

# Črevesni mikrobiom pri bolnikih z rakom

## Gut microbiome in cancer patients

Ivkovič Jakob<sup>1</sup>, Unk Mojca<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup>Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup>Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

Korespondenca: Jakob Ivkovič

E-mail: ji4406@student.uni-lj.si

Poslano / Received: 9. 9. 2024

Sprejeto / Accepted: 24. 9. 2024

doi: 10.25670/oi2024-009on

### IZVLEČEK

Črevesni mikrobiom predstavlja genetsko zasnovo vseh mikrobov, ki obstajajo v človeškem prebavnem traktu in vsebuje približno 38 bilijonov mikroorganizmov, ki kodira več kot tri milijone genov. Razvoj novih tehnik molekularnega sekvenciranja je omogočil poglobljeno raziskovanje človeškega mikrobioma, ki je vpleten v presnovo hranil, zdravil, vzdržuje celovito bariero črevesne sluznice, varuje pred patogenimi mikroorganizmi in lahko spreminja imunski odziv gostitelja. Vse več je dokazov, da je črevesni mikrobiom vpleten v razvoj nekaterih malignih bolezni in vpliva na učinkovitost onkološkega zdravljenja, predvsem na imunoterapijo. Sedanje razumevanje številnih zapletenih interakcij med črevesnim mikrobiomom, gostiteljevim imunskim sistemom, prehrano, zdravili in malignimi celicami temelji na manjših retrospektivnih in opazovalnih raziskavah. Namen tega prispevka je pregled razpoložljivih podatkov o mikrobiomu in naše dosedanje razumevanje vloge črevesnega mikrobioma pri bolnikih z rakom.

**Ključne besede:** črevesni mikrobiom, kancerogeneza, imunoterapija, zaviralci imunskih nadzornih točk

### ABSTRACT

The gut microbiome represents the genetic makeup of all the microbes in the human digestive tract. It contains about 38 trillion microorganisms with more than three million genes. The development of new sequencing techniques has made possible in-depth research of the human microbiome, which is involved in the metabolism of nutrients, and drugs, maintains a barrier of the intestinal mucosa, protects against pathogenic microorganisms, and can alter the host's immune response. There is compounding evidence that the microbiome is involved in the development of certain malignant diseases and affects the effectiveness of oncological treatment, specifically immunotherapy. Currently, the understanding of the numerous complex interactions between the gut microbiome, the host immune system, diet, drugs, and malignant cells is based on smaller retrospective and observational studies. This paper aims to review the available data on the microbiome and our current understanding of the role of the human microbiome in cancer patients.

**Keywords:** gut microbiome, cancerogenesis, immunotherapy, immune checkpoint inhibitors

### UVOD

Črevesni mikrobiom (ČM) predstavlja genetsko zasnovo vseh mikrobov, ki obstajajo v človeškem prebavnem traktu, vključno z bakterijami, virusi, kvasovkami, protozoi, glivami in arhejami. Vsebuje približno 38 bilijonov mikroorganizmov, ki jih kodira več kot tri milijone genov (1). Končni produkt teh genov je na tisoče metabolitov, ki nadomeščajo ali spreminjajo številne funkcije gostitelja (2). Dokazano je, da delujejo mikrobi v črevesu drug na drugega in da delujejo na gostiteljev imunski sistem na način, da uravnavajo fiziološko homeostazo gostitelja, prav tako pa lahko vplivajo tudi na razvoj bolezni. Normalen človeški ČM obsega dve veliki skupini, in sicer Bacteroidetes in Firmicutes. Dokazi kažejo, da pride do prvega stika gostitelja z mikrobi že v maternici. Materin mikrobiom tvori prvo mikrobovo okolje, ki se

po rojstvu številčno in po raznolikosti povečuje in doseže obseg odraslega mikrobioma do konca prvih 3–5 let življenja. Različni dejavniki oblikujejo kolonizacijo, med drugim način poroda, materina in/ali perinatalna izpostavljenost antibiotikom, način hranjenja, vrsta prehrane. Ko je enkrat vzpostavljen, je sestava ČM razmeroma stabilna skozi celotno odraslo življenje, lahko pa se spremeni kot posledica bakterijskih okužb, zdravljenja z antibiotiki, kajenja, različnih bolezenskih stanj, medicinskih in kirurških posegov ter dolgotrajne spremembe prehrane (3).

Črevesni mikrobiom je opredeljen kot "zadnji neodkriti človeški organ". Mikrobi v človeškem črevesju pomembno vplivajo na zdravje ljudi in delovanje imunskega sistema zaradi njihove bližine imunskemu okolju v prebavnem traktu. Kompleksne interakcije omogočajo toleranco zaužitih komenzalnih bakterij in živalskih

antigenov ter sposobnost imunskega sistema, da prepozna in napade oportunistične bakterije. Poleg vpliva na lokalni imunski odziv imajo mikrobi tudi širše učinke na prirojeno in pridobljeno imunost z vplivom na regulatorni fenotip gastrointestinalnih dendritičnih celic (4). To potrjuje živalski model sterilnih miši brez črevesnega mikrobioma, ki imajo hude okvare imunosti, kot so odsotnost plasti sluznice v črevesu, spremenjeno izločanje imunoglobulinov A (IgA) ter zmanjšano velikost in funkcionalnost Peyerjevih vozličev ter mezenteričnih bezgavk (5).

Manjšo raznolikost bakterij v črevesju kot običajno so opisali pri ljudeh z različnimi pridruženimi stanji, vključno z debelostjo, boleznimi srca in ožilja, avtoimunimi boleznimi, nevrološkimi motnjami, kar kaže na neposredno povezavo med raznolikostjo mikrobioma in funkcionalnim stanjem organizma (6–10). Porušeno občutljivo razmerje komezalnih bakterij imenujemo disbioza, za katero je značilen manj raznolik in manj stabilen mikrobiom, ki omogoča razrast oportunističnih patogenih bakterij (11). Takšno neravnovesje lahko povzroči moten lokalni, lokoregionalni in sistemski imunski odziv prek porušene mukozne bariere, sprememb v signalizaciji citokinov, zaviranja kolonizacije probiotičnih komezalnih bakterij in razraščanja enteropatogenih bakterij, kar vodi v aktivacijo vnetnega fenotipa tako lokalno kot sistemsko (12) (slika 1).

S staranjem postaja ČM zdravih posameznikov vedno bolj edinstven, medtem ko tega pri starejših posameznikih z različnimi bolezenskimi stanji ne opazimo. Za identificirani mikrobiom-

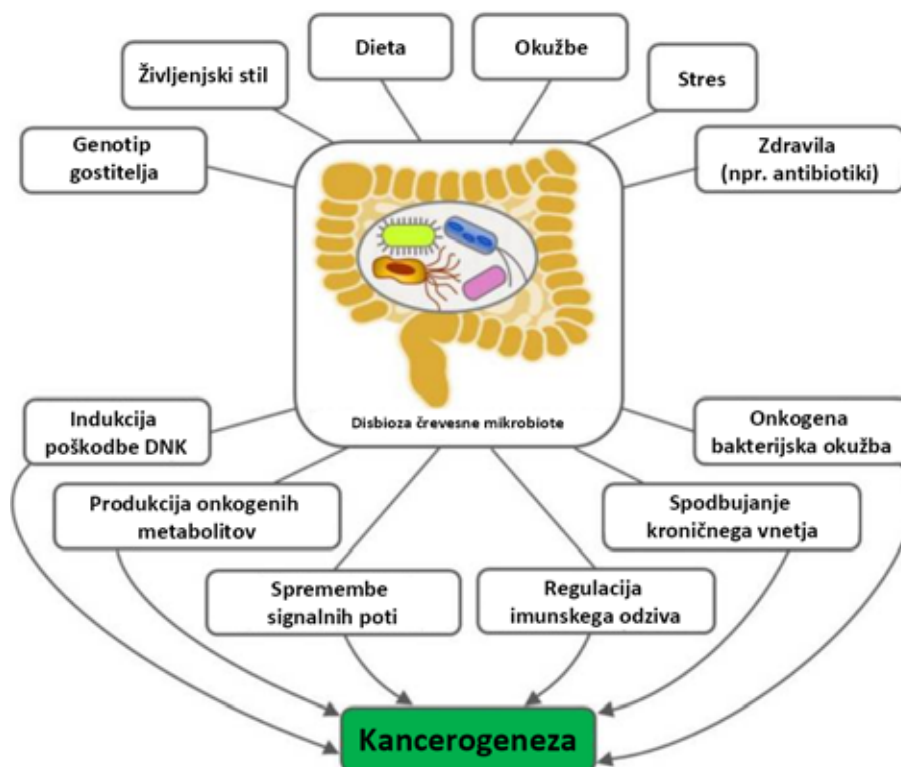
ski vzorec zdravega staranja je značilno krnjenje osnovnih rodov, ki jih najdemo pri večini ljudi, predvsem *Bacteroides*. Ohranjanje visoke prevlade roda *Bacteroides* v starosti ali nizka mera edinstvenosti ČM napoveduje krajše preživetje (13).

