

# Uloga crijevne mikrobiote u alogeničnoj transplantaciji krvotvornih matičnih stanica

---

**Benčić, Mihaela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:396974>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-03**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Mihaela Benčić**

**Uloga crijevne mikrobiote u alogeničnoj  
transplantaciji krvotvornih matičnih stanica**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2021.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za hematologiju, Klinike za unutarnje bolesti KBC-a Zagreb, pod vodstvom doc.dr.sc. Zinaide Perić, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2020/2021.

## POPIS I OBJAŠNENJE KRATICA

3-IS – 3-indoksil-sulfat

AA – aplastična anemija

AhR – *Aryl-hidrococarbon Receptor*

ALL – akutna limfoblastična leukemija

Alo-TKMS – alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica

AMP – antimikrobni peptidi

A-T – ataksija-teleangiektazija

CLL – kronična limfocitna leukemija (engl. *Chronic Lymphocytic Leukemia*)

DC – dendritičke stanice (engl. *Dendritic Cells*)

FMT – transplantacija fekalne mikrobiote (engl. *Fecal Microbiota Transplantation*)

GF – *Germ-free*

GIT – gastrointestinalni trakt

GvHD – bolest presatka protiv primatelja (engl. *Graft-versus-Host-Disease*)

GvL-effect – reakcija tumora protiv leukemije (engl. *Graft-versus-Leukemia effect*)

ISC – crijevne matične stanice (engl. *Intestinal Stem Cells*)

LPS – lipopolisaharid

MAMP – molekularne strukture povezane s mikroorganizmima (engl. *Microbe-Associated Molecular Patterns*)

NF-κB – nuklearni faktor κB

OS – sveukupno preživljenje (engl. *Overall Survival*)

PRR – receptori za prepoznavanje uzorka (engl. *Pattern Recognition Receptor*)

RA – reumatoidni artritis

SCFA – kratkolančane masne kiseline (engl. *Short-Chain Fatty Acids*)

SPF – *Specific Pathogen Free*

TPN – potpuna parenteralna prehrana (engl. *Total Parenteral Nutrition*)

Treg – regulacijski limfociti T

UC – ulcerozni kolitis (engl. *Ulcerative Colitis*)

VRE – na vankomicin rezistentan enterokok (engl. *Vancomycin Resistant Enterococcus*)

# Sadržaj

SAŽETAK

SUMMARY

1. UVOD.....	1
2. CRIJEVNA MIKROBIOTA .....	2
2.1. RAZVOJ I SASTAV.....	3
2.2. ULOGE U ODRŽAVANJU HOMEOSTAZE GASTROINTESTINALNOG SUSTAVA ...	5
2.2.1. IMUNOMODULACIJA.....	6
2.2.2. ZAŠTITA OD PATOGENA.....	8
2.2.3. OČUVANJE STRUKTURE GASTROINTESTINALNOG TRAKTA .....	8
2.2.4. METABOLIZAM DOMAĆINA.....	9
3. CRIJEVNA MIKROBIOTA U HEMATOLOŠKIM BOLESTIMA .....	10
3.1. APLASTIČNA ANEMIJA .....	11
3.2. ZLOĆUDNE BOLESTI.....	13
4. CRIJEVNA MIKROBIOTA U ALOGENIČNOJ TRANSPLANTACIJI KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA.....	15
4.1. UTJECAJ ALO-TKMS-a NA CRIJEVNU MIKROBIOTU .....	17
4.1.1. PRETRANSPLANTACIJSKO KONDICIONIRANJE I DISBIOZA .....	17
4.1.2. DISBIOZA UZROKOVANA PREHRANOM .....	20
4.1.3. DISBIOZA UZROKOVANA ANTIBIOTICIMA.....	21
4.1.4. UTJECAJ GvHD-a NA CRIJEVNU MIKROBIOTU .....	24
4.2. UTJECAJ CRIJEVNE MIKROBIOTE NA POSTTRANSPLANTACIJSKE KOMPLIKACIJE.....	27
4.2.1. GVHD.....	28
4.2.2. INFEKCIJE .....	31
4.2.3. PLUĆNE KOMPLIKACIJE .....	35
4.2.4. RELAPS .....	36
5. MODIFIKACIJA MIKROBIOTE NAKON ALO-TKMS-a .....	38
5.1. ANTIBIOTICI.....	38
5.2. PREBIOTICI .....	39
5.3. PROBIOTICI I TRANSPLANTACIJA FEKALNE MIKROBIOTE.....	40
5.4. POSTBIOTICI .....	42
6. ZAKLJUČAK.....	43
7. ZAHVALE.....	44
8. LITERATURA .....	45
9. ŽIVOTOPIS .....	60

## SAŽETAK

### Uloga crijevne mikrobiote u alogeničnoj transplantaciji krvotvornih matičnih stanica

Mihaela Benčić

Crijevna mikrobiota pojam je koji se odnosi na raznoliku zajednicu velikog broja mikroorganizama smještenih u probavnom sustavu čovjeka. Domaćin i mikrobiota sudionici su složene i dinamične simbioze koja u ravnotežnom stanju mikrobnog ekosustava, poznatom kao eubioza, pruža niz povoljnih učinaka za oba simbionta. Ljudski probavni sustav, sa svim svojim biotičkim i abiotičkim čimbenicima, osigurava optimalne uvjete za naseljavanje, razmnožavanje i opstanak mikrobiote. Zauzvrat, crijevna mikrobiota sudjeluje u metabolizmu svog domaćina, štiti ga od patogenih mikroorganizama, sudjeluje u razvoju i očuvanju barijere probavnog sustava te koordinira razvoj i oblikovanje njegovog imunološkog sustava. U disbiozi, kao stanju narušene ravnoteže mikrobiote, domaćin postaje osjetljiv na mnoštvo bolesti različitih organskih sustava. Najbolje proučena uloga mikrobiote u hematologiji je ona u alogeničnoj transplantaciji krvotvornih matičnih stanica (alo-TKMS). Disbioza je česta pojava u hematoloških bolesnika koji se liječe s alo-TKMS-om, a nastaje kombinacijom pretransplantacijske kemoterapijske pripreme, primjene antibiotika širokog spektra, promjena u prehrani i bolesti presatka protiv primatelja (engl. *Graft-versus-Host-Disease*, GvHD). Otkriće novih metoda sekvenciranja unaprijedilo je naše razumijevanje sastava i funkcije crijevne mikrobiote i rezultiralo dokazima o utjecaju disbioze na razvoj posttransplantacijskih komplikacija, poput GvHD-a, infekcija, plućnih komplikacija i relapsa. Gubitak raznolikosti crijevne mikrobiote identificiran je i kao neovisan prediktor mortaliteta nakon alo-TKMS-a. Pronalazak povezanosti između disbioze i ishoda liječenja s alo-TKMS-om, potaknuo je i primjenu intervencijskih postupaka, poput prebiotika, probiotika i transplantacije fekalne mikrobiote (engl. *Fecal Microbiota Transplantation*, FMT) te postbiotika, kojima se sastav crijevne mikrobiote pokušava vratiti u svoje ravnotežno stanje.

Ključne riječi: crijevna mikrobiota, disbioza, alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica, *Graft-versus-Host-Disease*, transplantacija fekalne mikrobiote

## SUMMARY

### **The role of intestinal microbiota in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation**

**Mihaela Benčić**

The intestinal microbiota is a term referring to the diverse community of a large number of microbes located in the human digestive system. Host and microbiota are participants of complex and dynamic symbiosis that in the balanced state of a microbial ecosystem, known as eubiosis, provide many beneficial effects for both symbionts. The human digestive system, with all of its biotic and abiotic factors, enables optimal conditions for colonization, reproduction, and survival of the microbiota. In turn, the intestinal microbiota participates in the metabolism of its host, protects him from pathogenic microorganisms, participates in the development and maintenance of the barrier of the digestive system, and coordinates the development and shaping of his immune system. In dysbiosis, which is a state of disrupted intestinal microbiota, the host becomes susceptible to many diseases of different organ systems. The best-studied role of the intestinal microbiota in hematology is one in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). Dysbiosis is common in hematological patients treated with allo-HSCT due to a combination of pre-transplant chemotherapy, administration of broad-spectrum, dietary changes, and *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD). The discovery of new sequencing methods has improved our understanding of the composition and function of the intestinal microbiota and resulted in evidence of the dysbiosis impact on the development of post-transplant complications, such as GvHD, infections, pulmonary complications, and relapse. Loss of microbial diversity has been identified as an independent predictor of allo-HSCT mortality. Finding an association between dysbiosis and allo-HSCT outcomes, enabled the application of interventional procedures, such as the use of prebiotics, probiotics, fecal microbiota transplantation (FMT), and postbiotics, which try to return the intestinal microbiota to its equilibrium state.

Key words: intestinal microbiota, dysbiosis, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, graft-vs-host disease, fecal microbiota transplantation

# 1. UVOD

„Sve bolesti počinju u crijevima“, Hipokratova je izjava stara 2500 godina (1), a ista je predmet brojnih istraživanja modernog znanstvenog doba. Svaki višestanični organizam, pa tako i čovjek, u bliskom je kontaktu s velikim brojem oku nevidljivih organizama poput bakterija, arheja, virusa te jednostaničnih eukarija ili pojednostavljeno, mikrobiotom (2). Prijašnja znanstvena istraživanja bila su usmjerena na prepoznavanje mehanizama te uloga pojedinih gastrointestinalnih patogena u kontekstu infektivnih bolesti no, zahvaljujući razvoju novih molekularnih tehnologija kojima preciznije možemo okarakterizirati mikrobiotu, sve više istraživanja naglašava utjecaj čitave zajednice nepatogenih, komenzalnih mikroorganizama na razvoj bolesti. Budući da mikrobiota većinski naseljava one površine ljudskog organizma koje su u bliskom odnosu s vanjskom okolinom, logično je kako je sluznica gastrointestinalnog sustava, sa svojom površinom veličine  $200\text{m}^2$  (3), dom najraznovrsnije i najbrojnije mikrobiote. Čovjek, kao domaćin mikrobiote, uživa brojne pogodnosti pa tako ne čude novije hipoteze o tome kako se adaptivni imunološki sustav, sa svojim ključnim karakteristikama, poput antigenske specifičnosti i sposobnosti imunološkog pamćenja, razvio upravo kako bi različitim mehanizmima imunotolerancije omogućio kolonizaciju velikog broja raznovrsnih komenzala (4). Evolucijski bi takva sposobnost predstavljala značajnu prednost u preživljavanju domaćina. Crijevnu mikrobiotu, zbog svojih brojnih i vitalnih uloga u održavanju homeostaze, često nazivaju zaboravljenim organom (5). U fiziološkim uvjetima mikrobiota se nalazi u eubiozi što podrazumijeva ravnotežno stanje mikrobnog ekosustava. Značajke eubioze su raznolikost sastava te očuvano funkcioniranje na molekularnoj razini uz osiguravanje zaštite od različitih štetnih događaja, a ukoliko isti nastupe, eubioza osigurava adekvatan oporavak. Pod utjecajem brojnih vanjskih, ali i unutarnjih čimbenika može doći do narušavanja ravnoteže mikrobnog ekosustava, odnosno disbioze. Disbiozu prate promjene u sastavu mikrobiote kao što su smanjen broj komenzalnih mikroorganizama, povećana brojnost patogena te gubitak raznolikosti cjelokupne mikrobiote (6). U stanju narušene homeostaze, suživot s mikrobiotom domaćinu više ne donosi brojne pogodnosti, čak suprotno, takva disbioza okidač je brojnih crijevnih, ali i sistemskih poremećaja. U prilog tome



govore i istraživanja koja su u središte patogenetskih mehanizama velikog broja dobroćudnih, ali i zloćudnih bolesti postavile upravo disbiozu. Najiscrpnije je istražena uloga mikrobiote u bolestima poput upalnih bolesti crijeva, alergija i pretilosti (6–8).

Cilj ovoga rada je dati pregled dosadašnjih istraživanja vezanih uz ulogu crijevne mikrobiote u patogenezi hematoloških poremećaja, s naglaskom na ulogu u alo-TKMS-u. U prvom dijelu rada predstavljene su značajke crijevne mikrobiote, od njenog razvoja do oblikovanja stabilnog sustava, te najvažnije uloge kojima ulazi u interakciju s domaćinom, sudjelujući u složenom i dinamičnom održavanju homeostaze probavnog sustava. Poznavanje mehanizama komunikacije među simbiotima preduvjet je za razumijevanje uloge disbioze u patogenezi bolesti, pa se sljedeća cjelina rada bavi utjecajem mikrobiote na razvoj i tijek dobroćudnih hematoloških poremećaja, a potom i učinkom na zloćudna stanja poput limfoma, multiplog mijeloma i leukemija. Središnji dio rada pruža uvid u povezanost mikrobiote i alo-TKMS-a, naglašavajući utjecaj na razvoj njenih komplikacija, poput infekcija i GvHD-a, te opisuje dinamične promjene kroz koje prolazi crijevna mikrobiota bolesnika podvrgnutih ovom obliku liječenja. Pronalaženje poveznice između mikrobiote i alo-TKMS-a otvara vrata i novim intervencijskim postupcima koji imaju ulogu u ponovnom uspostavljanju normalne mikrobiote, a predstavljeni su u završnom dijelu rada.

