotic Exposure With Survival and Toxicity in Patients With Melanoma Receiving Immunotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2021;113(2):162-170.
27. Iglesias-Santamaría A. Impact of antibiotic use and other concomitant medications on the efficacy of immune checkpoint inhibitors in patients with advanced cancer. *Clin Transl Oncol*. 2020;22(9):1481-1490.
28. Pinato DJ, Howlett S, Ottaviani D, Urus H, Patel A et al. Association of Prior Antibiotic Treatment With Survival and Response to Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Patients With Cancer. *JAMA Oncol*. 2019;5(12):1774-1778.
29. Tinsley N, Zhou C, Tan G, Rack S, Lorigan P et al. Cumulative Antibiotic Use Significantly Decreases Efficacy of Checkpoint Inhibitors in Patients with Advanced Cancer. *Oncologist*. 2020;25(1):55-63.
30. Wieërs G, Belkhir L, Enaud R, Leclercq S, Philippart de Foy JM et al. How Probiotics Affect the Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;9:454.
31. Quigley EMM. Prebiotics and Probiotics in Digestive Health. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(2):333-344.
32. Yadav MK, Kumari I, Singh B, Sharma KK, Tiwari SK. Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2022;106(2):505-521.
33. Gill SK, Rossi M, Bajka B, Whelan K. Dietary fibre in gastrointestinal health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021;18(2):101-116.
34. Tomita Y, Ikeda T, Sakata S, Saruwatari K, Sato R et al Association of Probiotic *Clostridium butyricum* Therapy with Survival and Response to Immune Checkpoint Blockade in Patients with Lung Cancer. *Cancer Immunol Res*. 2020;8(10):1236-1242.
35. Dizman N, Meza L, Bergerot P, Alcantara M, Dorff T et al. Nivolumab plus ipilimumab with or without live bacterial supplementation in metastatic renal cell carcinoma: a randomized phase 1 trial. *Nat Med*. 2022;28(4):704-712.

36. Gao G, Shen S, Zhang T, Zhang J, Huang S et al. Lacticaseibacillus rhamnosus Probio-M9 enhanced the antitumor response to anti-PD-1 therapy by modulating intestinal metabolites. *EBioMedicine*. 2023;91:104533.
37. Takada K, Shimokawa M, Takamori S, Shimamatsu S, Hirai F et al. Clinical impact of probiotics on the efficacy of anti-PD-1 monotherapy in patients with nonsmall cell lung cancer: A multicenter retrospective survival analysis study with inverse probability of treatment weighting. *Int J Cancer*. 2021;149(2):473-482.
38. Spencer CN, McQuade JL, Gopalakrishnan V, McCulloch JA, Vetizou M et al. Dietary fiber and probiotics influence the gut microbiome and melanoma immunotherapy response. *Science*. 2021;374(6575):1632-1640.
39. Barbosa AM, Gomes-Gonçalves A, Castro AG, Torrado E. Immune System Efficiency in Cancer and the Microbiota Influence. *Pathobiology*. 2021;88(2):170-186.
40. Rizvi ZA, Dalal R, Sadhu S, Kumar Y, Kumar S et al. High-salt diet mediates interplay between NK cells and gut microbiota to induce potent tumor immunity. *Sci Adv*. 2021;7(37):eabg5016.
41. Golčić M, Simetić L, Herceg D, Blažičević K, Kenđel Jovanović G et al. Analysis of the Gut Microbiome and Dietary Habits in Metastatic Melanoma Patients with a Complete and Sustained Response to Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2023;15(11):3052.
42. Baruch EN, Youngster I, Ben-Betzalel G, Ortenberg R, Lahat A et al. Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients. *Science*. 2021 5;371(6529):602-609.
43. Routy B, Lenehan JG, Miller WH Jr, Jamal R, Messaoudene M et al. Fecal microbiota transplantation plus anti-PD-1 immunotherapy in advanced melanoma: a phase I trial. *Nat Med*. 2023;29(8):2121-2132.

## 9. Životopis

Laura Radoš rođena je 13.1.2000. u Rijeci. Nakon pohađanja prirodoslovno-matematičkog smjera Gimnazije Andrije Mohorovičića upisuje studij medicine u rodnom gradu. Tijekom studija odrađuje posao demonstratora na Zavodu za anatomiju i Zavodu za histologiju i embriologiju na Medicinskom fakultetu u Rijeci, a volontira za neprofitne udruge FOSS i CroMSIC te predstavlja studente u Fakultetskom vijeću i u Studentskom zboru Fakulteta. U udruzi CroMSIC vodi Odbor za ljudska prava i mir, nakon čega obnaša dužnosti voditeljice podružnice Rijeka, a potom i glavne tajnice Udruge. U sklopu aktivnog angažmana u udruzi CroMSIC putuje na međunarodne sastanke studenata medicine u Portugalu, Turskoj i Estoniji te odrađuje dvije jednomjesečne stručne razmjene u Litvi i Maroku. Od brojnih projekata koje vodi kroz studij najviše se ističu Ljetna škola medicine ronjenja i Slagalica nasljeđa. Članica je državne intervencijske postrojbe Civilne zaštite Rijeka te udruge Eripio u odjeljenjima za ronjenje i spašavanje u vodama. Na završnoj godini fakulteta osniva i vodi Studentsku sekciju za onkologiju i radioterapiju, a u budućnosti se nada specijalizirati upravo internističku onkologiju te nastaviti svoj aktivni angažman u zajednici.