Namen tega članka je pregled literature o vlogi ČM pri bolnikih z rakom – tako pri nastanku raka kot zdravljenju z različnimi onkološkimi in drugimi zdravili, ki se pogosto uporabljajo v onkologiji, kliničnim odzivom na onkološko zdravljenje ter možnostjo spreminjanja kliničnega odziva na zdravila s spreminjanjem ČM. V članku povzemamo dosedanje znanje o vzdrževanju zdravega ČM in odstojanju sestave ČM pri bolnikih z napredovalim rakom v primerjavi z zdravimi posamezniki, tako imenovani onkološki podpis ČM (*angl. Gut OncoMicrobiome Signature (GOMS)*) in njegovo uporabnost kot biomarker med sistemskim onkološkim zdravljenjem.

## METODE

Vire in literaturo smo poiskali v spletnih zbirkah PubMed in Google scholar z uporabo kombinacij ključnih besed gut microbiome, cancer patients, cancerogenesis, immunotherapy, immune checkpoint inhibitors, intestinal microbiology, prognostic and predictive biomarkers, systemic treatment. V prvem krogu ocenjevanja smo izključili članke, ki niso ustrezali raziskovalni temi. Preverili smo navzkrižne vire, dostopne v publikacijah. Upoštevali smo samo literaturo v angleškem jeziku in v pregled vključili relevantne članke, raziskave ter strokovne monografije.

Slika 1: Mehanizmi, na katerih temelji kancerogeneza, povzročena z disbiozo črevesne mikrobiote.



Genotip gostitelja, življenjski slog, prehrana, okužbe, psihološki stres in zdravila so pomembni dejavniki, ki povzročajo črevesno disbiozo. Disbioza črevesne mikrobiote spodbuja karcinogenezo prek različnih mehanizmov, vključno z indukcijo poškodb DNK, proizvodnjo metabolitov, ki spodbujajo rast tumorjev, regulacijo različnih signalnih poti, spreminjanjem imunskega odziva gostitelja, aktivacijo kroničnega vnetja in spodbujanjem okužbe z onkogenimi bakterijami.

## REZULTATI

V nadaljevanju povzemamo pomembnejša dognanja zadnjih desetletij o ČM pri zdravih ljudeh in spremembah ČM, ki jih opažamo pri bolnikih z rakom, bodisi zaradi bolezni ali zdravljenja.

### Raziskovanje črevesnega mikrobioma

Za raziskovanje črevesnega mikrobioma se uporabljajo vzorci blata, saj postopek ni invaziven in se lahko ponavlja. Vedno več je dokazov o pomembnih razlikah v sestavi mikrobioma na površini črevesne sluznice in v blatu, zato sestava v blatu ne odraža natančno kompleksnih interakcij, ki se pojavijo neposredno na površini črevesne sluznice (14). Analiza bi idealno potekala na svežih nekontaminiranih vzorcih blata, vendar to večinoma ni mogoče. Za ohranitev mikrobne deoksiribonukleinske kisline (DNK) bi bilo zato treba shraniti vzorce blata pri temperaturi  $-80^{\circ}\text{C}$  brez dodatka konzervansov (15). Ker tudi to večinoma ni mogoče, se vzorce hrani in prenaša pri temperaturi  $4^{\circ}\text{C}$ , kar zmanjša možnost spremembe vsebine vzorca (16). Obstajajo tudi druge metode z uporabo ohranjevalnih medijev, ki inaktivirajo nukleaze in s tem stabilizirajo celično ribonukleinsko kislino (RNK) in DNK mikrobioma, kar omogoča kratkotrajno shranjevanje vzorcev pri sobni temperaturi (17). Velika variabilnost v vzorčenju blata vodi v večjo možnost sistemskih napak, zato sta potrebni vzpostavitev preverjene metode in standardizacija z namenom pridobitve kakovostnih podatkov in relevantnih analiz.

Napredek v tehnikah molekularnega sekvenciranja je v zadnjih 15 letih pospešil naše razumevanje ČM. Z novimi tehnikami lahko raziskovalci sekvencirajo celotne genome mikrobov, kar omogoča prepoznavanje funkcionalnih genov v genomih mikrobov (18). Analiza metagenomskih podatkov se lahko skupaj z identifikacijo specifičnih metabolitov uporablja za razvoj napovednega podpisa ČM ter razvoj potencialnih novih terapevtskih intervencij (19). Podatki, pridobljeni s sekvenciranjem, so pogosto obsežni, razdrobljeni in kontaminirani z veliko šuma. Z uporabo računalniških metod, s t. i. bioinformacijskimi tehnikami, lahko očistimo in analiziramo velike količine bioloških podatkov za identifikacijo bakterijskih taksonov. Analiza mikrobiote lahko razkrije različne ekosisteme, kot je  $\alpha$ -diverziteta (raznolikost vrst znotraj istega osebka),  $\beta$ -diverziteta (medindividualna vrstna raznovrstnost) in relativna številčnost. Prav tako je razvoj drugih tehnik, na primer visoko zmogljivih tehnik kultiviranja, t. i. kulturomika, v kombinaciji z masno spektrometrično mikrobno identifikacijsko tehniko, občutno razširil naše znanje o koristnosti mikrobioma kot tudi omogočil identificirati nove seve in vrste črevesnih bakterij (20, 21).

### Črevesni mikrobiom in kancerogeneza

Črevesni mikrobiom je povezan z nastankom številnih rakov, pretežno gastrointestinalnega in hepatobiliarnega izvora, vključno z rakom požiralnika (22), jeter (23), trebušne slinavke (24) in zlasti rakom debelega črevesja ter danke (RDČD) (22,23,24,25). Rak debelega črevesa in danke je tretji najpogostejši rak na svetu in je povezan s precejšnjo obolevnostjo in umrljivostjo (26). Stopnja pojavnosti narašča pri mlajših od 50 let, kar je povezano z uživanjem alkohola, kajenjem, debelostjo, sladkorno boleznijo in telesno neaktivnostjo (25). Evropska prospektivna raziskava rak in prehrana (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study) je leta 2016 potrdila, da je prehrana, bogata s predelanimi živili, živalskimi maščobami in rdečim mesom, skupaj z nizkim vnosom vlaknin in sadja, pomemben dejavnik tveganja za razvoj sporadičnega RDČD (25). Patogeneza poteka večstopenjsko, s kopičenjem genetskih sprememb v povezavi z morfološki spremembami in genetsko nestabilnostjo. Dokazali so statistično

pomembno relativno povečevanje vrste *Fusobacterium nucleatum* od zgodnjih intramukoznih karcinomov do razvoja napredovalih stadijev. Prisotnost vrst *Atopobium parvulum* in *Acintomyces odontolyticus* se je znatno povečala le pri številnih polipoznih adenomih in intramukoznih karcinomih v primerjavi s solitarnimi lezijami ( $p < 0,005$ ). Ta obsežna kohortna raziskava (vključenih je bilo 616 oseb) kaže tudi, da se določeni mikrobi in prešnovne spremembe lahko pojavijo zelo zgodaj v patogenezi RDČD, kar bi bilo lahko klinično in diagnostično pomembno (25).

Črevesni mikrobiom podpira številne mehanizme za rast probiotične in zaviranje enteropatogene kolonizacije neodvisno od imunske aktivnosti gostitelja. Mikrobi tvorijo bakterioidne in bakteristatične majhne molekule, protimikrobne peptide in fermentirajo prehranska vlakna v kratko verižne maščobne kisline (KVMK). Celice debelega črevesa uporabljajo tri glavne KVMK, in sicer acetat, propionat in butirat kot vire energije, medtem ko so celice RDČD primarno podvržene aerobni glikolizi. V primerjavi z normalnimi celicami so celice RDČD občutljive na KVMK, kar pomeni, da imajo KVMK verjetno vitalno vlogo pri celični homeostazi (27). S spreminjanjem ravni KVMK v črevesju, ki vodijo v spremembe ČM, bi torej morda lahko zaustavljali razvoj RDČD.

V kancerogenezi RDČD je prav tako vpletena disfunkcija črevesne sluznice s povečanim vstopom bakterij in patogenih metabolitov prek epitela v mezenhim zaradi izgube proteinov tesnega stika (28). Vse to povečuje lokalno in sistemsko vnetje ter posledično lahko sproži kancerogenezo. V zadnjih letih je bilo identificiranih več vrst bakterij, ki imajo vročno vlogo pri patogenezi RDČD, zaradi spodbujanja škodljivega črevesnega mikrobne ekosistema. To so *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus gallolyticus* (prej znan kot *Streptococcus bovis* tip 1), enterotoksični sevi *Bacterioides fragilis* (proizvaja B. fragilis toksin, BFT), sevi, pozitivni na poliketidno sintazo *Eshericia coli* (ki proizvaja kolibaktin), *Enterococcus faecalis* in *Peptostreptococcus anaerobius*, ki so vpleteni v proliferacijo tumorja, indukcijo provnetnih stanj in izgubljanje protitumorske imunosti (29–34). Po drugi strani pa so nekatere bakterije, kot so vrste *Lachnospiraceae*, *Bifidobacterium animalis* in *Streptococcus thermophilus*, pri bolnikih z RDČD okrnjeno zastopane (35,36).