## 2. CRIJEVNA MIKROBIOTA

Ljudski organizam i njegova mikrobiota žive u dinamičnoj i složenoj simbiozi koja je rezultat koevolucije stare gotovo pola milijarde godina (9). U stanju ravnoteže, odnos među simbiotima karakterizira komenzalizam, suživot u kojemu jedan član uživa pogodnosti dok na drugog isti ne ostavlja nikakav utjecaj, ili čak mutualizam od kojega oba člana imaju koristi. Ljudska mikrobiota pojam je koji se odnosi na skup mikroorganizama koji koloniziraju nekoliko različitih ekoloških niša u čovjeku, a najbrojnija među njima je mikrobiota probavnog sustava (crijevna mikrobiota). Procijenjeno je da broj mikroorganizama nadmašuje sveukupni broj zametnih te somatskih ljudskih stanica za 10 puta, što sugerira brojnost ljudske mikrobiote u

iznosu od čak 100 trilijuna jedinki (10). Također, metagenom mikrobiote, kao zbirka genoma i gena njenih članova, sadrži 2 do 20 milijuna gena, u odnosu na ljudski genom koji broji svega 20 000 gena (11). Velika većina tih mikroorganizama stupa u interakciju s domaćinom upravo na sluzničnim površinama probavnog sustava.

Nove spoznaje vezane uz sastav i ulogu crijevne mikrobiote, kako u zdravlju tako i u bolesti, nastale su kao posljedica razvoja modernih molekularnih tehnologija, budući da se tradicionalnim metodama temeljenim na kultivaciji uspijevalo izolirati tek 10-50% crijevne mikrobiote (12). Moderne biološke metode temelje se na DNA sekvenciranju te amplifikaciji i analizi 16S rRNA gena, koji se zbog svog visokog stupnja očuvanosti nalazi u svim prokariotima i omogućuje njihovu detekciju, a s druge strane, međusobno razlikovanje bakterija olakšano je prisutnošću hipervarijabilnih regija unutar gena (13). Također, razvojem disciplina poput metagenomike, koja podrazumijeva *shotgun sequencing* s ciljem okarakteriziranja sastava kao i funkcionalnog kapaciteta mikroskopskih zajednica živih organizama (14), otkrivene su brojne funkcije crijevne mikrobiote kao i mehanizmi interakcije s ljudskim organizmom. Sve navedeno rezultiralo je velikim napretkom u razumijevanju patofiziologije brojnih bolesti kao i pronalaženjem različitih metoda mijenjanja mikrobiote, kao jedne od mogućih terapijskih intervencija.

## 2.1. RAZVOJ I SASTAV

Iako je danas poznato da mekonij sadrži određene mikroorganizme i nije sterilan (15), dominantni kontakt s majčinom mikrobiotom, kao čimbenikom koji najviše doprinosi razvoju mikrobiote novorođenčeta, događa se tek tijekom poroda. Vrsta poroda jedan je od ključnih čimbenika koji određuje početni sastav mikrobiote. U skladu s tim, u slučaju poroda dovršenog prirodnim putem, početni kolonizatori, poput *Lactobacillus* te *Bifidobacterium* spp., odgovaraju majčinoj vaginalnoj mikrobioti, dok je mikrobiota kože izvor početne kolonizacije u djece rođene carskim rezom (16). Zanimljiva je činjenica da bez obzira na kasnije izjednačavanje sastava mikrobiote među novorođenčadi rođenim prirodnim putem, odnosno carskim rezom, porođaji dovršeni carskim rezom pokazuju pozitivnu povezanost s razvojem atopijskih i alergijskih bolesti, sugerirajući važnost početnih kolonizatora u oblikovanju i sazrijevanju imunološkog sustava

(17). Ranu crijevnu mikrobiotu oblikuju i dojenjem prenesene biološki aktivne sastavnice imunološkog sustava, poput antimikrobnih peptida (AMP) te IgA protutijela, na čiju su specifičnost utjecali komenzalni mikroorganizmi probavnog sustava majke, predstavljajući tako vertikalni prijenos imunološkog pamćenja s majke na dijete. Crijevna mikrobiota novorođenčadi intenzivno se oblikuje u prvim mjesecima života u kojima se znatno razlikuje po raznolikosti sastava od onih odraslih. Nakon navršene 2. godine života, mikrobiota postaje stabilna te nalikuje na mikrobiotu odraslog čovjeka (18).

Postoje velike razlike u sastavu mikrobiote među pojedincima, dijeleći međusobno tek 10-15% sličnosti. Određeno filogenetsko preklapanje postoji među mikrobiotom srodnika, a posebice među monozigotnim blizancima te pripadnicima iste etničke skupine i rase. Ipak, istraživanja koja uspoređuju raznolikost mikrobiote monozigotnih blizanaca, pokazuju kako se iste podudaraju u manje od 50% filotipova (19), sugerirajući veliki utjecaj okolišnih čimbenika. Od čimbenika okoliša, značajnim razlikama najviše doprinosi tip prehrane, antimikrobno liječenje, crijevne upale kao i klimatski čimbenici različitih geografskih podneblja. Razlike u sastavu mikrobiote većinski se očituju na razini taksonomskih kategorija vrsta i rodova, dok su prevladavajuća koljena većine zdravih pojedinaca vrlo slična. Bez obzira na različitost sastava mikrobiote, njihov funkcionalni kapacitet ne razlikuje se među zdravim pojedincima (20).

Procijenjeno je da 70% ukupne ljudske mikrobiote naseljava sluznicu te lumen probavne cijevi. Za veliku gustoću naseljenosti gastrointestinalnog trakta (GIT-a) zaslužna je njegova veličina koja odgovara dimenzijama teniskog terena, ali i brojne nutritivne karakteristike koje stvaraju optimalan mikrookoliš za komenzalne mikroorganizme. Složeni ekosustav GIT-a dom je mikroorganizama iz svih triju domena: *Bacteria*, *Archaea* i *Eukarya*, a većinu metagenoma čine geni bakterija koje brojčano i funkcionalno prevladavaju (11). Stoga će u nastavku pojam mikrobiota podrazumijevati domenu bakterija. Broj različitih bakterijskih vrsta u crijevima u većini istraživanja kreće se oko 1000, iako ona novija navode moguću veličinu od 35 000 vrsta (21). Zahvaljujući specifičnosti mikrookoliša različitih dijelova probavnog sustava, postoje velike prostorne i vremenske razlike u naseljavanju mikrobiotom unutar istih. Utvrđeno je postojanje gradijenta gustoće

naseljenosti bakterija, usmjerenog prema distalno smještenim dijelovima probavnog sustava, pa tako gustoća naseljenosti raste s  $10^1$ - $10^3$  u želudcu na  $10^{12}$  bakterijskih stanica po gramu u kolonu (5). Razlog smanjenoj kolonizaciji u proksimalnom dijelu GIT-a leži u kemijskom sastavu želučane kiseline, sokova gušterače te žuči. Mikrobiotu tankog crijeva većinski čine bakterije roda *Vellionella* i *Clostridium*, a njihov sastav pokazuje vremenske promjene ovisno o dobu dana, odnosno unosu različitih hranjivih tvari. Osim nejednakosti unutar uzdužne, opisane su i razlike u naseljenosti bakterija duž poprečne osi, razlikujući bakterije unutar lumena probavne cijevi od onih prijanjajućih uz površinu same sluznice. Sukladno najvećoj gustoći naseljenosti bakterija u distalnom dijelu crijeva, pojam crijevna mikrobiota odnosi se na zajednicu oku nevidljivih organizama iz svih triju domena živog svijeta koja živi sa svojim domaćinom u stanju mutualizma ili komenzalizma, a prebiva u području kolona. Od 70 prisutnih koljena, daleko najveći broj bakterija pripada *Firmicutes* i *Bacteroidetes* koje po zastupljenosti slijede *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* s rodnom *Bifidobacterium* te *Proteobacteria*. Kada govorimo o odnosu organizma prema kisiku, u crijevima su fakultativni anaerobi brojčano nadmašeni obligatnim anaerobnim organizmima, za čiji je rast kisik nepotreban, štoviše i štetan (22).

## 2.2. ULOGE U ODRŽAVANJU HOMEOSTAZE GASTROINTESTINALNOG SUSTAVA

Složeni mikrobní ekosustav doprinosi homeostazi GIT-a svojim utjecajem na metabolizam domaćina, pružanjem zaštite od patogena, čuvanjem integriteta crijevne barijere i strukture GIT-a te učincima na funkciju imunomodulacije (20).

Većina spomenutih uloga ostvaruje se interakcijom molekularnih uzoraka povezanih s mikroorganizmima (engl. *Microbe-Associated Molecular Patterns*, MAMP) s tzv. receptorima za prepoznavanje uzorka (engl. *Pattern Recognition Receptors*, PRR), lokaliziranim na stanicama urođene imunosti te crijevnim epitelnim stanicama. Posljedica vezanja liganda za PRR-ove je aktivacija unutarstaničnog signalnog puta posredovanog nuklearnim faktorom  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) koji, djelujući kao čimbenik transkripcije, potiče izražaj gena čiji kodirajući proizvodi reguliraju imunološki odgovor.

### 2.2.1. IMUNOMODULACIJA

Ovisno o specifičnim zahtjevima i uvjetima određenih anatomskih područja u organizmu, imunološki sustav sposoban je morfološki i funkcionalno prilagoditi se istima kako bi odgovorio na navedene zahtjeve. Lokalni imunološki sustav na epitelnim površinama GIT-a izložen je posebno zahtjevnim izazovima. Naime, on mora istovremeno tolerirati sveprisutne luminalne komenzale, inhibirati alergijske odgovore na alergene iz hrane, a u slučaju pojave patogenih bakterija mora pokrenuti adekvatnu imunoreakciju (20). Takva prilagodba imunološkog sustava rezultat je dugotrajne koevolucije kralježnjaka i njegove mikrobiote koja je kulminirala međusobnim oblikovanjima tolerogenog repertoara imunoloških stanica i sastava mikrobiote. Tolerancija, definirana kao izostanak imunološkog odgovora na bezopasnu mikrobiotu i njene proizvode, jedan je od ključnih obrambenih mehanizama lokalnog imunološkog sustava, nužan za sprječavanje bespotrebnih, pretjeranih imunoreakcija u stanju odsutnosti patogena. Potrebno je napomenuti kako crijevna mikrobiota nije u svakoj situaciji bezopasna pa u stanjima koja kompromitiraju sposobnost domaćina u ograničavanju prijelaza mikroorganizama iz lumena u sistemsku cirkulaciju može ozbiljno ugroziti svog simbionta, oponašajući tako patogene.

Crijevna mikrobiota znatno doprinosi razvoju imunološkog sustava GIT-a što potvrđuju istraživanja provedena na gnotobiotičkim, akseničnim pokusnim miševima lišenim mikrobnog ekosustava (engl. *Germ-Free*, GF). Koncept u kojemu se uspoređuju morfološke i funkcionalne karakteristike među GF miševima te onim koloniziranim specifičnom mikrobiotom slobodnom od patogena (engl. *Specific Pathogen Free*, SPF) omogućio je razumijevanje kako imunomodulacijskih, tako i ostalih učinaka mikrobiote. U usporedbi sa SPF, GF miševi sadrže manji broj te raznolikost staničnih populacija limfnog tkiva GIT-a, uvećan cekum (zbog akumulacije nerazgrađenog sloja sluzi), jedinstven izgled epitelnog sloja s karakterističnim dugim i tankim crijevnim resicama i kraćim kriptama, smanjen gastrointestinalni motilitet, smanjenu površinu sluznice ali i brojne druge nepravilnosti koje upućuju na vrlo važnu ulogu mikrobiote u strukturnom, ali i funkcionalnom sazrijevanju imunološkog sustava (23).

Postizanje tolerancije prema mikrobioti zahtijeva različite prilagodbe unutar domaćina te komenzalnih mikroorganizama, poput fizičkog razdvajanja mikrobiote i stanica domaćina, promjena antigena mikrobiote čime se smanjuje njihova imunogenost te usmjeravanje lokalnog i sistemskog imunološkog odgovora prema imunosupresiji (20). Fizičko razdvajanje simbionata ostvaruje se postojanjem sluzne, dvoslojne zapreke koja oblaže epitel crijevne stijenke, a čine ju glikozilirane bjelančevine mucina sintetiziranih u vrčastim stanicama crijevnog epitela. U proizvodnji mucina sudjeluje i crijevna mikrobiota, što potvrđuju i GF miševi koji, u odnosu na SPF miševe, posjeduju izmijenjen izgled epitelne zapreke s tankim slojem sluzi (23). Također, unos bakterija *Faecalibacterium prausnitzii* i *Bacteroides thetaiotaomicron* u aksenične miševe, rezultirao je diferencijacijom i umnažanjem vrčastih stanica, a posljedično i povećanom proizvodnjom mucina (24). Dodatna strategija kojom mucinozni sloj sprječava prodor mikrobiote odvija se putem AMP-ova, sintetiziranih u Panethovim stanicama. Njihovu sintezu i lučenje također regulira crijevna mikrobiota (25).

Najiscrpnije istraženi mehanizmi stjecanja tolerancije tiču se oblikovanja imunološkog odgovora. Brojne sastavnice mikrobiote, kao i njeni metaboliti, odlikuju se protuupalnim i imunosupresivnim učincima kojima nastoje izbjeći aktivaciju imunoreakcije. Takvi ciljevi potpuno su logični budući da je mikrobiota u crijevima pronašla medij koji, sa svim svojim biotičkim i abiotičkim čimbenicima, podupire njen rast, razvoj i razmnožavanje. Primjerice, bakterije *Bacteroides* i *Lactobacillus* spp. sposobne su inaktivirati NF- $\kappa$ B čime se sprječava pokretanje upalnog odgovora (26). Nadalje, stanje eubioze karakterizira jedinstven profil citokina koji je zaslužan za pojavu tolerogenog fenotipa imunoloških stanica GIT-a, poput makrofaga i dendritičkih stanica (engl. *Dendritic Cells*, DC) (27). S druge strane, u disbiozi se imunotolerantni okoliš, pod utjecajem citokina IL-1 i IL-6, mijenja u proupalni. Tolerogene DC potiču stvaranje regulacijskih limfocita T (Treg) (28) koji se ističu lučenjem imunosupresivnog citokina IL-10 (29). Njegova proizvodnja potaknuta je i butiratom, metabolitom mikrobiote s dokazanim imunomodulatornim ulogama (30). S obzirom na sve navedeno, razna upalna stanja GIT-a praćena su crijevnom disbiozom, a posebice manjkom bakterija koje proizvode butirat, o čemu će biti više govora kasnije.

## 2.2.2. ZAŠTITA OD PATOGENA

Crijevna mikrobiota, kao naš mutualistički ili komenzalni partner, u neprestanoj je evolucijskoj borbi s patogenim mikroorganizmima koja se odvija duž GIT-a čovjeka. Ukoliko se mikrobiota nalazi u eubiozi tada ona odnosi pobjedu nad patogenima. „Oružja“ kojima raspolažu komenzali su ograničavanje slobodnih mjesta za prijanjanje na sluznicu crijeva i iskorištavanje hranjivih tvari, kao izvora energije, s ciljem sprječavanja kolonizacije, razmnožavanja i širenja patogena (20). Danas je poznato kako je preduvjet za nastanak infekcije upravo adhezija patogena na stanične površine, zbog čega su autohtoni mikroorganizmi domaćinu od iznimne važnosti. Oni se udružuju u zajednice koje, formirajući biofilm, predstavljaju prepreku za prodor patogena. Osim spomenutih bakteriostatskih mehanizama, vrlo bitan alat u borbi protiv štetnih mikroba su i AMP-ovi, poput defenzina, lizozima, katelicidina i lektina tipa C, koji narušavanjem cjelovitosti površinskih struktura mikroorganizama ostvaruju svoj baktericidni učinak. Komunikacija među navedenim peptidima i mikrobiote dvosmjerna je pa su se s jedne strane peptidi nametnuli kao glavni regulatori sastava i brojnosti mikrobiote, dok su s druge strane upravo različite sastavnice i metaboliti mikrobiote odgovorni za poticaj njihova izlučivanja. López-Boado i sur. demonstrirali su pozitivnu povezanost između bakterija i matrilizina, enzima iz porodice matriks metaloproteinaza, zaduženog za proteolitičko cijepanje zimogena prodefenzina u njegov aktivni oblik defenzin (31). Mišje i ljudsko epitelno tkivo izlagalo se visokim razinama bakterije *B.thetaiotaomicron* što je kulminiralo pojačanom razinom matrilizina, a samim time i defenzina. Nadalje, mliječna kiselina, kao proizvod sinteze različitih članova roda *Lactobacillus*, stvara neprijateljski okoliš karakteriziran niskim pH, a uz to potencira i antimikrobnu aktivnost lizozima koji remeti strukturu vanjske membrane gram-negativnih bakterija i tako doprinosi dodatnoj zaštiti od patogena (32).

## 2.2.3. OČUVANJE STRUKTURE GASTROINTESTINALNOG TRAKTA

Uspoređujući strukturu GIT-a među GF i SPF miševima, dokazalo se postojanje uloge mikrobiote u pravilnom razvoju sluznice crijeva, kao osnovnim preduvjetom za obavljanje njene glavne funkcije, a to je apsorpcija hranjivih tvari. Crijevne

epitelne stanice GF miša posjeduju vrlo tanke i kratke crijevne resice i shodno tome smanjenu površinu sluznice, što sugerira važnost mikrobiote u obnovi i poticanju umnažanja stanica. Bakterija *L. rhamnosus* GG sposobna je skratiti trajanje staničnog ciklusa te povećati broj mitozu u miša monokoloniziranog navedenom bakterijom (33). Isti simbiot sintetizira i dva topljiva proteina p40 i p75 čija je uloga spriječiti citokinima-potaknutu apoptozu crijevnih epitelnih stanica i tako zaštititi crijevo od posljedica štetne nokse (34). Članovi mikrobiote zaslužni su i za formiranje kapilarne crijevne mreže kroz koju se vrši apsorpcija hranjivih tvari iz lumena u sistemska cirkulaciju. Jedan od tih članova je *B. thetaiotaomicron*, bakterija s mikrovaskulatomnim potencijalom kojeg ostvaruje poticanjem izražaja gena i posljedično kodiranjem za transkripcijski faktor s angiogenom aktivnošću, nazvan angiogenin-3 (35). Također, postoje dokazi da mikrobiota sudjeluje u održavanju strukturne barijere GIT-a, i to djelovanjem na međustanične spojeve poput dezmosoma čime se smanjuje propusnost crijeva i čuva cjelovitost sluznice. Konkretno, bakterija *B. thetaiotaomicron*, između ostaloga, sintetizira i mali protein bogat prolinom (od engl. *small proline-rich protein 2A*), nužan za urednu funkciju dezmosoma (36).

Navedeno pokazuje da je zdrava crijevna mikrobiota bitan čimbenik u očuvanju strukture GIT-a čime ujedno stvara i preduvjet za njegovo normalno funkcioniranje. Stoga, bilo kakva disbioza može rezultirati i/ili pogoršati ozljedu crijeva sa svim svojim kliničkim posljedicama.

#### 2.2.4. METABOLIZAM DOMAĆINA

Raznolika crijevna mikrobiota, u odnosu na domaćina, posjeduje znatno širi repertoar gena što joj omogućuje obavljanje niza funkcija koje su čovjeku inače nedostupne. Budući da određena skupina gena kodira enzime koji sudjeluju u metabolizmu različitih hranjivih tvari, mikrobiota uvelike utječe i na cjelokupni metabolizam domaćina. Temelj otkrivanju metaboličkog doprinosa crijevne mikrobiote ponovno su dala istraživanja na GF miševima kojima se pokazalo da je miševima bez mikroorganizama, u usporedbi s onim konvencionalno uzgojenim, potreban znatno veći kalorijski unos kako bi održali istu tjelesnu težinu (20). Načini kojima mikrobiota povećava kalorijsku dostupnost podrazumijevaju razgradnju



inače neprobavljivih oligosaharida, čime se stvara dodatan izvor energije za domaćina, ali i poticanje unosa i iskoristivosti unesenih hranjivih tvari putem mijenjanja apsorptivnih karakteristika crijevnog epitela (20). Primjerice, crijevna mikrobiota zaslužna je za anaerobnu fermentaciju složenih ugljikohidrata iz hrane, čiji je rezultat proizvodnja metabolita, među kojima se, po svojoj značajnosti za zdravlje domaćina, posebice ističu SCFA (engl. *Short-Chain Fatty acids*, SCFA). Osim u metabolizmu ugljikohidrata, mikrobiota sudjeluje i u regulaciji metaboličkih procesa vezanih uz lipide tako što povećava unos masnih kiselina u masno tkivo, a bakterija *B.thetaiotaomicron* aktivira i kolipazu čime sudjeluje u hidrolizi lipida (36). Ostale metaboličke funkcije mikrobiote uključuju biosintezu esencijalnih molekula poput vitamina K i niza vitamina B, razgradnju polifenola, dekonjugaciju primarnih žučnih kiselina u one sekundarne, a osim toga, mikrobiota utječe i na metabolizam lijekova i ksenobiotika (37).

### 3. CRIJEVNA MIKROBIOTA U HEMATOLOŠKIM BOLESTIMA

U etiopatogenetske faktore većine dobroćudnih te zloćudnih bolesti hematološkog sustava ubrajamo niz okolišnih čimbenika koji se karakteristično mogu podijeliti na fizikalne, kemijske i one biološke. Biološki čimbenici podrazumijevaju različite mikroorganizme koji na sebi svojstven način mogu služiti kao okidač za hematološke poremećaje. Primjerice, pojedine leukemije i limfomi povezuju se s virusom hepatitisa C ili Epstein-Barr virusom (EBV), dok se aplastična anemija (AA) dovodi u svezu s Parvovirusom B19 (38). Dok je uloga specifičnih patogenih mikroorganizama u onkogenezi zloćudnih, ali i nastanku dobroćudnih hematoloških bolesti poput AA, već dobro razjašnjena, uloga čitavog crijevnog mikrobnog ekosustava u razvoju istih ostaje još nepoznanica. Ipak, imajući na umu dokazanu ulogu crijevne mikrobiote u patogenezi različitih autoimunih, upalnih, tumorskih te infektivnih bolesti drugih organskih sustava (20), nije nelogično tragati za postojanjem povezanosti i s poremećajima hematološkog sustava. Do danas je najjasnije razjašnjena uloga mikrobiote u kontekstu alo-TKMS-a, što je ujedno i glavna tema ovoga rada. Ipak, otkrićem postojanja izvancrijevnih funkcija mikrobiote, poput regulacije hematopoeze (39), sve se više sazna je i o njenoj ulozi

u patogenezi hematoloških bolesti. Kada govorimo o crijevnoj mikrobioti kao jednom od etiopatogenetskih činitelja bolesti, tada mislimo na zajednicu mikroorganizama čiji sastav, a potom i funkcionalni kapacitet odstupaju od mikrobiote zdravog pojedinca. Naime, ukoliko se sastav crijevne mikrobiote nalazi u ravnotežnom, odnosno eubiotičnom stanju, tada će domaćin profitirati od suživota sa svojim mikrobnim simbiontom. S druge strane, naruši li se ravnoteža mikrobiote, uslijed međudjelovanja domaćinovitih predisponirajućih te okolišnih čimbenika, doći će do disbioze koja potom može doprinijeti razvoju hematoloških neoplazmi ili autoimunih poremećaja. Osnovni razlog tome je gubitak vitalnih funkcija mikrobiote, poput utjecaja na razvoj i oblikovanje specifične i nespecifične imunosti, čime se gubi kontrola nad imunološkim sustavom i predisponira razvoj imunološki posredovanih bolesti. Važno je napomenuti da i liječenje hematoloških bolesti (kemoterapija, imunoterapija) vrlo često doprinosi daljnjoj disbiozi i tako neizravno pogoduje njihovom napredovanju (38).