Dobro znani peridontalni komenzal in oportunistični patogen, *Fusobacterium nucleatum*, je pritegnil pozornost kot rezultat raziskav sekvenciranja vzorcev blata bolnikov z RDČD. V raziskavah se je pokazalo, da in vitro spodbuja celično proliferacijo RDČD, v mišjih modelih spodbuja celično proliferacijo v ksenotransplantatih RDČD prek adhezina in s tem aktivira onkogeno signalizacijo Wnt/ $\beta$ -katenina (37,38). *Fusobacterium nucleatum* lahko oslabi imunski odziv z zaviranjem citotoksične funkcije limfocitov, ki infiltrirajo tumor, in naravnih celic ubijalk (NK) z vezavo na zaviralni imunski receptor TIGIT prek adhezina Fap2 (39).

### Vpliv črevesnega mikrobioma na onkološko zdravljenje

#### Kemoterapija

Pri številnih bolnikih z rakom je kemoterapija (KT), ki jo uporabljamo v onkologiji že več kot pol stoletja, glavni način sistemskega zdravljenja bolnikov z rakom. Raziskav, ki bi ugotavljale povezavo med ČM in učinkovitostjo KT, je malo. Večina razpoložljivih podatkov je iz predkliničnih raziskav, le nekaj iz kliničnih, vse pa kažejo na povezavo med ČM in učinkovitostjo in toksičnostjo KT. Prej omenjen *Fusobacterium nucleatum* lahko vpliva na odpornost celic RDČD na KT, kar so pokazali z veliko kohortno raziskavo, ki je potrdila povezavo med številčnostjo *Fusobacterium nucleatum* in krajšim celokupnim preživetjem (CP) (40).

Druge raziskave so pokazale vlogo *Fusobacterium nucleatum* v spodbujanju kemorezistence pri bolnikih z RDČD, ki so npr. bolj odporni na zdravljenje z oksaliplatinom (39).

V raziskavi na sterilnih miših ali miših, ki so imele svoj ČM, vendar osiromašen z antibiotiki, so ugotovili slabši odziv na oksaliplatin v primerjavi s tistimi, pri katerih je ČM ostal nedotaknjen (41). V raziskavi z mišmi s pljučnim tumorjem, ki so bile zdravljene s cisplatinom in dodatkom antibiotika, ki deluje na ČM, so ugotovili hitrejšo rast tumorjev in slabše CP. Poleg tega je kombinacija cisplatina s probiotiki, kot je *Lactobacillus*, izboljšala odziv na terapijo (42). V drugi raziskavi so ugotavljali, da je kombinacija s peroralnim dajanjem *Lactobacillus johnsonii* in *Enterococcus hirae* ob terapiji s ciklofosfamidom privedla do pretvorbe naivnih celic T v proinflatne celice T pomagalk 17, kar je vodilo v izboljšanje učinkovitosti ciklofosfamida pri miših s tumorjem (43).

V raziskavah so opažali tudi vpletenost ČM v nevrološko toksičnost, ki jo povzroča KT, vključno z razvojem periferne nevropatije ter kognitivnimi in psihološkimi motnjami (44). Razvoj s KT povzročene nevropatske bolečine naj bi bil moduliran s prehodom bakterijskih metabolitov prek poškodovane sluznične pregrade, kar naj bi vodilo v spremembo črevesno-imunske osi in posledično potenciranje dojemanja bolečine. Primer je citostatik paklitaksel, ki zmanjša številčnost ugodne *Akkermansia muciniphila* v črevesju in s tem zmanjša integriteto črevesne sluznice, kar vodi v povečan prehod proinflatornih in nevromodulatornih metabolitov (44).

### Zaviralci imunskih kontrolnih točk

Zaviralci imunskih kontrolnih točk (ZIKT), kot so ligand programirane celične smrti 1 (PD-L1), njegov protein (PD-1) in citotoksični protein-4, povezan s T-limfociti (CTLA-4), predstavljajo revolucijo v sistemskem zdravljenju raka in so v zadnjem desetletju korenito spremenili standardno sistemsko zdravljenje onkoloških bolnikov (45,46). Vendar se učinkovitost ZIKT med različnimi vrstami raka precej razlikuje. Kot se je izkazalo v raziskavah odziv na ZIKT, poleg tumorskih značilnosti narekujejo številni gostiteljevi genetski in imunski dejavniki (47-50).

Že leta 2015 sta dve predklinični raziskavi nakazali potencialno vpletenost ČM pri moduliranju učinkovitosti na anti-CTLA-4 in anti-PD-1 terapijo (51,52). Vétizou je s sodelavci dokazal, da je učinkovitost zdravljenja s protitelesom proti CTLA-4 pri miših s sarkomom znatno večja, če je ČM obogaten z vrstama *Bacteroides fragilis* in *Burkholderia cepacia* (51). Prav tako je v mišjem modelu Sivan s sodelavci ugotovil, da je učinkovitost protiteles proti PD-L1 pri malignem melanomu večja, kadar je ČM obogaten z *Bifidobacterium* spp. (52). V tej raziskavi so dokazali, da peroralno dajanje *Bifidobacterium* spp. V kombinaciji s protitelesi proti PD-L1 poveča odziv T-celic z infiltracijo v tumorskem mikrookolju, kar je povečalo zaviranje rasti celic malignega melanoma (52).

Kasneje so objavili več raziskav, ki so podprle vlogo ČM pri moduliranju odziva na ZIKT (53-55). Routy je s sodelavci ugotovil, da so imeli bolniki z malignim melanomom, zdravljeni z antibiotiki med zdravljenjem z anti-PD-1/anti-PD-L1, slabše CP. (53). Bolniki, ki so odgovorili na zdravljenje, so imeli ČM bogato z dvema vrstama, *Akkermansia* spp. in *Alistipes* spp. Ob presaditvi fekalne mikrobiote iz bolnikov v sterilne miši so avtorji ugotovili, da je *Akkermansia muciniphila* povečala intratumorski citotoksični T-celični odziv in s tem odgovor na zdravljenje z anti-PD-1 pri miših (53). Gopalakrishnan je s sodelavci pri bolnikih z malignim melanomom dokazal, da je bila ČM bolnikov, ki so odgovorili na zdravljenje z anti-PD-1, drugačna po sestavi

v primerjavi z bolniki, ki na zdravljenje niso odgovorili (54). Avtorji so med bolniki, ki so odgovorili, opazili večjo prisotnost vrst Clostridiales in Ruminococcaceae. Prav tako je Matson s sodelavci potrdil ugotovitev, da ima blato bolnikov z malignim melanomom, ki odgovorijo na zdravljenje z ZIKT, drugačno sestavo ČM kot tisti, ki na zdravljenje ne odgovorijo (55). Identificirali ter "in vivo" dokazali so pomen vrst *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium* in *Collinsella aerofaciens* na večjo učinkovitost zdravljenja z anti-PD-1 (55). V več drugih manjših raziskavah so raziskovali vlogo ČM na odziv na zdravljenje z ZIKT, rezultati so bili predstavljeni v metaanalizi (56), ki je pokazala, da v ČM odzivnikov prevladuje vrsta *Faecalibacterium* in bogata zastopanost vrste *Barnesiella intestinhominis* in metabolitov vitamina B. V raziskavi so lahko neodvisno napovedali kohorto bolnikov, ki odgovorijo na zdravljenje z ZIKT, kar je tudi napovedovalo prognozo bolnikov.

Sopojavi zdravljenja z ZIKT je velik izziv pri zdravljenju bolnikov in pogosto vodi do odložitve in/ali prekinitve zdravljenja. V predkliničnih modelih so ugotavljali izboljšanje imunsko pogojenih neželenih učinkov pri oralnem jemanju vrst *Bacteroides fragilis* in *Burkholderia cepacia* (51). Pri bolnikih, zdravljenih s protitelesi anti-CTLA-4, so ugotavljali, da so imunsko pogojeni neželeni učinki pogostejši pri tistih, katerih je ČM bogata z vrsto Firmicutes in številčno okrnjena z vrsto *Bacteroides* (56,57). Vse to kaže, da sestava ČM pomembno vpliva tudi na pojav neželenih učinkov zdravljenja z ZIKT.

Veliko vprašanj o ČM in zdravljenju z ZIKT ostaja neodgovorjenih, predvsem vprašanje mehanizma delovanja in medsebojnih vplivov. Odziv na ZIKT je morda vsaj delno povezan s ČM, saj mikrobiom lahko vpliva na učinkovitost obstoječega imunskega odziva, ki ga ZIKT okrepi. Bakterijske vrste *Bifidobacterium animalis*, *Lachnospiraceae* spp. in *Streptococcus thermophilus* v ČM so pri bolnikih z RDČD slabo zastopane, vendar imajo zaščitni učinek proti kancerogenezi RDČD (36). Ni jasno, ali je ugoden odziv na ZIKT povezan samo z eno bakterijo ali s specifično kombinacijo vrst. Pred nedavnim je bilo odkrito, da vrsta *Bifidobacterium pseudolongum* proizvaja presnovek, imenovan inozin, ki je povečal učinek ZIKT na mišjih modelih (58). Prav tako je bilo v predklinični raziskavi pokazano, da dodatek inozina poveča učinek ZIKT in prenos T-celic pri solidnih rakih (59,60). Metaboliti, kot je inozin, predstavljajo funkcionalni učinek ČM, in morda se bo v prihodnosti izkazalo, da so bolj pomembni pri napovedovanju odgovora na zdravljenje z ZIKT kot pa sam ČM.