### 3.1. APLASTIČNA ANEMIJA

Stečena aplastična anemija (AA) ozbiljna je hematološka bolest koja je karakterizirana zatajenjem koštane srži i posljedičnom pancitopenijom u perifernoj krvi, uz hipocelularnost te odsutnost patoloških infiltrata ili fibroznih promjena unutar koštane srži (40). Jasna patogeneza nije posve poznata, ali kao uvriježeno mišljenje o prirodi nastanka bolesti navodi se nepravilnost imunološkog sustava koja rezultira autoimunim napadom na matične i progenitorne stanice koštane srži te onemogućava proces hematopoeze. Da se u pozadini nastanka bolesti nalazi imunološki posredovan mehanizam potvrđuje i uredan odgovor na imunosupresivnu terapiju praćen oporavkom krvne slike (40). Poremećaj imunološkog sustava u AA očituje se manjim ili većim odstupanjima u broju i funkciji gotovo svih imunoloških stanica, a predominantno podrazumijeva povećanu zastupljenost CD8<sup>+</sup> citotoksičnih limfocita T te CD4<sup>+</sup> limfocita T poput Th1 i Th17, odnosno smanjenje populacije Treg. Sve to prati i povećana razina proupalnih citokina TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i TGF- $\beta$  koji su sposobni potaknuti apoptozu stanica koštane srži (41). Ipak, treba napomenuti da je za razvoj bolesti nužna i nasljedna sklonost zatajenju koštane srži.

Crijevna mikrobiota, kao jedan od ključnih regulatora razvoja i funkcije lokalnog, ali i sistemskog imunološkog sustava, svakako može biti barem djelomično odgovorna za različite imunološke nepravilnosti među kojima su i autoimune bolesti. Uistinu, disbioza crijevne mikrobiote ima ulogu u nastanku ulceroznog kolitisa (engl. *Ulcerative Colitis*, UC), reumatoidnog artritisa (RA), dijabetesa tipa 1 kao i sistemskog eritematoznog lupusa što su sve odreda autoimuni poremećaji (42). U sterilnim uvjetima, kakve pronalazimo u GF životinjskim modelima, do istih niti ne dolazi ili se pojavljuju, ali u znatno blažem obliku (43). Zanimljivo je da pojavu UC-a ponekad prati i razvoj AA, ukazujući na moguću ulogu disbioze i u njenom nastanku (42). Pretpostavljeni mehanizmi, kojima bi disbioza mogla potaknuti AA u genetski sklonog pojedinca, podrazumijevaju stvaranje imunogenih peptida te narušavanje Th17/Treg ravnoteže (42). Prijelaz peptida iz autolognih u one imunogene, koje će organizam opaziti kao strane, može biti ostvaren procesima molekularne mimikrije, karakteriziranih promjenama sastavnica mikrobiote sa svrhom postizanja sličnosti onim domaćinovima, odnosno procesima posttranslacijske modifikacije bjelančevina domaćina te stvaranja neo-epitopa, kao posljedica djelovanja enzima disbiotične mikrobiote (44). Primjerice, u RA autoantigeni nastaju djelovanjem enzima peptidil-arginin deaminaze koji potječe od bakterije *Porphyromonas gingivalis* (45). Osim stvaranja autoantigena, disbioza doprinosi i promijenjenom repertoaru imunoloških stanica. Dok komenzalne bakterije, unutar stabilnih mikrobiota zdravih pojedinaca, održavaju tolerogeni fenotip DC-a i makrofaga uz visoku razinu Treg, narušena ravnoteža mikrobnog ekosustava uzrokuje diferencijaciju i porast Th17 stanica koje, osim što igraju važnu ulogu u borbi protiv patogena, doprinose i razvoju autoimunosti (46). U krvi bolesnika s AA, analiziranih u nekoliko istraživanja, uistinu je nađena povećana razina Th17 uz pad Treg, ukazujući na obrnut odnos između navedenih linija CD4<sup>+</sup> limfocita (41). Niska razina Treg svakako može biti posljedica gubitka bakterija koje proizvode SCFA (poput *Clostridia*) i time potiču njihovu diferencijaciju i sazrijevanje. Dakle, smatra se da disbiozom proizvedeni imunogeni peptidi uz citokin IL-17, kao proizvod stanica Th17, mogu potaknuti stvaranje autoantitijela koja cirkulirajući u koštanoj srži potiču mononuklearne stanice na otpuštanje mijelosupresivnih citokina (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) i tako dovode do apoptoze krvotvornih matičnih te progenitornih stanica. Rezultat pronalaska uloge disbioze u patogenezi AA, bio bi stvaranje novog dijagnostičkog, prognostičkog i najvažnije terapijskog

pristupa bolesti. No to se tek treba potvrditi dobro dizajniranim istraživanjima s višom razinom dokaza.

### 3.2. ZLOĆUDNE BOLESTI

Do danas je najbolje poznat utjecaj crijevne mikrobiote na razvoj i napredovanje tumora GIT-a, ali sve se više pronalazi njena uloga i u hematološkim zloćudnim bolestima poput leukemija, limfoma te multiplog mijeloma (47). Njihova povezanost očituje se složenim uzajamnim odnosima u kojima zloćudne bolesti, ali i njihovo liječenje dovode do kvantitativnih i/ili kvalitativnih poremećaja crijevne mikrobiote, dok ista, kao rezultat toga, može negativno utjecati na daljnje napredovanje bolesti i razvoj komplikacija, stvarajući tako začarani krug pozitivne povratne sprege.

Postoji niz, uglavnom prekliničkih, istraživanja dizajniranih s ciljem pronalaska uloge crijevne mikrobiote u onkogenezi hematoloških tumora. Jedna od njih je i ona Yamamota i sur. (48) koja je za otkrivanje uloge mikrobiote u limfomagenezi upotrijebila model miša s ataksija-teleangiektazijom (A-T), autosomno recesivnom bolešću povezanom s većim rizikom od razvoja limfoma, ali i akutnih limfoblastičnih leukemija (ALL). U istraživanju je analizirana pojavnost limfoma među miševima s različitim mikrobnim zajednicama GIT-a kao i onim uzgojenim u različitim okolišnim uvjetima. A-T miševi uzgojeni u sterilnim uvjetima imali su promijenjenu latenciju limfoma te produljeni životni vijek sugerirajući postojanje utjecaja crijevne mikrobiote na tijek bolesti. Također, ovisno o sastavu crijevne mikrobiote, različite kolonije pokazale su različitu osjetljivost prema nastanku limfoma. U miševa s povećanom otpornošću prema razvoju limfoma izolirana je *Lactobacillus johnsonii*, bakterija povezana s nižim stupnjem upale u organizmu te smanjenjem oksidativnog stresa. Osnovni mehanizam kojim *L.johnsonii* ostvaruje svoje antitumorske učinke bila bi inaktivacija NF- $\kappa$ B, faktora koji, pokretanjem upale u organizmu, potiče oksidativni stres i shodno tome povećava genotoksičnost. Opisan utjecaj mikrobiote na genuzu limfoma neizravnog je mehanizma, a postignut je oblikovanjem lokalnog i sistemskog nespecifičnog imunološkog odgovora. Budući da je disbioza stanje karakterizirano imunološkim nepravilnostima i većim stupnjem oksidativnog stresa, ista bi mogla utjecati na

razvoj i napredovanje limfoma upravo tim neizravnim mehanizmom. Osim neizravno, mikroorganizmi mogu utjecati na limfomagenezu i izravnim putem, što podrazumijeva poticanje mutagena djelovanjem vlastitih metabolita i toksina (38). U ovom slučaju odgovornost za razvoj limfoma, umjesto disbioze, preuzimaju pojedini patogeni poput *H.pylori* ili EBV. Nadalje, ulogu crijevne mikrobiote u hematološkim zloćudnim bolestima potvrđuje i istraživanje kojim se skupina odraslih osoba preživjelih od Hodgkinovog limfoma, u usporedbi s kontrolnom skupinom, povezala s manjom izloženosti infekcijama u dječjoj dobi (49). Jedna od karakteristika navedenog limfoma je i poremećaj imunološkog sustava koji se očituje smanjenom aktivnošću Th1 stanica i pojačanim Th2 odgovorom. Budući da je za prijelaz iz imunološkog repertoara kojim dominiraju Th2 stanice u onaj Th1-dominirajući nužna uredna kolonizacija, sazrijevanje te eubioza crijevne mikrobiote, postoji mogućnost da je upravo njena disbioza jedan od činitelja razvoja limfoma. Uistinu, pronađena je smanjena raznolikost crijevne mikrobiote u preživjelih od Hodgkinovog limfoma, u odnosu na njihove zdrave blizance koji su služili kao kontrola, no još nije poznato koliko je disbioza, kao njen uzrok ili posljedica, povezana sa samom bolesti, a koliko s liječenjem. Rana kolonizacija GIT-a mogla bi imati utjecaj i u razvoju ALL-a, budući da su Francis i sur. (50) otkrili statistički značajnu vezu između poroda dovršenog carskim rezom, karakteriziranog različitim početnim kolonizatorima, i nastanka bolesti. To bi se također moglo objasniti ulogama različitih članova crijevne mikrobiote u ranom razvoju i oblikovanju imunološkog sustava domaćina.

Osim moguće predisponirajuće uloge u nastanku zloćudnih hematoloških bolesti, disbioza crijevne mikrobiote može nastupiti i kao posljedica same bolesti, ali i terapijskih intervencija poput primjene antibiotika, kemoterapije ili imunoterapije. Iako je poprilično teško odrediti što je uzrok, a što posljedica, povezanost disbioze i zloćudnih bolesti hematološkog sustava svakako postoji. Navedeno potvrđuje istraživanje Rajagopale i sur. koji su, uspoređujući sastav crijevne mikrobiote u djece oboljele od ALL-a i njihovih zdravih srodnika u trenutku postavljanja dijagnoze i netom poslije kemoterapije, ukazali na postojanje smanjene raznolikosti mikroorganizama izoliranih iz fekalnih uzoraka bolesnika s ALL-om (51). Bitno je napomenuti da takve promjene u sastavu mikrobiote nerijetko ostaju dugotrajne pa bi upravo one mogle doprinosti povećanoj pojavnosti kroničnih

bolesti, poput pretilosti i dijabetesa tipa 2, u onih odraslih koji su u dječjoj dobi bolovali od ALL-a (52). Ukoliko bi disbiotičke promjene uistinu bile nepovratne, a uz to dovodile do komorbiditeta, svakako bi bilo nužno obnoviti sastav mikrobiote takvih bolesnika i tako spriječiti neposredne, ali i one kasne posljedice bolesti. Chua i sur. (53) prvi su dokazali disbiozu crijevne mikrobiote u asimptomatskih odraslih osoba koji su u dječjoj dobi preboljeli ALL, kao i povećanu aktivaciju limfocita T te povišenu razinu biomarkera upale poput IL-6 i CRP-a, što je ujedno bilo povezano sa smanjenom zastupljenošću *F.prausnitzii*, bakterije s poznatim protuupalnim djelovanjem.

Osim na razvoj tumora, mikrobiota može utjecati i na učinkovitost citotoksičnih lijekova i tako povećati ili smanjiti osjetljivost na antitumorsku terapiju. U skladu s tim, zabilježena je veza između antibiotika usmjerenih prema gram-pozitivnim bakterijama i smanjenog antitumorskog učinka ciklofosfamida i cisplatina u bolesnika s kroničnom limfocitnom leukemijom (CLL). Od 800 bolesnika s CLL-om, koji su bili uključeni u istraživanje, njih 45 primalo je anti-gram-pozitivne antibiotike i, u odnosu na druge bolesnike, značajno lošije odgovorilo na antitumorsku terapiju, što je popraćeno i smanjenim sveukupnim preživljenjem (engl. *Overall Survival*, OS). Mehanizam kojim gram-pozitivne bakterije doprinose antitumorskom učinku podrazumijeva njihov utjecaj na razvoj i diferencijaciju limfocita Th17 koji potom posreduju uništenje tumorskih stanica (54).

Iako još preostaje dokazati izravnu uzročnu povezanost, sve navedeno sugerira postojanje bitne uloge poremećaja crijevne mikrobiote u hematološkim bolestima, počevši od njihove patogeneze i napredovanja bolesti pa sve do utjecaja na ishod liječenja. Zadnje se ostvaruje već spomenutom ulogom u oblikovanju antitumorskog odgovora, ali i utjecajem na razvoj niza komplikacija, poput onih infektivnih, koje se pojavljuju kao posljedica disbioze.