### Vpliv drugih zdravil na črevesni mikrobiom

#### Antibiotiki

Vse več je dokazov, ki kažejo, da izpostavljenost antibiotikom pred začetkom zdravljenja z ZIKT moti sestavo črevesne mikrobiote in negativno vpliva na klinični odgovor bolnikov z različnimi solidnimi malignomi (61, 62).

Rezultati nedavno objavljene največje metaanalize doslej, ki je vključevala veliko skupino bolnikov (n = 46.232) z različnimi solidnimi raki (nedrobnocelični pljučni rak (NDPR), maligni melanom, genitourinarni in gastrointestinalni raki), ki so prejeli antibiotike v času od 90 dni pred začetkom do 90 dni po začetku zdravljenja z ZIKT v monoterapiji ali v kombinaciji s KT, so potrdili značilno krajši čas do napredovanja bolezni (ČNB) in CP (62). Posebej v skupini bolnikov z NDPR je bilo zdravljenje s kombinacijo KT-ZIKT in izpostavljenostjo antibiotikom povezano z značilno krajšim ČNB in CP tudi ob upoštevanju drugih znanih prognostičnih dejavnikov. Bolniki, ki so hkrati prejeli več kot eno vrsto antibiotikov, so imeli najslabše rezultate preživetja, kar kaže, da je uporaba antibiotikov širokega

spektra lahko povezana s posebej slabimi rezultati. Bolniki, ki so prejeli peroralne antibiotike, so imeli podobno slabe rezultate preživetja kot tisti, ki so bili zdravljeni z intravenskimi antibiotiki, kar nakazuje, da način uporabe verjetno ni pomemben dejavnik odgovora na zdravljenje (63). Opazili so tudi, da je bil učinek cefalosporinov drugačen pri bolnikih, ki so prejeli kombinacijo KT-ZIKT v primerjavi z monoterapijo z ZIKT (63). Pokazalo se je tudi, da so slabši rezultati preživetja tudi v primeru antibiotične terapije v časovnem oknu od 60 dni pred in 42 dni po začetku zdravljenja z ZIKT +/- KT. Zanimivo pa se ni pokazal vpliv na preživetje ob uporabi antibiotikov neposredno po začetku KT-ZIKT (63).

Čeprav se antibiotikom večkrat ni mogoče izogniti, je priporočljivo skrajšati trajanje izpostavljenosti in izbrati antibiotike z ožjim spektrom. V prihodnosti bo treba preučiti možnosti za zmanjšanje negativnega vpliva uporabe antibiotikov na izide zdravljenja, npr. z uporabo oglja (64). Prihodnje študije, vključno s funkcionalnimi študijami "in vivo", bodo potrebne za razumevanje diferencialnega vpliva na kategorije antibiotikov in rezultat zdravljenja z ZIKT.

Nedavno objavljen raziskave ČM pri bolnikih z rakom, ki so bili zdravljeni z ZIKT, so opisale z antibiotiki povezano disbiozo. Te raziskave so pokazale nižjo izhodiščno raznolikost ČM in znižano prisotnost bakterij, ki so povezane z odzivom na ZIKT, kot je vrsta *Ruminococcus* (65,66,67). V raziskavi 70 japonskih bolnikov z NDPR je analiza sestave ČM pokazala, da je uporaba antibiotikov povezana z občutno zmanjšano alfa raznolikostjo, in porazdelitev ČM v dve skupini glede na izpostavljenost antibiotiku (65). Bolniki, ki niso prejeli antibiotika, so imeli bogato zastopanost vrste *Ruminococcaceae*, *Clostridiales* in *Agathobacter*, medtem ko so imeli bolniki, izpostavljeni antibiotiku, bogato zastopanost vrste *Hungatella*, kar je bilo povezano tudi s krajšim CP pri bolnikih z NDPR, zdravljenih z ZIKT (68). Velika prospektivna raziskava je ugotavljala vpliv vrste *Akkermansia muciniphila* na odgovor na zdravljenje z ZIKT pri 338 bolnikih z NDPR. Zanimivo je, da so v skupini z najvišjim deležem vrste *Akkermansia muciniphila* ugotavljali odpornost na ZIKT, obenem pa je bila ta skupina tudi bolj izpostavljena antibiotikom pred začetkom zdravljenja z ZIKT (68). Raziskave so tudi pokazale, da lahko traja 30 dni in več, da si ČM opomore po zdravljenju z antibiotiki (69).

Antibiotiki lahko spremenijo ČM tako, da povzročijo izgubo raznolikosti, izgubo vitalnih taksonov, spremembe v profilu metabolitov ČM, pa tudi zmanjšajo odpornost na kolonizacijo proti invazivnim patogenom, kar povzroči spremembo celovitosti črevesne pregrade, kot je npr. okužba s *Clostridium difficile* (70). Do nedavnega mehanizem delovanja antibiotikov na slabši odziv na ZIKT ni bil jasen. Pred nedavnim pa je Fidelle s sodelavci v predkliničnih modelih ugotovil, da z antibiotiki povzročena črevesna disbioza spodbuja znižanje regulacije celične adhezijske molekule-1 (MAdCAM-1) v sluznici ileuma, čemur sledi postantibiotična ponovna kolonizacija črevesja z vrstama *Enterocloster* in *Hungatella* (71). Pokazali so, da znižana regulacija MAdCAM-1 povzroči znižanje imunosupresivnih celic T in odpornosti na anti-PD-1. Opazili so, da se s presaditvijo fekalnih mikrobov nivo MAdCAM-1 obnovi. Prav tako so v neodvisnih kohortah bolnikov z napredovalim NDPR pri bolnikih z rakom ledvic in sečnega mehurja opažali nizke ravni topnega MAdCAM-1 v obtoku, kar se je odražalo s črevesno disbiozo in odpornostjo na zdravljenje z anti-PD-1 (71). Rezultati kažejo na možni mehanizem za slab odziv na zdravljenje z ZIKT, ki ga posreduje MAdCAM-1, in možnost potencialnega bioznačevalca za odkrivanje z antibiotiki povezane disbioze. Ta raziskava prav tako kaže na potencialno klinično uporabnost obnove ali izboljšanja ČM pred začetkom

zdravljenja z ZIKT. Trenutno poteka več raziskav presaditve fekalne mikrobiote, uporabe prebiotikov ali probiotikov, ki bodo v prihodnosti morda podale tudi možne rešitve za optimalni odgovor na zdravljenje z ZIKT.

### Druga zdravila

Številna druga zdravila imajo lahko škodljive učinke na ČM. Zaviralci protonske črpalke (ZPČ) so najbolj raziskani in njihovo dolgotrajno uporabo povezujejo s povečanim tveganjem za raka želodca (72). Številni raziskovalci so dokazali povečano številčnost vrst *Streptococcaceae* in *Micrococcaceae* v ČM pri uporabi ZPČ (73,74). Medtem ko se je pokazalo, da je dolgotrajna uporaba ZPČ povezana s povečanim tveganjem za raka želodca tudi po eradikaciji *Helicobacter pylori*, kakovostnih raziskav, ki bi dokazale povezavo med učinkovitostjo ZIKT, uporabo ZPČ in specifično mikrobioto, ni.

Uporaba kortikosteroidov med zdravljenjem z ZIKT je pomembna, ker se kortikosteroidi pogosto uporabljajo za obvladovanje neželenih učinkov zdravljenja z ZIKT. Uporaba kortikosteroidov se je v raziskavah izkazala kot negativni neodvisni prognostični dejavnik preživetja. V kohorti 640 bolnikov z NDPR, zdravljenih z ZIKT, so imeli tisti, ki so neprekinjeno prejeli kortikosteroide v odmerku  $\geq 10$  mg ekvivalenta prednizona na dan pred začetkom zdravljenja z ZIKT, krajši ČNB in CP, kar sta potrdila tako univariatna kot multivariatna analiza (75). Uporaba kortikosteroidov med zdravljenjem z ZIKT za obvladovanje sopojavov ZIKT pa nima vpliva na CP (76). Poleg protivnetnih in imunosupresivnih učinkov lahko kortikosteroidi povzročijo tudi znatne spremembe v sestavi ČM. Deksametazon tako v mišjem modelu povzroča povečanje številčnosti vrst *Clostridiales* in *Lactobacillaceae*, vendar podatkov o spremembi sestave ČM pri ljudeh nimamo (77).