#### 4. CRIJEVNA MIKROBIOTA U ALOGENIČNOJ TRANSPLANTACIJI KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA

Transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS) najpotentniji je oblik liječenja za brojne hematološke zloćudne bolesti, ali i neke prirođene i stečene bolesti

koštane srži koje su dobroćudne naravi. Ovisno o davatelju matičnih stanica, razlikujemo autolognu, singeničnu te alogeničnu transplantaciju. Dok je u autolognoj davatelj ujedno i primatelj matičnih stanica, a u singeničnoj monozigotni blizanac, alogeničnu TKMS (alo-TKMS) karakterizira HLA podudarni srodni ili nesrodni darivatelj, odnosno davatelj i primatelj su genetski neistovjetne jedinke iste vrste. Upravo zbog toga alo-TKMS ima još jednu dimenziju u svom terapijskom pristupu. Osim kombinacije liječenja matičnim stanicama i konvencionalne terapije, koja podrazumijeva primjenu citostatika sa ili bez ozračenja cijeloga tijela, alo-TKMS pruža i imunoterapijski pristup. Cilj pretransplantacijskog kondicioniranja je uništenje zloćudnih, ali i stanica imunološkog sustava kojim se omogućuje prihvaćanje imunokompetentnih stanica davatelja. U slučaju alo-TKMS-a, zloćudne stanice primatelja napadaju se pretransplantacijskim kondicioniranjem, ali i aloreaktivnim limfocitima T porijeklom iz presatka. Naime, imunokompetentne stanice davatelja prepoznaju antigene na površinama zloćudnih stanica, a potom aktivacijom različitih efektorskih mehanizama dovode do njihova uništenja. Navedeni antigeni uglavnom pripadaju slabim antigenima tkivne podudarnosti (engl. *Minor Histocompatibility Antigens*), budući da je jedan od preduvjeta alogenične transplantacije istovjetnost u antigenima glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex*). Ovaj mehanizam imunološke je prirode, a naziva se učinak presatka protiv tumora (engl. *Graft-versus-Leukemia*, GvL). Uz prisutnost na zloćudnim stanicama, aloantigeni se nerijetko nalaze i na brojnim normalnim stanicama primatelja pa inače poželjan učinak aloreaktivnosti prema tumoru uzrokuje i neželjeni toksični učinak u sklopu GvHD-a. GvHD, kao komplikacija alotransplantacije, pojavljuje se u čak 50% pacijenata, a ujedno je i stanje koje u najvećoj mjeri ograničava primjenu alo-TKMS-a (55). Ostale po život opasne komplikacije koje umanjuju uspjeh alo-TKMS su posttransplantacijske infekcije, plućne komplikacije i relaps bolesti.

S nedavnim napretkom u tehnologiji, kojom se mikroorganizmi lakše identificiraju, sve je veći broj istraživanja koja pronalaze vezu između mikrobiote crijeva i razvoja posttransplantacijskih komplikacija bolesnika podvrgnutih alo-TKMS-u.

#### 4.1. UTJECAJ ALO-TKMS-a NA CRIJEVNU MIKROBIOTU

Bolesnici koji se podvrgavaju alo-TKMS-u doživljavaju značajne kvantitativne i/ili kvalitativne promjene crijevne mikrobiote kojima se narušava ravnotežno stanje mikrobnog ekosustava te se iz stanja eubioze prelazi u disbiozu. Najznačajniji postupci koji se poduzimaju u sklopu alo-TKMS-a, a usporedno uzrokuju disbiozu u crijevima, su pretransplantacijsko kondicioniranje, profilaktička ili terapijska primjena antibiotika te promjena prehrane (56). Svakim od navedenih postupaka intervenira se pri opravdanoj indikaciji, kao i s točno određenim ciljem, ali uz svoj primarni željeni učinak, oni usputno narušavaju homeostazu u crijevima, ostvarujući tako i određene neželjene učinke. Dakle, terapijski postupci uz svoje izravne, imaju i one neizravne, disbiozom posredovane posljedice. GvHD, kao oblik upalne bolesti posredovane limfocitima T, također doprinosi smanjenoj raznolikosti crijevne mikrobiote (57). Kako se u stanju disbioze gube sve koristi mikrobiote, za očekivati je da će novonastale promjene mikrobiote učiniti bolesnika u posttransplantacijskom razdoblju još podložnijim različitim infektivnim, upalnim te imunoposredovanim komplikacijama.

##### 4.1.1. PRETRANSPLANTACIJSKO KONDICIONIRANJE I DISBIOZA

Režim pretransplantacijskog kondicioniranja podrazumijeva primjenu citostatika, s ozračivanjem cijeloga tijela ili bez njega, koja se ponekada kombinira i s primjenom monoklonalnih protutijela (58). Njegov cilj je uništiti zloćudne stanice koštane srži i tako obustaviti napredovanje osnovne bolesti, ali i uzrokovati imunosupresiju koja će spriječiti imunološko odbacivanje transplantata. Ipak, režim kondicioniranja uzrokuje i znatno oštećenje GIT-a, s mukozitisom kao najčešćom posljedicom. Mukozitis predstavlja ozljedu sluznice koja se histološki očituje upalom, narušenom fiziologijom sluznice te hipocelularnošću (59). Kliničkom slikom dominira abdominalna bol, mučnina, povraćanje, dijareja, a potom i malnutricija zbog koje se često pojavljuje potreba za parenteralnim načinom prehrane. Budući da mukozitis znatno narušava cjelovitost sluznice, on istovremeno omogućuje i prijelaz antigena mikroorganizama iz crijevnog lumena u cirkulaciju, što je preduvjet za nastanak bakterijemije, ali ujedno i prvi korak u patofiziologiji GvHD-



a. Sve navedeno čini mukozitis izrazito značajnom dijagnozom za bolesnike koji se podvrgavaju alo-TKMS-u, zbog čega je nužno razumijeti njegovu patofiziologiju.

Imajući na umu značaj crijevne mikrobiote u održavanju homeostaze crijeva, nekolicina znanstvenika proučavala je upravo njenu ulogu u razvoju mukozitisa. Većinom pretklinička, ali i poneka klinička istraživanja ukazuju na razvoj disbioze kao posljedice određenih citostatika. U istraživanju na životinjskom modelu, pronađena je pozitivna povezanost između primjene irinotekana i nastanka disbioze, karakterizirane smanjenim brojem obligatnih anaerobnih bakterija te porastom aerobne *E.coli* (60). Takva mikrobiota doprinosi nastanku aktivnih toksičnih metabolita irinotekana čime pojačava njegove citotoksične učinke i doprinosi ozljedi GIT-a. Sličnu pojavu opisuju i pojedina klinička istraživanja. Primjerice, Vliet i sur. analizirali su fekalne uzorke pedijatrijske populacije oboljele od akutne mijeloične leukemije tijekom 36 ciklusa kemoterapije te potvrdili nastanak disbioze sa smanjenom raznolikošću mikrobiote uz porast aerobnih patogenih bakterija poput *Enterococcus* spp. (61). Također, Montassier i sur. proveli su istraživanje u kojemu su, primjenom DNA sekvenciranja sljedeće generacije, analizirali kemoterapijom potaknute promjene fekalne mikrobiote na uzorku od 8 bolesnika oboljelih od non-Hodgkin limfoma. Bolesnici su se podvrgnuli kondicioniranju u sklopu TKMS-a, a uzorci fecesa prikupljeni su netom prije kondicioniranja te tjedan dana nakon početka terapije. Zabilježene su drastične razlike u mikrobioti uzoraka. Nakon provedene kemoterapije, zabilježen je statistički značajan pad u zastupljenosti koljena *Firmicutes* i *Actinobacteria* uz porast *Bacteroidetes* i *Proteobacteria*, dok su na razini roda prevladavale gram negativne bakterije *Escherichia* uz gubitak *Blautia*, *Faecalibacterium* i *Roseburia*, što su sve ključni članovi mikrobiote za održavanje homeostaze crijeva (62). Shodno tome, postavlja se pitanje utjecaja ovako drastičnih promjena fekalne mikrobiote na GIT, odnosno pitanje odgovornosti disbioze u razvoju i napredovanju mukozitisa te njegovih kliničkih posljedica. Pad u zastupljenosti koljena *Firmicutes* barem bi djelomično mogao biti zaslužan za nastanak malaksalosti i malnutricije bolesnika tijekom kemoterapije, budući da su pripadnici toga koljena zabilježeni u velikim količinama u pretilim miševima, u kojima omogućuju povećano iskorištavanje energije iz prehrane (63). Također, pad roda *Blautia* i *Faecalibacterium*, kao protuupalnih bakterija, čini domaćina podložnijim za razvoj

upale. Naime, prethodna istraživanja pokazala su kako se gubitak *Faecalibacterium prausnitzii* snažno povezuje s razvojem Crohnove bolesti, čiji je središnji patofiziološki događaj pojačana upala u crijevima (64). S druge strane, značaj porasta roda *Escherichia*, kao bakterija s proupalnim svojstvima, pokazuju brojna istraživanja u kojima se upravo te bakterije najčešće izoliraju iz krvi septičnih onkoloških pacijenata (65). Iz svega navedenog slijedi da kemoterapijom potaknutu disbiozu karakterizira prijelaz iz protuupalnog u upalno stanje, kao rezultat gubitka korisnih bakterija. Nadalje, budući da očuvana mikrobiota štiti strukturu i funkciju GIT-a, ispravak disbioze bi potencijalno mogao ublažiti mukozitis. U kontekstu mukozitisa, zdrava crijevna mikrobiota domaćinu pruža pogodnosti poput smanjenja upale i oksidativnog stresa te jačanja crijevnih barijera putem smanjenja crijevnih propusnosti, kao i obnove sloja sluzi i epitelnih stanica (66)(67).

Osim kemoterapijom, mukozitis može biti uzrokovan i radioterapijom (68). Pojedine komenzalne bakterije mogu zaštitnički djelovati i na mukozitis potaknut radioterapijom što potvrđuje istraživanje znanstvenika Delia i sur. koji su, tijekom dvostruko-slijepe, randomizirane kliničke studije, dokazali korisne učinke probiotika na zračenjem-potaknutu dijareju. Naime, u odnosu na kontrolnu placebo skupinu, skupina pacijenata koja je dobivala probiotike sa sojevima *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* imala je znatno manju učestalost dijareje što pokazuje učinkovitost probiotske terapije u prevenciji i/ili redukciji i incidencije, ali i stupnja enterokolitisa (69).

Mukozitis, kao jedna od najčešćih komplikacija pretransplantacijskog kondicioniranja, svakako može utjecati i na sposobnost i spremnost pacijenata za sam proces transplantacije i tako doprijeti napredovanju osnovne bolesti te spriječiti optimalne ishode liječenja. Upravo zbog toga, postoji potreba za još detaljnije dizajniranim istraživanjima koja bi razjasnila točnu ulogu crijevnih mikrobiota u akutnoj gastrointestinalnoj toksičnosti posredovanoj kemo- i radioterapijom. Time bi se omogućili optimalni preduvjeti i za kliničke studije o učinkovitosti i sigurnosti primjene različitih intervencija koje, putem modifikacije mikrobiota, ispravljaju disbiozu.

#### 4.1.2. DISBIOZA UZROKOVANA PREHRANOM

Jedan od važnijih čimbenika u oblikovanju sastava i raznolikosti crijevne mikrobiote svakako je prehrana (70). Imajući to na umu, različite vrste prehrane mogu uvelike mijenjati sastav bakterijskih populacija unutar crijeva i tako neizravno djelovati na ljudsko zdravlje.

U prvim tjednima nakon provedene alo-TKMS, pacijenti doživljavaju značajno pogoršanje nutritivnog statusa, zahvaljujući već spomenutim izravnim toksičnim učincima pretransplantacijskog kondicioniranja, ali i sekundarnim komplikacijama poput akutnog GvHD-a i infekcija. Nastala malnutricija, kao stanje nedovoljne uhranjenosti ili pothranjenosti, rezultat je kombinacije neodgovarajućeg oralnog unosa hranjivih tvari, promjena u njihovoj probavi, apsorpciji i metabolizmu te pojačanih izdataka istih putem probavnog sustava (dijareja i povraćanje). Gubitak apetita, mučnina, povraćanje te abdominalni bolovi, kao nuspojave kemoterapeutika, samo su neki od razloga smanjenog oralnog unosa hranjivih tvari. Također, značajne promjene strukture i funkcije GIT-a, kao posljedice mukozitisa, GvHD-a ili infekcija, klinički se očituju brojnim dijarejama koje su uz enteropatiju s gubitkom proteina važni uzroci nutritivnog manjka. Koristeći se uglavnom antropometrijskim te biokemijskim metodama, nekolicina znanstvenika dokazala je prisutnost malnutricije u pacijenata liječenih alo-TKMS-om. Papadopoulou i sur., na uzorku od 47 pacijenata, zabilježili su značajno smanjenje albumina u serumu koji je ujedno jedan od najcitiranijih biokemijskih indikatora malnutricije (71). Nadalje, s obzirom na pronalazak niskih razina transferina, također pokazatelja malnutricije, uglavnom u pacijenata s fatalnim ishodom liječenja, poremećaj nutritivnog statusa povezuje se s većom vjerojatnošću smrtnog ishoda nakon transplantacije te tako može poslužiti kao bitan prognostički faktor (72). Upravo zbog toga, odgovarajuća nutritivna potpora prije i tijekom liječenja od iznimne je važnosti. Budući da manjka čvrstih dokaza koji podupiru smjernice društava, poput Američkog i Europskog udruženja za parenteralnu i enteralnu prehranu, i dalje se raspravlja o izboru zlatnog standarda te prednostima i nedostacima različitih vrsta nutritivne potpore. Unatoč relativno širokoj primjeni potpune parenteralne prehrane (engl. *Total Parenteral Nutrition*, TPN), postoji rastući trend istraživanja koja enteralnu prehranu favoriziraju kao prvi izbor

nutritivne potpore u pacijenata podvrgnutih alo-TKMS-u. Naime, Seguy i sur. pokazali su kako se enteralna prehrana povezuje s boljim OS, smanjenim stupnjem akutnog GvHD-a te bržim oporavkom neutrofila (73). Barem jedan od čimbenika koji doprinose takvim rezultatima je i značajno manji utjecaj enteralnog oblika prehrane na crijevnu mikrobiotu u odnosu na parenteralni. Naime, gubitkom dotoka hranjivih tvari u crijeva, poput onog u TPN-u, mikrobiota ne dobiva potrebnu količinu hranjivih tvari za održavanje urednog sastava, raznolikosti te bogatstva mikroorganizama, što u kombinaciji s velikom osjetljivošću mikrobiote na lokalne promjene rezultira značajnom disbiozom crijeva. Primjer toga je istraživanje u kojemu je TPN u životinjskom modelu prouzročila preobrazbu mikrobiote iz one u kojoj dominira *Firmicutes* u onu s dominantno zastupljenim koljenom *Proteobacteria*, inače slabo zastupljenog u zdravih pojedinaca (74). Povećana pojavnost akutnog GvHD-a i lošije preživljenje u pacijenata na parenteralnoj prehrani, u odnosu na one na enteralnoj, mogle bi biti povezane i s povećanim gubitkom *Blautia* spp. koji je zabilježen nakon duže primjene TPN-a (75). Riječ je o bakterijama koje potencijalno doprinose smanjenoj smrtnosti vezanoj uz GvHD, o čemu će biti više govora nešto kasnije. Gubitak *Blautia* spp, kao i ostalih rodova unutar reda *Clostridiales*, zabilježen je i u dobrovoljaca koji su konzumirali hranu obogaćenu proteinima, a siromašnu ugljikohidratima, što bi moglo poslužiti kao svojevrsna imitacija TPN-a (76). Drugo istraživanje ukazuje na pojavu disbioze karakterizirane većom zastupljenošću *Akkermansia muciniphila*, kao posljedice smanjenog enteralnog kalorijskog unosa (77). Značaj veće zastupljenosti spomenute bakterije leži u njenom učinku razgradnje sluznog omotača u crijevima što može doprinijeti većoj učestalosti GvHD-a i infekcija. Navedeni rezultati ukazuju na potencijalnu ulogu crijevnih komenzala u posredovanju zabilježenih učinaka različitih oblika nutritivne potpore nakon alo-TKMS-a.

#### 4.1.3. DISBIOZA UZROKOVANA ANTIBIOTICIMA

Budući da bakterijske infekcije značajno doprinose morbiditetu i mortalitetu u ranom posttransplantacijskom razdoblju, primjena antibiotika tijekom alo-TKMS-a ključna je za sveukupni uspjeh liječenja (78). Zahvaljujući snažnoj supresiji hematopoeze, kao posljedice pretransplantacijskog kondicioniranja, ali i osnovne maligne bolesti, pacijenti razvijaju neutropeniju, definiranu kao sistemsko

imunološko stanje s izrazito niskim brojem neutrofila. Neutropenija u kombinaciji s kemoterapijom-potaknutim mukozitisom stvara savršene uvjete za razvoj bakterijemije te ostalih infektivnih komplikacija. Kod takvih bolesnika antibiotici se primjenjuju u profilaktičke ili terapijske svrhe, a intervenira se s ciljem sprječavanja ili liječenja infekcija. Ipak, primjena antibiotika nosi svoju cijenu. Ovisno o širini spektra njihova antimikrobnog djelovanja, antibiotici su sposobni u različitoj mjeri utjecati na raznolikost crijevne mikrobiote i tako neizravno naštetiti domaćinu. Naime, mijenjajući sastav mikrobiote antibiotici posredno narušavaju homeostazu imunološkog sustava GIT-a te tako povećavaju osjetljivost domaćina na razvoj autoimunih, malignih, metaboličkih te infektivnih bolesti. Disbiozu daleko češće uzrokuju antibiotici sa širokim spektrom djelovanja čiji učinci mogu biti dugotrajni. Već kratkotrajna primjena klindamicina smanjuje zastupljenost *Bacteroidetes* u razdoblju od minimalno dvije godine (79). Bitno je napomenuti da antibiotici vrlo često dovode i do gubitka onih bakterija koje izravno nisu unutar područja njihova djelovanja. Razlog tome leži u postojanju složene mreže međuovisnosti različitih bakterija. Naime, kada je riječ o opskrbi hranjivim tvarima, mikroorganizmi mogu ovisiti o drugim, susjednim stanovnicima crijeva, pa tako liječenje vankomicinom uzrokuje pad i u zastupljenosti gram-negativnih, unatoč njegovoj antimikrobnoj usmjerenosti prema gram-pozitivnim bakterijama (80). Osim što se antibioticima znatno narušava ravnotežno stanje mikrobnog ekosustava, oni doprinose i pojačanom izražaju gena odgovornih za rezistenciju na antibiotike koji se horizontalno šire među sojevima (81). Među različitim lokalizacijama mikrobiote, upravo ona u crijevima najviše teži stvaranju rezistentnih sojeva (82).

Posebno veliku osjetljivost na razvoj disbioze, uslijed njihova imunokompromitirana stanja, pokazuju pacijenti tijekom i nakon alo-TKMS-a. Postantibiotska disbioza karakterizirana je gubitkom funkcionalne i taksonomske raznolikosti kao i smanjenim pružanjem otpora prema kolonizaciji i prodoru patogenih bakterija (83). Upravo zbog toga, antibiotici primijenjeni za profilaksu i/ili liječenje febrilne neutropenije neočekivano mogu povećati osjetljivost domaćina prema infektivnim komplikacijama. Dok crijevna mikrobiota zdravog pojedinca sadrži minimalno 1000 različitih bakterijskih vrsta, mikrobne zajednice posttransplantiranih pacijenata karakterizirane su mono- ili oligokolonizacijom, što

podrazumijeva dominaciju samo jedne ili nekoliko vrsta bakterija (39). Crijevna dominacija definira se kao pojava u kojoj jedna bakterijska vrsta zauzima najmanje 30% zastupljenosti unutar čitave crijevne mikrobiote. Najčešće pronađeni dominirajući mikroorganizmi su *Enterococcus*, *Streptococcus* i različite bakterije unutar koljena *Proteobacteria* (84). Upravo bi primjena antibiotika mogla biti jedan od uzroka takve pojave. Naime, pretklinička istraživanja na životinjskom modelu ukazuju na dramatičan porast na vankomicin rezistentnog enterokoka (engl. *Vancomycin-Resistant Enterococcus*, VRE), kao posljedicu antibiotskog liječenja (85). Slične rezultate potvrđuju klinička istraživanja koja pokazuju snažnu povezanost između enterokokne dominacije i antibiotika. Primjerice, Donskey i sur. demonstrirali su povezanost metronidazola, kao antibiotika s primarno antianaerobnom aktivnošću, i kolonizacije VRE, čime su potvrdili hipotezu kako antibiotici potiču enterokoknu monokolonizaciju prvenstveno djelovanjem na obligatne crijevne anaerobe. Suprotno tome, nije pronađena povezanost među antibioticima s minimalnom antianaerobnom aktivnošću i dominacije određenih bakterijskih vrsta (86). Uloga anaerobnih crijevnih komenzala u sprječavanju kolonizacije patogenih vrsta opisana je još 1970-ih godina, kada se pokazalo da rodovi *Clostridia* i *Bacteroidetes*, kao predstavnici anaerobne flore, sprječavaju dugoročnu kolonizaciju patogena poput *Clostridium difficile*, *Salmonella enterica* ili VRE (87). S druge strane antibiotici s minimalnom antianaerobnom aktivnošću, kao što su fluorokinoloni, smanjuju rizik od crijevne dominacije *Proteobacteria*, koljena koji sadrže gram-negativne patogene tolerantne na kisik, poput *Enterobacteriaceae* i *Pseudomonas* spp (84). Već je spomenuta uloga antibiotika u kompromitiranju obligatne anaerobne mikrobiote, čime izostaje prevencija crijevne dominacije enterokoka, ali postavlja se pitanje na koji način komenzalne bakterije, u uvjetima eubioze, sprječavaju njegovo umnažanje i posljedičnu dominaciju. Mehanizmi kojima gram-pozitivni enterokoki doživljavaju promjenu iz stanja minimalne zastupljenosti tijekom eubioze u stanje postantibiotske disbioze u kojoj prevladavaju u odnosu na ostale vrste, opisani su na modelu miša (88). Naime, primjena antibiotika sa širokim spektrom djelovanja, poput vankomicina, metronidazola ili neomicina, je posredno, uklanjanjem komenzalne mikrobiote, utišala obrambeni mehanizam urođene imunosti crijeva: lučenje AMP-ova. Konkretno, zabilježen je značajan pad lektina tipa C (REGIII $\gamma$ ), peptida poznatog po svom baktericidnom učinku usmjerenom prema gram-pozitivnim bakterijama,

što se smatra odgovornim za porast gustoće enterokoka unutar kolona. Budući da su MAMP-ovi mikrobiote, poput flagellina i LPS-a iz gram-negativnih bakterija, ključni za poticaj lučenja REGIIIy (25), logičan je slijed događaja u kojima antibiotici, djelujući na gram-negativne komenzale, koče lučenje AMP-ova i tako dopuste pretjerani rast gram-pozitivnog enterokoka. Kako se kao uzrok narušenog lučenja AMP-ova navodi izostanak aktivacije PRR-a bakterijskim ligandima, primjena agonista flagellina i LPS-a mogla bi imati značajan terapijski potencijal u sprječavanju crijevne dominacije i posljedičnog prodora, u bolesnika liječenih antibioticima širokog spektra (89). Klinički značaj crijevne dominacije patogena je u povećanom riziku od prijelazu patogena u cirkulaciju te razvoja bakterijemije.

#### 4.1.4. UTJECAJ GvHD-a NA CRIJEVNU MIKROBIOTU

Unatoč napretku u razumijevanju patofiziologije i liječenja, GvHD i dalje ostaje najčešća i najozbiljnija komplikacija alo-TKMS-a, sa znatnim utjecajem na ishod liječenja, sveukupno preživljenje te razvoj morbiditeta (90). Riječ je o upalnoj bolesti posredovanoj limfocitima T za čiji nastanak moraju biti zadovoljena tri kriterija. Prisutnost imunokompetentnih limfocita T unutar presatka čini prvi, dok je drugi kriterij imunosupresija primatelja kojom se onemogućava odbacivanje presatka, a postiže se pretransplantacijskim kondicioniranjem. Treći, ujedno i najvažniji, je razlika u antigenima tkivne podudarnosti kojom se ostvaruje učinak aloreaktivnosti (91). GvHD se može smatrati pretjeranim oblikom, inače normalnog upalnog mehanizma, u kojemu imunokompetentni limfociti T davatelja prepoznaju tkiva domaćina kao strane antigene. U kontekstu hematoloških zloćudnih bolesti poželjan učinak aloreaktivnosti u sklopu GvL-a suprotstavlja se neželjenim učincima GvHD-a. Aloreaktivnost je poželjna ako stanice presatka prepoznaju antigene izražene na tumorskim stanicama i zatim aktiviraju svoje izvršne mehanizme, dok je s druge strane nepoželjna ukoliko se aloantigeni nalaze na normalnim i nepromijenjenim stanicama domaćina. Imunobiologija GvHD-a prilično je složena, ali se može sažeti u tri ključna koraka. Za početak je potrebna aktivacija antigen-predočnih stanica koje prezentacijom aloantigena stvaraju odgovarajući medij za aktivaciju, diferencijaciju i migraciju davateljevih aloreaktivnih limfocita T. Nakon prepoznavanja, njima stranih antigena i posljedične aktivacije, limfociti T potiču različite izvršne mehanizme kojima dovode

do uništenja tkiva (92). Tri ciljna organa koja predstavljaju glavnu metu za aloreaktivne limfocite T su koža, jetra te posebice crijeva. Zanimljivo je da su to ujedno i organi koji u najvećoj mjeri stupaju u interakciju s mikroorganizmima, čineći granicu između okoline i unutarnje homeostaze čovjeka. Crijevni GvHD pogađa više od 50% pacijenata s akutnom prezentacijom GvHD-a, doprinoseći u velikoj mjeri njegovom mortalitetu. Smatra se kako upravo ozljeda GIT-a, uslijed pretransplantacijskog kondicioniranja, igra glavnu ulogu u patofiziologiji sistemskog GvHD-a (93).