### Spreminjanje črevesnega mikrobioma

Ideja o spreminjanju ČM z namenom izboljšanja izidov zdravljenja bolnikov z rakom je vznemirljiva. Kljub obsežnemu raziskovanju v zadnjih desetletjih ostaja sestava "idealnega" ČM neznana. Medtem ko so bile identificirane nekatere ugodne in neugodne bakterije, pa kompleksnost ČM in veliko število kompleksnih interakcij presega naše razumevanje in preprosta identifikacija mikrobov predstavlja le vrh ledene gore našega vedenja o ČM. Malo verjetno je, da bo enak ČM idealen za vsakega posameznika, saj je odvisen od številnih drugih dejavnikov. V svetu trenutno potekajo številne intervencijske raziskave s poudarkom na zdravljenju z ZIKT pri različnih oblikah raka in drugih boleznih. Bistvenega pomena je celostno razumevanje uspešnosti onkološkega zdravljenja glede na sestavo ČM. Razvoj strategij za oblikovanje idealnega terapevtskega ČM pred specifičnim sistemskim onkološkim zdravljenjem bi lahko pomenil novo ero v razvoju onkologije.

### Presaditev črevesnega mikrobioma

Presaditev črevesnega mikrobioma (PČM) je postopek, pri katerem se tekoče blato (ali njegova kriokonzervirana mikrobnna vsebina) darovalca vnese v debelo črevo drugega posameznika prek kislinsko odpornih kapsul, nazogastrične sonde ali rektalno. Teoretično je črevesne vzorce mogoče pridobiti bodisi iz blata bolnikov, ki so odgovorili na zdravljenje z ZIKT, kar predvideva ugoden ČM, ali preprosto iz blata razmeroma mladih in zdravih oseb z raznolikim GM in jih presaditi v na ZINT odporne bolnike (78). Pri okužbi s *Clostridioides difficile* se PČM uspešno uporablja za obvladovanje na zdravljenje odpornega kolitisa (79).

Poleg tega je bil PČM uporabljen pri uravnavanju zavrnitve po alogenski presaditvi matičnih celic (80). V nedavno objavljeni klinični raziskavi faze I pri predhodno nezdravljenih 20 bolnikih z razsejanim malignim melanomom, v kateri so kombinirali PČM zdravega darovalca z zdravljenjem z zaviralcema PD-1 nivolumabom ali pembrolizumabom, so ugotavljali varnost in odgovor na zdravljenje. Za PČM niso poročali o neželenih sopojavih stopnje 3 ali več, pet bolnikov (25 %) je imelo imunsko pogojene neželene učinke stopnje 3. Opažali so 65 % (13 od 20 bolnikov) objektivni odgovor na zdravljenje, štirje bolniki (20 %) so imeli popoln odgovor (81). V drugi raziskavi z 10 bolniki z razsejanim malignim melanomom, ki primarno niso odgovorili na zdravljenje z ZIKT, so po PČM opažali odgovor na zdravljenje pri treh bolnikih, od tega sta bila dva delna in en popoln odgovor (82). V svetu poteka trenutno več kot 20 raziskav, ki ugotavljajo vpliv PČM na odgovor na zdravljenje z ZIKT. V nekaj manjših raziskavah so poročali tudi o primerih PČM, s katerimi so uspešno zdravili z ZIKT povzročeni kolitis (83), kar predstavlja dodatno področje možnih nadaljnjih raziskav.

### Probiotiki in bakterijske družbe

Koristne bakterije, ki krepijo imunski sistem, je mogoče pripraviti kot prehranski dodatek. Probiotiki so žive bakterije, za katere domnevajo, da zagotavljajo zdravstvene koristi in pomagajo pri homeostazi ČM. Bakterijske družbe so kombinacija dveh ali več mikrobnih skupin, katerih mešanica se uporablja z namenom izkoriščanja posebnih funkcij posamezne mikrobiote ali sinergističnih učinkov več mikrobiot kot intervencije s terapevtskim potencialom. Prenos živih bakterij v črevo predstavlja težavo zaradi kislega okolja zgornjega prebavnega trakta, vendar je vedno več metod, s katerimi se lahko izognemo temu vplivu. Trenutno potekajo številne klinične raziskave zdravljenja bolnikov s solidnimi tumorji z uporabo terapevtskega mikrobioma (imenovan tudi "probiotiki naslednje generacije"). Gre za koncept sočasnega jemanja živih bioterapevtskih izdelkov v kombinaciji z zdravljenjem s konvencionalnimi ZIKT. Poteka kar nekaj raziskav z namenom pridobivanja zgodnjih podatkov o uporabnosti teh izdelkov, odmerkih in varnosti (84).

Številni bolniki uživajo komercialno dostopne, »konvencionalne« probiotike, ki pa so ozkega razpona in vključujejo predvsem *Lactobacillus* spp. in *Bifidobacterium* spp. Klinični dokazi kažejo, da običajni probiotiki nimajo pomembnih koristi za zdravje, zlasti za zdrave posameznike (85). Rezultati nedavnih raziskav so celo nakazali možnost, da lahko uporaba probiotikov po antibiotičnem zdravljenju upočasnijo obnovo ČM (69). V raziskavi s 312 bolniki z malignim melanomom, ki so prejemale zdravljenje z ZIKT, je 42 % bolnikov jemalo probiotike, vendar je imela ta skupina manjšo mikrobiotsko genetsko raznolikost, kar je bilo povezano s slabšim odgovorom na zdravljenje z ZIKT in krajšim preživetjem (86). V nedavno objavljeni randomizirani raziskavi faze I so ocenjevali učinke CBM588 (probiotični sev *Clostridium butyricum* CBM 588) na sestavo ČM, ki so ga dajali v kombinaciji s kabozantinibom in nivolumabom pri bolnikih z napredovalim ali razsejanim svetloceličnim rakom ledvice (RCC) (87). Primarni cilj raziskave je bil obogatitev ČM s sevom *Bifidobacterium* spp., vendar dodatek CBM588 kabozantinibu in nivolumabu ni povečal številčnosti *Bifidobacterium* spp. ali alfa raznolikosti. Objektivni odgovor na zdravljenje je bil znatno višji pri udeležencih, zdravljenih s CBM588, v primerjavi s tistimi v kontrolni skupini (74 % v primerjavi 20 %;  $P = 0,01$ ). Čas do napredovanja bolezni po šestih mesecih je bil 84 % v eksperimentalni skupini v primerjavi s 60 % v kontrolni skupini (87). Potrebne so nadaljnje raziskave za potrditev teh ugotovitev in boljšo opredelitev mehanizma tega učinka.

Uživanje probiotikov je v več raziskavah pokazalo tudi ugodne učinke na izboljšanje driske, povzročene s KT. Vsaj deloma naj bi bila to posledica vzpostavitve zdrave in prožne ČM (88). Nekatera združenja, vključno z Večnacionalnim združenjem Podpornega zdravljenja pri raku (Multinational Association of Supportive Care in Cancer, MASCC) in Mednarodnega združenja za oralno onkologijo (International Society of Oral Oncology, ISOO) in Evropsko združenje za internistično onkologijo (European society for Medical Oncology, ESMO) uradno priporočajo uporabo probiotikov z *Lactobacillus* spp. za preprečevanje driske pri tistih bolnikih, ki prejemajo KT in/ali obsevanje zaradi maligne bolezni na področju medenice (89).

Zaradi sinergije in interakcij, kot so horizontalni prenos genov, navzkrižno hranjenje in medsebojna signalizacija, lahko bakterijski skupki zagotavljajo fiziološko prednost v primerjavi z enim organizmom (90). Primer je VE800, zbir 11 komezalnih črevesnih bakterijskih sevov, ki so v predkliničnih modelih spodbudili indukcijo CD8<sup>+</sup> T celic v črevesju, ki proizvajajo interferon- $\gamma$  (91). Trenutno poteka več kliničnih raziskav, ki ugotavljajo varnost, toksičnost in učinkovitost bakterijskih skupkov skupaj z ZIKT pri bolnikih z različnimi razsejanimi raki.

### Dieta

Prednost prehranskih posegov je varnost, stroškovna učinkovitost, prav tako pa so razmeroma lahko izvedljivi. Sprememba prehrane lahko hitro in učinkovito vpliva na ČM, sestava se lahko spremeni že v petih dneh. Vsako živilo lahko spremeni sestavo mikrobioma. V nadaljevanju se bomo osredotočili na glavne in najpomembnejše sestavine v prehrani.

Prehranske vlaknine so polimeri ogljikovih hidratov z vsaj 3 monomernimi enotami in so odporni na endogene prebavne encime. Nanje lahko delujejo črevesni mikrobi, tako da nastanejo metaboliti, kot so kratkoverižne maščobne kisline. Probiotiki so sestavine hrane (večinoma prehranske vlaknine), ki jih človeško telo ne prebavi, lahko pa spodbujajo rast koristnih mikroorganizmov v debelem črevesu. Čeprav je priporočeno uživanje 30 g vlaknin na dan, povprečni odrasli Slovenec zaužije le približno 20 g vlaknin na dan (92). Tako nizek vnos vlaknin lahko zmanjša proizvodnjo kratkoverižnih maščobnih kislin in preusmeri metabolizem črevesnega mikrobioma v uporabo manj ugodnih hranil in povzroči nastanek potencialno škodljivih metabolitov. Raziskava o učinku prehrane na bolnike z malignim melanomom, ki so prejemale zdravljenje z ZIKT, je pokazala, da so imeli bolniki ob prehrani z visoko vsebnostjo vlaknin značilno daljši ČNB kot tisti, ki so uživali hrano z nizko vsebnostjo vlaknin (86).