Uzimajući u obzir nedavne studije koje su, na uzorku bolesnika oboljelih od upalne bolesti crijeva, pronašle povezanost između crijevne upale i disbioze crijeva (21), postavilo se pitanje je li i u kojoj mjeri je crijevni GvHD (u nastavku GvHD), kao upalno stanje, odgovoran za narušenu mikrobiotu pacijenata nakon alo-TKMS-a. Jenq i sur. demonstrirali su, prvotno na životinjskim modelima, a zatim i u ljudi, značajan utjecaj crijevne upale na sastav crijevne mikrobiote nakon alo-TKMS-a (57). Naime, prije razvoja GvHD-a bolesnici su imali relativno urednu mikrobiotu nalik na onu u kontrolnoj skupini, no s vremenom, a posebice nastupom GvHD-a, zabilježila se značajno smanjena raznolikost iskazana Shannonovim indeksom. Promjene su se odnosile na porast populacija *Lactobacillales* te pad *Clostridiales*. U drugome istraživanju, Holler i sur. metagenomski su analizirali mikrobiome iz uzoraka stolice pacijenata podvrgnutih alo-TKMS-u te dobili vrlo slične rezultate (56). Predominantno komenzalna mikrobiota bolesnika netom prije transplantacije zamijenjena je mikrobiotom karakteriziranom znatno smanjenom bioraznolikošću uz porast *Enterococcus* spp. Zanimljivo je da su zabilježene promjene bile najizraženije tek kada je nastupio GvHD, pa je tako u bolesnika koji nisu razvili GvHD prosječni udio enterokoka u posttransplantacijskim uzorcima stolice iznosio 21%, u usporedbi s 46% u onih koji u tom trenutku nisu bili opterećeni upalom, ali nakon određenoga vremena su je ipak razvili. Tada, u vrijeme aktivnog GvHD-a prosječni udio bio je čak 74%, sugerirajući snažan utjecaj crijevne upale na sastav crijevne mikrobiote. Pod utjecajem akutnog GvHD-a mijenja se i metagenom mikrobiote, što se očituje povećanim izražajem gena odgovornih za nastanak rezistencije na antibiotike (94).



Nekolicina nedavnih istraživanja pokušala je razjasniti mehanizme kojima GvHD doprinosi disbiotskom stanju crijeva. Sličnosti postantibiotske disbioze i one potaknute GvHD-om očituju se u smanjenom lučenju AMP-ova, proizvoda Panethovih stanica, ali mehanizmi se ponešto razlikuju. U GvHD-u, Panethove stanice postaju jedna od glavnih meta aloreaktivnim limfocita T, a njihov smanjen broj potvrđen je na miševima i ljudima. Naime, pokusi na životinjskim modelima pokazuju kako naglo smanjenje brojnosti stanica nastaje neovisno o ionizacijskom zračenju tijekom režima kondicioniranja, potvrđujući postojanje mehanizma ovisnog o aloreaktivnim limfocitima T (95). Posljedično pada i razina  $\alpha$ -defenzina, najučinkovitijih AMP-ova (96), koji svojom baktericidnom aktivnošću ne samo da pružaju zaštitu od crijevnih patogena već i održavaju stanje crijevne eubioze. Smanjena razina AMP-ova u GvHD-u povezuje se i s izostankom signala mikrobiote uslijed postojeće disbioze uzrokovane antibioticima, odnosno kondicioniranjem (97). Tim mehanizmom se, u bolesnika podvrgnutih alo-TKMS-u, stvara začarani krug u kojemu disbioza pogoduje smanjenom lučenju AMP-ova, a ono zatim pogoršava disbiozu.

Osim funkcije očuvanja eubioze, Panethove stanice služe kao ekološka niša matičnim stanicama crijeva (engl. *Intestinal Stem Cells*, ISC), čime homeostazi doprinose i svojom reparativnom ulogom. Njihova zadaća je da lučenjem molekula, poput EGF-a, Wnt-a i NOTCH-a, potiču razvoj i diferencijaciju susjedno smještenih ISC-a nužnih za obnovu oštećenog crijevnog epitela (98). Mnoga istraživanja pokazuju veliki značaj narušene cjelovitosti crijevne barijere u stvaranju teške i refraktorne kliničke slike GvHD-a, a zbog toga se započelo testiranje učinkovitosti alternativnih metoda liječenja, temeljenih na principu obnove crijevnog epitela. Primjerice, istraživanjem u kojemu se primjenjivao rekombinantni R-spondin 1 faktor rasta, inače Wnt agonist, dokazala se pozitivna povezanost između obnove crijevnog epitela, praćenu oporavkom Panethovih stanica i ISC-a, i blaže kliničke slike GvHD-a (99). Također, ovo istraživanje potencijalno dokazuje da disbioza tijekom GvHD-a nastaje upravo zbog gubitka Panethovih stanica. Naime, obnova stanica, prikazana normaliziranjem  $\alpha$ -defenzina u fecesu, vratila je crijevnu mikrobiotu iz stanja disbioze u eubiozu, tako da bi se primjena Wnt agonista mogla smatrati i intervencijom kojom se oblikuje

mikrobiota. U ovom slučaju, crijevna mikrobiota se oporavila fiziološkim mehanizmom lučenja AMP-ova iz obnovljenih Panethovih stanica.

Navedena otkrića ukazuju na važnost zaštite crijevne mikrobiote u očuvanju crijevne barijere, a posljedično i u ublažavanju GvHD-a. Detaljniji prikaz utjecaja disbioze na tijek GvHD-a predstavljen je u sljedećem poglavlju.

#### 4.2. UTJECAJ CRIJEVNE MIKROBIOTE NA POSTTRANSPLANTACIJSKE KOMPLIKACIJE

Zahvaljujući prirodi same maligne bolesti, imunološkoj disregulaciji, ali i disbiozi, bolesnici koji primaju terapiju alo-TKMS izrazito su podložni infektivnim te imunoposredovanim komplikacijama.

Bilo da se radi o disbiozi uzrokovanoj pretransplantacijskim kondicioniranjem, onoj potaknutoj antibioticima, primjenom TPN-a, nastankom GvHD-a ili najčešće zajedničkim djelovanjem svih četiriju uzroka, njene posljedice uvijek su iste. Utjecaj disbioze na ishod alo-TKMS-a najviše se očituje u njevoj ulozi u nastanku posttransplantacijskih komplikacija, poput infekcija i GvHD-a, kao i u povećanom riziku od relapsa. Ipak, nedavna istraživanja pokazuju kako su crijevna mikrobiota i ishod liječenja dominantno povezani putem mortaliteta vezanog za transplantaciju koji podrazumijeva mortalitet od onih komplikacija izravno izazvanih transplantacijom. Značaj crijevne mikrobiote u uspjehu ili neuspjehu alo-TKMS-a, u svome su istraživanju prikazali Taur i suradnici (100). Retrospektivnom analizom demonstriran je obrnuto proporcionalan odnos između stupnja raznolikosti crijevne mikrobiote u vrijeme oporavka hematopoeze (engl. *engraftment*) i mortaliteta. Sveukupno preživljenje, zabilježeno 3 godine nakon liječenja, u skupini bolesnika sa niskim stupnjem bioraznolikosti iznosilo je tek 36%, u odnosu na 67% u bolesnika s velikom raznolikošću procijenjenom mjerenjem Simpsonovog indexa. Uz sve to, pokazano je da disbioza, neovisno o ostalim rizičnim čimbenicima, poput komorbiditeta bolesnika ili stadija osnovne bolesti, može poslužiti kao prediktor smrtnosti povezane s alo-TKMS-om. Bitno je napomenuti da, bez obzira što je demonstrirana vrijednost disbioze kao statistički značajnog prediktora smrtnosti, do danas nije dokazano radi li se o izravnoj

uzročnoj povezanosti. Također, Weber i sur. prikazali su kako smanjena razina 3-indoksil-sulfata (3-IS) u urinu, kao metabolita indola kojeg komenzalne bakterije proizvode iz triptofana, može poslužiti kao biljeg narušene crijevne mikrobiote. Uz to, njegova smanjena razina povezuje se s većim mortalitetom povezanim s liječenjem (engl. *treatment-related mortality*), što još jednom potvrđuje značajan utjecaj crijevne mikrobiote na ishod alo-TKMS-a (101). 3-IS metabolit je crijevne mikrobiote koji svoje djelovanje ostvaruje aktivacijom aril-ugljikovodičnog receptora (engl. *Aryl-hydrocarbon Receptor, AhR*) pa je poznat i kao AhR ligand. Mehanizmi kojima indol metaboliti štite homeostazu crijeva, i tako doprinose većem sveukupnom preživljenju, uključuju jačanje međustaničnih čvrstih spojeva crijevnog epitela, ublažavanje upale sprječavanjem aktivacije NF-kB signalnog puta, odnosno poticanjem lučenja imunomodulatornog citokina IL-10 (102), kao i bakteriostatsko djelovanje usmjereno na gram-negativne patobionte (103). Prva tri mehanizma mogla bi objasniti ulogu manjka 3-IS u razvoju GvHD-a, dok treći daje uvid u potencijalnu ulogu gubitka metabolita indola u razvoju infektivnih komplikacija.

#### 4.2.1. GVHD

Početak istraživanja potencijalnih učinaka crijevne mikrobiote na GvHD seže u razdoblje '70-ih godina prošloga stoljeća kada su dva pokusa na miševima demonstrirala pojavu GvHD-a u SPF, odnosno izostanak istog u GF miševima čija se crijeva nalaze u sterilnom okruženju (104,105). Zatim, '80-tih te '90-ih pojačano se proučavao utjecaj primjene antibiotika širokog spektra, kao i boravka pacijenata u posebnim sobama s laminarnim strujanjem filtriranog zraka (engl. *laminar-airflow isolation*), na stupanj razvoja GvHD-a. Rezultati su bili u skladu s prethodnim istraživanjima, pa se tako u onih bolesnika koji su boravili u okruženju s niskom zastupljenošću mikroorganizama, ili su primali antibiotike, zabilježila niža pojavnost viših/težih stupnjeva GvHD-a (106). Zahvaljujući takvim rezultatima zaživjela je primjena antibiotika s ciljem postizanja potpune crijevne dekontaminacije i sprječavanja posttransplantacijskih komplikacija (107). Nadalje, '90-ih godina je postavljena hipoteza da je smanjena zastupljenost anaerobne mikrobiote, mjerena metodom kultivacije iz uzoraka stolice, povezana s manjom pojavnosti GvHD-a, zbog čega se počela razmatrati opcija rutinske primjene

antibiotika s antianaerobnom aktivnošću (108). S druge strane, novija istraživanja nisu pokazala slične pogodnosti dekontaminacije već suprotno, identificirala su gubitak komenzalne crijevne mikrobiote jednim od važnijih događaja u razvoju težeg GvHD-a, čime se polagano napustila rutinska praksa crijevne dekontaminacije (109). Primjerice, novije istraživanje prikazuje ulogu bakterija *Lactobacillus* spp. u ublažavanju crijevne upale, pa je tako ampicilinom uklonjena *L.johnsonii* bila povezana s težim stupnjem upale, dok je obogaćivanje crijevne mikrobiote navedenom bakterijom rezultiralo nižim stupnjem GvHD-a (57). Time su se umjesto pozitivnih učinaka potpune crijevne dekontaminacije, koja uostalom vrlo često ne uspije pa zapravo nastane selektivna dekontaminacija, počeli naglašavati korisni učinci obnove raznolikosti crijevne mikrobiote. Pretpostavljena objašnjenja takvih oprečnih rezultata mogla bi ležati u znatno ograničenoj mogućnosti kvantitativne i kvalitativne analize crijevne mikrobiote, kakva je postojala u vremenu nastajanja prijašnjih istraživanja. Tada se većina istraživanja sastava mikrobiote temeljila na metodama kultivacije čime se tek 10-50% bakterija uspijevalo izolirati (12). Osim toga, izostanak GvHD-a u akseničnog miša, opisanog u pokusima iz '70-ih, vrlo vjerojatno nastaje kao posljedica uzgajanja u sterilnim uvjetima, čime se stvara imunološki nerazvijena jedinka u kojoj se GvHD niti ne može razviti (110). To bi značilo da uzrok izostanka GvHD-a nije nedostatak crijevne mikrobiote već nerazvijenost sastavnica imunološkog sustava uslijed njenog manjka, pa bi u tom slučaju mikrobiota imala neizravnu ulogu u nastanku GvHD-a. Uz to, suprotni rezultati istraživanja učinaka potpune dekontaminacije crijeva na GvHD mogli bi odražavati različitu uspješnost navedenog postupka. Dakle, ukoliko je postupak uspješan, te su se crijeva uspjela učiniti sterilnim, tada izostaje stimulacija bakterijskih liganda poput LPS-a koji služe kao okidači upale u GvHD-u. S druge strane, puno češće nastaje slučaj u kojemu se ne postiže potpuna dekontaminacija, uslijed pojave rezistentnih sojeva, što je ujedno i najgori mogući scenarij jer tada dolazi do porasta patobionata kombiniranog padom zastupljenosti korisnih komenzalnih bakterija s imunomodulatornim ulogama.