Polifenoli so spojine, ki vsebujejo več kot eno fenolno hidroksilno skupino in sestavljajo največjo skupino fitokemikalij. Najdemo jih v številnih živilih, kot so barvito sadje, zelenjava, zelišča, semena, kava, čaj, kakav in vino. Fenolne spojine in njihovi presnovki naj bi prispevali k ugodnim učinkom na zdravje prebavil z uravnavanjem ravnovesja črevesnih mikrobov in sočasnim zaviranjem patogenov. Uživanje polifenolov, pridobljenih iz kakava, je bilo povezano s pomembnim povečanjem lipoproteinov visoke gostote (HDL) v plazmi in znatno zmanjšanje koncentracije trigliceridov in C-reaktivnega proteina (CRP) v plazmi (93). Prav tako je uživanje polifenolov, ki jih najdemo v sadju, semenih, vinu ter čaju, povezano z nižjo mikrobiološko obremenitvijo s patogenim *Clostridium* spp. (93).

Fermentirani izdelki (npr. kefir, jogurti, kislo zelje, kruh iz kislega testa, kimči, kombuča), ki jih predelujejo mikrobnimi organizmi in encimi iz nekaterih živil, kažejo potencialno aktivnost za preprečevanje in obvladovanje vrste bolezni, vključno z rakom. Metaanaliza 61 raziskav z več kot 1,9 milijona udeležencev je pokazalo statistič-

no značilno povezavo med vnosom fermentiranih mlečnih izdelkov in splošnim zmanjšanjem tveganja za raka (94).

Umetna sladila z malo kalorijami se pogosto uporabijo kot alternativa sladkorju. Regulatorni organi jih prepoznajo kot varne, vendar so raziskave na živalih pokazale, da ta sladila lahko negativno vplivajo na ČM (95). Dokazano je, da sukraloza, aspartam in saharin porušijo ravnovesje in raznolikost mikrobioma tako pri ljudeh kot v živalskih modelih (96). Prehranski dodatki, kot so emulgatorji, ki so pogosto prisotni v predelani prehrani, prav tako vplivajo na črevesno mikrobioto v živalskih modelih (97).

Medtem ko rastlinske beljakovine zvišajo prisotnost kratkoveržih maščobnih kislin, ki so povezane z ugodnim ČM, uživanje mesa poveča število in delež neugodnih anaerobov, kot so *Bacteroides*, *Alistipes* in *Bilophila*, poleg tega pa okrne vrste *Roseburia* in *Agathobacter rectalis* v črevesnem mikrobiomu in zniža koncentracijo butirata v blatu (98,99). Podatki iz literature kažejo, da dnevno uživanje rdečega ali predelanega mesa poveča tveganje za razvoj RDČD, in podpirajo priporočilo, da je v zahodnem svetu treba zmanjšati porabo in vnos mesa in predelanega mesa (100,101).

## RAZPRAVA

Vse bolj postaja pomembno zavedanje onkologov in drugih specialistov o pomenu ČM pri zdravljenju bolnikov z rakom in zavedanje o potencialnih učinkih antibiotikov in drugih zdravil na učinkovitost onkološkega zdravljenja, zlasti bolnikov na zdravljenju z ZIKT, za katere imamo tudi največ podatkov. Sprememba prehrane je najlažja in najbolj neinvazivna metoda, s katero je mogoče spremeniti ČM. Kljub temu je sprememba prehrane malo uporabljena intervencija pri bolnikih z rakom, ki niso podhranjeni. Glede na podatke lahko svetovanje bolnikom o zdravih prehranskih posegih pripomore k učinkovitosti onkološkega zdravljenja. Dosedanji podatki jasno kažejo, da je raznolikost prehrane, zlasti rastlinske (sadje, zelenjava, oreščki, semena in žita), uživanje polnovredne hrane ter izogibanje predelani hrani in prekomernemu uživanju rdečega mesa, ključna za zdrav in uravnavotežen ČM, ki lahko prispeva k boljši učinkovitosti specifičnega onkološkega zdravljenja (102). Zato moramo takšno prehrano svetovati vsem bolnikom z rakom, ki nimajo drugih prehranskih motenj, kot so npr. kaheksija ali težave z uživanjem peroralne hrane.

Glede na dosedanje podatke je sestava ČM verjetno veliko bolj pomembna v onkologiji, kot je bilo znano do sedaj, vendar so za nesporne dokaze potrebne dobro zasnovane raziskave z večjim številom preiskovancev, večjimi vzorci in bolj doslednim standardiziranim odvzemom in obdelavo vzorcev ter daljši čas spremljanja. Prav tako je zelo verjetno, da ni enoznačnega odgovora, ki bi ustrezal vsem bolnikom; kako doseči in ohraniti uravnotežen ČM, se verjetno razlikuje med bolniki, prav tako med različnimi raki. Čeprav smo lahko povsem prepričani, da imajo antibiotiki škodljiv vpliv na ČM in na odziv na zdravljenje z ZIKT ali druge vrste onkološkega zdravljenja, se antibiotični terapiji ni mogoče izogniti predvsem pri imunsko kompromitiranih, nevtropeničnih bolnikih in z zdravljenjem pri jasnih indikacijah ne smemo odlašati.

Nadaljnje raziskave ČM lahko ponudijo priložnost za izboljšanje oskrbe bolnikov z rakom na različnih stopnjah razvoja raka – od preprečevanja raka, presejanja do diagnoze in zdravljenja. Nastajajoče razumevanje mehanizmov interakcij med mikrobiomom, metabolomom in gostiteljem imunskega sistema povečuje potrebo po celovitih in standardiziranih raziskavah.

V prihodnosti morda lahko glede na podatke o različnem odzivu na zdravljenje z ZIKT v odvisnosti od ČM pričakujemo

usmerjeno zdravljenje bolnikov z rakom glede na ČM podpis. Še več, določanje in napoved bolezenskega stanja prek mikrobiomskega biopodpisa bi bil zagotovo eden od pomembnejših odkritij medicine. Druge raziskave se usmerjajo v odkrivanje in identifikacijo ključnih metabolitov v presnovi ČM in metabolnih poti, kar predstavlja funkcionalni rezultat ČM in predvidevamo lahko, da bo metabolomika postala pomemben del raziskovanja na področju znanosti o mikrobiomu.

Spreminjanje sestave mikrobioma lahko posamezniku povzroči druge zdravstvene težave. Vedno več je dokazov o interakciji med ČM, črevesjem in centralnim živčnim sistemom. PČM se npr. trenutno preizkuša kot nova terapija za vrsto psihiatričnih diagnoz, vključno z depresijo in anksioznostjo (103).

## ZAKLJUČEK

Zadnje desetletje je prineslo novo, vendar omejeno znanje o pomenu ČM v patogenezi raka, o možni vlogi pri razsoju, vplivu na preživetje bolnikov z rakom in učinkih na zdravljenje. Jasno je, da je ČM kompleksni ekosistem s prostorsko in časovno dinamiko, ki izhaja iz interakcij med mikrobi in gostiteljskimi celicami. Vsak rak se razvija v ekosistemu, v katerem prihaja do interakcij z okolnimi celicami, stromalnimi celicami in tumorskim mikrookoljem. Medtem ko so številne raziskave vpliva ČM na razvoj in zdravljenje raka v teku, je jasno, da je onkomikrobna znanost šele na začetku.

## LITERATURA

1. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 2016 Aug 19;14(8):e1002533.
2. Bull MJ, Plummer NT. Part I: the human gut microbiome in health and disease. *Integr Med (Encinitas).* 2014;13:17–22.
3. Nagpal R, Mainali R, Ahmadi S, Wang S, Singh R, Kavanagh K, et al. Gut microbiome and aging: physiological and mechanistic insights. *Nutr Healthy Aging.* 2018;4:267–85.
4. Tordesillas L, Berin MC. Mechanisms of oral tolerance. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2018;55:107–17.
5. Johansson ME, Jakobsson HE, Holmén-Larsson J, Schütte A, Ermund A, Rodríguez-Piñeiro AM, et al. Normalization of host intestinal mucus layers requires long-term microbial colonization. *Cell Host Microbe.* 2015;18:582–92.
6. Huda MN, Lewis Z, Kalanetra KM, Rashid M, Ahmad SM, Raqib R, et al. Stool microbiota and vaccine responses of infants. *Pediatrics.* 2014;134:e362–72.
7. Tang WHW, Hazen SL. The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease. *J Clin Invest.* 2014;124:4204–11.
8. Wang Y, Kasper LH. The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain Behav Immun.* 2014;38:1–12.
9. Yacoub R, Jacob A, Wlaschin J, McGregor M, Quigg RJ, Alexander JJ. Lupus: the microbiome angle. *Immunobiology.* 2018;223:460–5.
10. Zhao L. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11:639–47.
11. Frosali S, Pagliari D, Gambassi G, Landolfi R, Pandolfi F, Cianci R. How the intricate interaction among Toll-like receptors, microbiota, and intestinal immunity can influence gastrointestinal pathology. *J Immunol Res.* 2015;2015: 489821.

12. Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaïss CA, Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2017;17:219–32.
13. Wilmanski T, Diener C, Rappaport N, Patwardhan S, Wiedrick J, Lapidus J, et al. Gut microbiome pattern reflects healthy ageing and predicts survival in humans. *Nat Metab.* 2021;3(2):274–286.
14. Rangel I, Sundin J, Fuentes S, Replibber D, de Vos WM, Brummer RJ. The relationship between faecal-associated and mucosal-associated microbiota in irritable bowel syndrome patients and healthy subjects. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015;42:1211–21.
15. Fouhy F, Deane J, Rea MC, O'sullivan Ó, Ross RP, O'callaghan G, et al. The effects of freezing on faecal microbiota as determined using MiSeq sequencing and culture-based investigations. *PLoS ONE.* 2015;10:e0119355.
16. Choo JM, Leong LE, Rogers GB. Sample storage conditions significantly influence faecal microbiome profiles. *Sci Rep.* 2015;5:16350.
17. Menke S, Gillingham MAF, Wilhelm K, Sommer S. Home-made cost effective preservation buffer is a better alternative to commercial preservation methods for microbiome research. *Front Microbiol.* 2017;8:102.
18. Brumfield KD, Huq A, Colwell RR, Olds JL, Leddy MB. Microbial resolution of whole genome shotgun and 16S amplicon metagenomic sequencing using publicly available NEON data. *PLoS ONE.* 2020;15:e0228899.
19. Zierer J, Jackson MA, Kastenmüller G, Mangino M, Long T, Telenti A, et al. The fecal metabolome as a functional readout of the gut microbiome. *Nat Genet.* 2018;50:790–5.
20. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol.* 2015;6:791.
21. Lagier JC, Khelaïfia S, Alou MT, Ndongo S, Dione N, Hugon P, et al. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nat Microbiol.* 2016;1:16203.
22. Baba Y, Iwatsuki M, Yoshida N, Watanabe M, Baba H. Review of the gut microbiome and esophageal cancer: pathogenesis and potential clinical implications. *Ann Gastroenterol Surg.* 2017;1:99–104.
23. Yu L-X, Schwabe RF. The gut microbiome and liver cancer: mechanisms and clinical translation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14:527–39.
24. Wei M-Y, Shi S, Liang C, Meng Q-C, Hua J, Zhang Y-Y, et al. The microbiota and microbiome in pancreatic cancer: more influential than expected. *Mol. Cancer.* 2019;18:97.
25. Gonzalez CA, Riboli E. Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Eur J Cancer.* 2010;46:2555–62.
26. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68:394–424.
27. Gomes SD, Oliveira CS, Azevedo-Silva J, Casanova MR, Barreto J, Pereira H, et al. The role of diet related short-chain fatty acids in colorectal cancer metabolism and survival: prevention and therapeutic implications. *Curr Med Chem.* 2020;27:4087–108.
28. Martin TA, Jiang WG. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1788:872–91.
29. Long X, Wong CC, Tong L, Chu ESH, Ho Szeto C, Go MYY, et al. *Peptostreptococcus anaerobius* promotes colorectal carcinogenesis and modulates tumour immunity. *Nat Microbiol.* 2019;4:2319–30.
30. Chung L, Thiele Orberg E, Geis AL, Chan JL, Fu K, DeStefano Shields CE, et al. *Bacteroides fragilis* toxin coordinates a pro-carcinogenic inflammatory cascade via targeting of colonic epithelial cells. *Cell Host Microbe.* 2018;23:203–14.e5.
31. Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrède JP. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:11537–42.
32. Nowrouzian FL, Oswald E. *Escherichia coli* strains with the capacity for long-term persistence in the bowel microbiota carry the potentially genotoxic pks island. *Microb Pathog.* 2012;53:180–2.
33. Secher T, Samba-Louaka A, Oswald E, Nougayrède JP. *Escherichia coli* producing colibactin triggers premature and transmissible senescence in mammalian cells. *PLoS ONE.* 2013;8:e77157.
34. Wu S, Rhee KJ, Zhang M, Franco A, Sears CL. *Bacteroides fragilis* toxin stimulates intestinal epithelial cell shedding and gamma-secretase-dependent E-cadherin cleavage. *J Cell Sci.* 2007;120:1944–52.
35. Feng Q, Liang S, Jia H, Stadlmayr A, Tang L, Lan Z, et al. Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nat Commun.* 2015;6:6528.
36. Dai Z, Coker OO, Nakatsu G, Wu WKK, Zhao L, Chen Z, et al. Multi-cohort analysis of colorectal cancer metagenome identified altered bacteria across populations and universal bacterial markers. *Microbiome.* 2018;6:70.
37. Bullman S, Pedamallu CS, Sicinska E, Clancy TE, Zhang X, Cai D, et al. Analysis of *Fusobacterium* persistence and antibiotic response in colorectal cancer. *Science.* 2017;358:1443–8.
38. Rubinstein MR, Baik JE, Lagana SM, Han RP, Raab WJ, Sahoo D, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal cancer by inducing Wnt/ $\beta$ -catenin modulator Annexin A1. *EMBO Rep.* 2019;20:e47638.
39. Brennan CA, Garrett WS. *Fusobacterium nucleatum*—symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17:156–66.
40. Mima K, Nishihara R, Qian ZR, Cao Y, Sukawa Y, Nowak JA, et al. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut.* 2016;65:1973–80.
41. Iida N, Dzutsev A, Stewart CA, Smith L, Bouladoux N, Weingarten RA, et al. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science.* 2013;342:967–70.
42. Gui QF, Lu HF, Zhang CX, Xu ZR, Yang YH. Well-balanced commensal microbiota contributes to anti-cancer response in a lung cancer mouse model. *Genet Mol Res.* 2015;14:5642–51.
43. Daillère R, Vétizou M, Waldschmitt N, Yamazaki T, Isnard C, Poirier-Colame V, et al. *Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis* facilitate cyclophosphamide-induced therapeutic immunomodulatory effects. *Immunity.* 2016;45:931–43.



44. Ramakrishna C, Corleto J, Ruegger PM, Logan GD, Peacock BB, Mendonca S, et al. Dominant role of the gut microbiota in chemotherapy induced neuropathic pain. *Scientific Rep.* 2019;9:20324.
45. Ascierto PA, Long GV, Robert C, Brady B, Dutriaux C, Di Giacomo AM, et al. Survival outcomes in patients with previously untreated BRAF wild-type advanced melanoma treated with nivolumab therapy: three-year follow-up of a Randomized Phase 3 Trial. *JAMA Oncol.* 2019;5:187–94.
46. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, et al. Five-year survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med.* 2019;381:1535–46.
47. Ubeda C, Djukovic A, Isaac S. Roles of the intestinal microbiota in pathogen protection. *Clin Transl Immunology.* 2017;6:e128-e.
48. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011;331:1565–70.
49. Ravi R, Noonan KA, Pham V, Bedi R, Zhavoronkov A, Ozerov IV, et al. Bifunctional immune checkpoint-targeted antibody-ligand traps that simultaneously disable TGF $\beta$  enhance the efficacy of cancer immunotherapy. *Nat. Commun.* 2018;9:741.
50. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science.* 2018;359:1350–5.
51. Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, Lepage P, Waldschmitt N, Flament C, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science.* 2015;350:1079–84.
52. Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, Earley ZM, et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science.* 2015;350:1084–9.
53. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science.* 2018;359:91–7.
54. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets TV, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science.* 2018;359:97–103.
55. Matson V, Fessler J, Bao R, Chongsuwat T, Zha Y, Alegre ML, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science.* 2018;359:104–8.
56. Limeta A, Ji B, Levin M, Gatto F, Nielsen J. Meta-analysis of the gut microbiota in predicting response to cancer immunotherapy in metastatic melanoma. *JCI Insight.* 2020;5:23.
57. Chaput N, Lepage P, Coutzac C, Soularue E, Le Roux K, Monot C, et al. Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Ann Oncol.* 2017;28:1368–79.
58. Mager LF, Burkhard R, Pett N, Cooke NCA, Brown K, Ramay H, et al. Microbiome derived inosine modulates response to checkpoint inhibitor immunotherapy. *Science.* 2020;369:1481–1489.
59. Wang T, Gnanaprakasam JNR, Chen X, Kang S, Xu X, Sun H, et al. Inosine is an alternative carbon source for CD8<sup>+</sup>-T-cell function under glucose restriction. *Nat Metab.* 2020;2:635–47.
60. Zhang L, Jiang L, Yu L, Li Q, Tian X, He J, et al. Inhibition of UBA6 by inosine augments tumour immunogenicity and responses. *Nat Commun.* 2020;13, 5413.
61. Derosa L, Routy B, Desilets A, Daillère R, Terrisse S, Kroemer G, et al. Microbiota-centered interventions: the next breakthrough in immuno-oncology? *Cancer Discov.* 2021; 11, 2396–2412.
62. Crespín A, Le Bescop C, de Gunzburg J, Vitry F, Zalcman G, Cervesi J, et al. A systematic review and meta-analysis evaluating the impact of antibiotic use on the clinical outcomes of cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors. *Front Oncol.* 2023; 13, 1075593.
63. Elkrief A, Méndez-Salazar EO, Maillou J, Vanderbilt CM, Gogia P, Desilets A, et al. Antibiotics are associated with worse outcomes in lung cancer patients treated with chemotherapy and immunotherapy. *npj Precis. Onc.* 2024; 8, 143.
64. Rashidi A, Karuppiah S, Ebadi M, Shanley R, Khoruts A, Weisdorf DJ, et al. A dose-finding safety and feasibility study of oral activated charcoal and its effects on the gut microbiota in healthy volunteers not receiving antibiotics. *PLoS One.* 2022; 17, e0269986.
65. Hakozaiki T, Richard C, Elkrief A, Hosomi Y, Benlaïfaoui M, Mimpfen I, et al. The Gut microbiome associates with immune checkpoint inhibition outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Res.* 2020;8:1243–1250.
66. Derosa L, Routy B, Fidelle M, Iebba V, Alla L, Pasolli E, et al. Gut bacteria composition drives primary resistance to cancer immunotherapy in renal cell carcinoma patients. *Eur Urol.* 2020;78:195–206.
67. Thomas AM, Fidelle M, Routy B, Kroemer G, Wargo JA, Segata N, et al. Gut oncomicrobiome signatures (GOMS) as next-generation biomarkers for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2023;20, 583–603.
68. Derosa L, Routy B, Thomas AM, Iebba V, Zalcman G, Friard S, et al. Intestinal *Akkermansia muciniphila* predicts clinical response to PD-1 blockade in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Nat. Med.* 2022;28, 315–324.
69. Suez J, Zmora N, Zilberman-Schapira G, Mor U, Dori-Bachash M, Bashardes S, et al. Post-antibiotic gut mucosal microbiome reconstitution is impaired by probiotics and improved by autologous FMT. *Cell.* 2018;174:1406–23.e16.
70. Fishbein SRS, Mahmud B, Dantas G. Antibiotic perturbations to the gut microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 2023;21, 772–788.
71. Fidelle M, Rauber C, Alves Costa Silva C, Tian AL, Lahmar I, de La Varenne AM, et al. A microbiota-modulated checkpoint directs immunosuppressive intestinal T cells into cancers. *Science.* 2023; 380, eabo2296.
72. Cheung KS, Leung WK. Long-term use of proton-pump inhibitors and risk of gastric cancer: a review of the current evidence. *Ther Adv Gastroenterol.* 2019;12:1756284819834511.
73. Jackson MA, Verdi S, Maxan M-E, Shin CM, Zierer J, Bowyer RCE, et al. Gut microbiota associations with common diseases and prescription medications in a population-based cohort. *Nat Commun.* 2018;9:2655.

74. Imhann F, Bonder MJ, Vich Vila A, Fu J, Mujagic Z, Vork L, et al. Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut*. 2016;65:740–8.
75. Arbour KC, Mezquita L, Long N, Rizvi H, Auclin E, Ni A, et al. Impact of baseline steroids on efficacy of programmed cell death-1 and programmed death-ligand 1 blockade in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36:2872–8.
76. Skribek M, Rounis K, Afshar S, Skribek M, Rounis K, Afshar S, Grundberg O, Friesland S, Tsakonas G, et al. Effect of corticosteroids on the outcome of patients with advanced non-small cell lung cancer treated with immune-checkpoint inhibitors. *Eur J Cancer*. 2021;145:245–254.
77. Huang EY, Inoue T, Leone VA, Dalal S, Touw K, Wang Y, et al. Using corticosteroids to reshape the gut microbiome: implications for inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21:963–72.
78. Rohlke F, Stollman N. Fecal microbiota transplantation in relapsing *Clostridium difficile* infection. *Ther Adv Gastroenterol*. 2012;5:403–20.
79. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*. 2013;368:407–15.
80. Kakhana K, Fujioka Y, Suda W, Najima Y, Kuwata G, Sasajima S, et al. Fecal microbiota transplantation for patients with steroid-resistant acute graft-versus-host disease of the gut. *Blood*. 2016;128:2083–8.
81. Routy B, Lenehan JG, Miller WH Jr, Jamal R, Messaoudene M, Daisley BA, et al. Fecal microbiota transplantation plus anti-PD-1 immunotherapy in advanced melanoma: a phase I trial. *Nat Med*. 2023 Aug;29(8):2121–2132.
82. Baruch EN, Youngster I, Ben-Betzalel G, Ortenberg R, Lahat A, Katz L, et al. Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients. *Science*. 2021;371:602–9.
83. Fasanello MK, Robillard KT, Boland PM, Bain AJ, Kanehira K. Use of fecal microbial transplantation for immune checkpoint inhibitor Colitis. *ACG Case Rep J*. 2020;7:00360–e00360-e.
84. O'Toole PW, Marchesi JR, Hill C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat Microbiol*. 2017;2:17057.
85. Khalesi S, Bellissimo N, Vandelanotte C, Williams S, Stanley D, Irwin C. A review of probiotic supplementation in healthy adults: helpful or hype? *Eur J Clin Nutr*. 2019;73:24–37.
86. Spencer CN, McQuade JL, Gopalakrishnan V, McCulloch JA, Vetizou M, Cogdill AP, et al. Dietary fiber and probiotics influence the gut microbiome and melanoma immunotherapy response. *Science*. 2021;24;374(6575):1632–1640.
87. Ebrahimi H, Dizman N, Meza L, Malhotra J, Li X, Dorff T, et al. Cabozantinib and nivolumab with or without live bacterial supplementation in metastatic renal cell carcinoma: a randomized phase I trial. *Nat Med*. 2024; 30:2576–2585.
88. Mego M, Holec V, Drgona L, Hainova K, Ciernikova S, Zajac V. Probiotic bacteria in cancer patients undergoing chemotherapy and radiation therapy. *Complement Ther Med*. 2013;21:712–23.
89. Elad S, Cheng KKF, Lalla RV, Yarom N, Hong C, Logan RM, et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Can*. 2020;126(19): 4423–4431.
90. Hays SG, Patrick WG, Ziesack M, Oxman N, Silver PA. Better together: engineering and application of microbial symbioses. *Curr Opin Biotechnol*. 2015;36:40–9.
91. Tanoue T, Morita S, Plichta DR, Skelly AN, Suda W, Sugiura Y, et al. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. *Nature*. 2019;565:600–5.
92. Seljak BK, Valenčič E, Hristov H, Hribar M, Lavriša Ž, Kušar A, et al. Inadequate Intake of Dietary Fibre in Adolescents, Adults, and Elderlies: Results of Slovenian Representative SI. Menu Study. *Nutrients*. 2021;13, 3826.
93. Tzounis X, Rodriguez-Mateos A, Vulevic J, Gibson GR, Kwik-Urbe C, Spencer JP. Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *Am J Clin Nutr*. 2011;93:62–72.
94. Zhang K, Dai H, Liang W, Zhang L, Deng Z. Fermented dairy foods intake and risk of cancer. *Int J Cancer*. 2019;144:2099–108.
95. Nettleton JE, Reimer RA, Shearer J. Reshaping the gut microbiota: impact of low calorie sweeteners and the link to insulin resistance?. *Physiol Behav*. 2016;164 (Part B):488–93.
96. Bian X, Chi L, Gao B, Tu P, Ru H, Lu K. Gut microbiome response to sucralose and its potential role in inducing liver inflammation in mice. *Front Physiol*. 2017;8:487.
97. Chassaing B, Koren O, Goodrich JK, Poole AC, Srinivasan S, Ley RE, et al. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*. 2015;519:92–6.
98. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014;505:559–63.
99. Russell WR, Gratz SW, Duncan SH, Holtrop G, Ince J, Scobbie L, et al. Highprotein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *Am J Clin Nutr*. 2011;93:1062–72.
100. Aykan NF. Red meat and colorectal cancer. *Oncol Rev*. 2015;9:288.
101. Spector T, Gardner C. Bacon rashers, statistics, and controversy. *BMJ*. 2019;367: l5989.
102. Muscaritoli M, Arends J, Bachmann P, Baracos V, Barthelemy N, Bertz H, et al. ESPEN practical guideline: Clinical Nutrition in cancer. *Clin Nutr*. 2021;40(5):2898–2913.
103. Chinna Meyyappan A, Forth E, Wallace CJK, Milev R. Effect of fecal microbiota transplant on symptoms of psychiatric disorders: a systematic review. *BMC Psychiatry*. 2020;20:299.

© Avtor(ji). To delo je objavljeno pod licenco Creative Commons Priznanje avtorstva 4.0.

© The author(s). This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>