U proučavanju uloge mikrobioma u alo-TKMS-u jedno od najznačajnijih istraživanja, koje je i svojevrsna prekretnica, pripada Tauru i sur., koji su smanjenu raznolikost mikrobiote identificirali kao neovisnog prediktora mortaliteta nakon alo-TKMS (100). Ipak, postoji problem u tumačenju dotičnog rezultata koji je čest u

području metagenomike. Naime, na temelju dobivenih rezultata prilično je izazovno odrediti je li smanjena raznolikost izravno zaslužna za povećani mortalitet ili je ona jednostavno biljeg disbioze nastale uslijed različitih intervencija kojima se bolesnici tijekom alo-TKMS-a izlažu, a koje same po sebi mogu biti odgovorne za višu smrtnost. Nakon utvrđene povezanosti smanjene raznolikosti mikrobiote s povećanim mortalitetom vezanim uz transplantaciju, Jenq i sur. dizajnirali su studiju s ciljem identificiranja povezanosti mikrobiote i GvHD-a (75) u kojoj je pronađena statistički značajana povezanost između uredne raznolikosti mikrobiote i smanjene smrtnosti povezane s GvHD-om. Ne samo da se još jednom dokazala važnost raznolike mikrobiote već su se identificirale specifične bakterije koje doprinose smanjenom GvHD mortalitetu. Riječ je o bakterijama roda *Blautia* unutar reda *Clostridiales*, čiju su smanjenu zastupljenost u bolesnika podvrgnutih alo-TKMS-u potvrdila i ostala istraživanja (57). Uz povezanost s nižim GvHD mortalitetom, *Blautia* spp. povezuje se i sa smanjenom pojavom GvHD-a koji zahtijeva liječenje kortikosteroidima, kao i s nastankom GvHD-a refraktornog na steroide, što sve zajedno rezultira i s povećanim sveukupnim preživljenjem. U skladu s očitim imunosupresivnim učinkom *Blautia* spp., te obrnuto proporcionalnim odnosom GvHD-a i GvL-a, mogla bi se očekivati pojava većeg mortaliteta povezanog s relapsom, ali potpuno suprotno je zamijećeno. Vjerojatno objašnjenje su imunosupresivni učinci koji se očituju primarno na lokalnoj crijevnoj razini uz izostanak sistemskog djelovanja koji bi suprimirao GvL učinak. To objašnjenje podupire i manjak povezanosti *Blautia* spp. s kožnim GvHD-om. Golob i sur. pokazali su kako bi sastav mikrobiote u vrijeme posttransplantacijskog oporavka hematopoeze mogao biti prediktivni čimbenik akutnog GvHD-a (111). Naime, bolesnici u kojima je zabilježen pad u zastupljenosti obitelji *Lachnospiraceae* (uključujući posebice *Blautia* spp.) ili porast razreda *Actinobacteria* uglavnom su razvili akutni GvHD. Sažimajući sve navedeno, gotovo sva istraživanja, vezana uz ovu problematiku, pokazala su pozitivnu povezanost *Enterococcus* spp. te rizika od GvHD-a i posljedično mortaliteta vezanog uz transplantaciju, kao i negativnu povezanost razreda *Clostridia*, a prvenstveno članova obitelji *Lachnospiraceae* i *Ruminococcaeae*. *Enterococcus* spp., u istraživanju Webera i sur., identificiran je kao predominantno zastupljen rod bakterija u onih bolesnika s niskim razinama 3-IS-a, metabolita čije se niske vrijednosti dovode u vezu s višim mortalitetom (101). Mehanizam kojim

*Enterococcus* spp. može doprinijeti razvoju i težini GvHD-a, a posljedično i većem mortalitetu, uključuje narušavanje cjelovitosti epitelne barijere uslijed djelovanja matriks metaloproteaze (112), a zatim i prodor njegovih komponenata i poticanje upale (113). S druge strane, zaštitnu ulogu u razvoju GvHD-a, članovi razreda *Clostridia*, poput *Blautia* spp. ili *F. prausnitzii*, duguju svom metabolomu koji se u najvećoj mjeri sastoji od SCFA metabolita: acetata, propionata i butirata. U kontekstu smanjenog rizika od GvHD-a posebno značajan je butirat, sa svim svojim imunomodulatornim učincima (114). Unosom bakterijskih sojeva *Clostridia*, poznatih po visokoj proizvodnji butirata (115), u GF miša, povećala se zastupljenost Treg stanica i protuupalnih citokina (116). Također, butirat potiče i izražaj MUC2 gena koji kodira mucin, kao i gena nužnih za izgradnju čvrstih međustaničnih spojeva (117). Upravo zbog toga, butirat je neophodan za održavanje uredne gastrointestinalne barijere, dok bi njegov manjak vrlo lako mogao doprinijeti prodoru bakterijskih sastavnica te aktivaciji GvHD-a. Navedeno potkrjepljuju rezultati nedavne metabolomske studije koja je analizirala potencijalnu ulogu SCFA tijekom GvHD-a (118). Koncentracija butirata, izmjerena u crijevnom tkivu 7. dan nakon alo-TKMS-a, bila je značajno snižena, što se vremenski podudaralo s većom upalom i narušenom cjelovitošću crijevne sluznice. Obnovom butirata u crijevnim epitelnim stanicama životinjskih modela, došlo je do ublažavanja GvHD-a, a sve uslijed jačanja crijevne barijere. Time se potvrdila uloga metabolita mikrobiote, kao čimbenika koji mogu umanjiti ozljedu crijeva i tako ublažiti upalu u GvHD-u, što se može iskoristiti za osmišljavanje terapijskih intervencija temeljenih na primjeni bakterija koje proizvode butirat.

#### 4.2.2. INFEKCIJE

Bolesnici koji se podvrgavaju liječenju alo-TKMS-om pod utjecajem su brojnih vanjskih i unutarnjih čimbenika koji na različite načine doprinose povećanju osjetljivosti na infekcije. Primijenjena kemoterapija koči hematopoezu, ali i uklanja već postojeće cirkulirajuće stanice, poput neutrofila, čime izravno narušava funkcioniranje imunološkog sustava te dovodi do imunodeficijencije, koju zatim dodatno potiče i imunosupresivna profilaksa GvHD-a. Drugi način kojim se povećava osjetljivost domaćina na infekciju je disbiozom posredovano narušavanje simbiotskog odnosa između domaćina i crijevne mikrobiote, u kojemu

se zaštitna uloga mikrobiote, u kontekstu sprječavanja crijevnih i/ili sistemskih infekcija, gubi. Ne samo da su obrambene mogućnosti domaćina u borbi protiv patogena svedene na minimum već je i „napad“ mikroorganizama znatno olakšan, zahvaljujući ozljedi GIT-a koja patogenima omogućuje jednostavan pristup podsluzničnim slojevima stijenke crijeva i cirkulaciji. Sve zajedno tvori savršenu sredinu za razvoj infektivnih komplikacija. Sistemske bakterijske infekcije posebno su česte u ranom posttransplantacijskom razdoblju u kojemu još nije nastupio odgovarajući imunološki oporavak (119). Tijekom tog kritičnog razdoblja, karakteriziranog snažnom neutropenijom, gotovo 20% bolesnika razvija bakterijemiju (120) čiji je identificirani izvor najčešće GIT. Da je probavni sustav često porijeklo mikroorganizama izoliranih iz hemokulture potvrđuju i Tamburini i sur., koji su u 30 bolesnika tijekom posttransplantacijske bakterijemije demonstrirali podudaranje bakterija (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) u krvi s onim crijevnim (121).

Jedan od glavnih predisponirajućih čimbenika za razvoj bakterijemije je narušena ravnoteža mikrobnog crijevnog ekosustava te pojava crijevne dominacije patobionata, kao potpune suprotnosti onoj zdravoj, raznolikoj i šarolikoj mikrobioti. U longitudinalnom istraživanju, koje je metagenomski analiziralo uzorke fecesa 94 bolesnika podvrgnutih alo-TKMS-u prije i poslije transplantacije, pronađena dominacija bakterija *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. i gram-negativnih aeroba pojavila se istovremeno s bakterijemijom uzrokovanom istim tim mikroorganizmima (84). Posebno je pronađena povezanost između crijevne dominacije VRE i VRE bakterijemije koja je u značajnoj mjeri odgovorna za visok mortalitet među primateljima alo-TKMS-a (122). Zanimljivo je da utjecaj VRE kolonizacije/dominacije na ishod i mortalitet liječenja ovisi o tome je li ona nastupila u pre- ili posttransplantacijskom razdoblju. Kolonizacija crijeva s VRE prije transplantacije ne povezuje se s povećanim mortalitetom, ali svakako identificira onu skupinu bolesnika s povišenim rizikom od VRE bakterijemije. Suprotno, kolonizacija i bakterijemija nakon neutrofilnog oporavka, u odnosu na onu prije završene imunorekonstitucije, povećava mortalitet (123). Ubeda i sur. otkrili su povezanost između rekolonizacije bakterija roda *Barnesiella* i uklanjanja VRE iz crijeva miša, čime su pružili potencijalno novi pristup u sprječavanju enterokokne dominacije i posljedično njegove bakterijemije (124). Premda se ne zna točan

mehanizam kojim navedene bakterije sprječavaju kolonizaciju i umnažanje VRE, poznata je uloga *Porphyromonadaceae*, obitelji kojoj pripada *Barnesiella*, u sprječavanju infekcije uzrokovane sa *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (125). S obzirom na značaj monokolonizacije rezistentnog enterokoka u ishodu alo-TKMS-a, otkriće zaštitne uloge *Barnesiella* potencijalno bi moglo doprinijeti boljim rezultatima liječenja što svakako unosi dozu optimizma u liječenju hematoloških zloćudnih bolesti.

Kako je već navedeno u poglavlju „Disbioza uzrokovana antibioticima“, za crijevnu dominaciju te posljedičnu bakterijemiju neočekivano bi mogli biti zaslužni antibiotici, koji uklanjanjem mutualističkih bakterija uklanjaju i njihovu sposobnost kontroliranja umnažanja patogena. Naime, bakterije koje su razvile mehanizme rezistencije na antibiotike, poput VRE, normalno su vrlo slabo zastupljene na sluznicama domaćina, što je rezultat inhibitornih sposobnosti komenzalne mikrobiote. Tu sposobnost mikrobiota ostvaruje ulazeći u interakciju, kako s urođenom, tako i stečenom imunosti domaćina. Molekularni obrasci mikrobiote aktiviraju PRR-ove i posljedično transkripcijske faktore koji potiču izražaj gena zaslužnih za sintezu AMP-ova, a ne treba zanemariti niti *slgA*, čiju sintezu potiču Treg stanice pod utjecajem crijevne mikrobiote i citokina tipičnih za stanje eubioze. Navedene sastavnice imunološkog sustava ograničavaju zastupljenost patobionata, dok zajedno s ostalim tolerogenim mehanizmima, opisanim u poglavlju „Imunomodulacija“, toleriraju korisne mikroorganizme.

Infekcija uzrokovana crijevnim patobiontom *Clostridium difficile* pojavljuje se u 15-30% bolesnika tijekom alo-TKMS-a (126). Razlog tako velike pojavnosti leži u samom režimu liječenja koji uključuje radioterapiju, kemoterapiju, imunosupresiju i dugotrajnu hospitalizaciju, što su ujedno i rizični čimbenici za *C.difficile* infekciju (127). Poznato je da je upravo sastav komenzalne crijevne mikrobiote odlučujući čimbenik u određivanju osjetljivosti domaćina prema kolonizaciji crijeva s *C.difficile* i razvoju infektivne bolesti. Primjerice, miševi s mikrobiotom kojom dominiraju bakterije obitelji *Lachnospiraceae* razvili su tek blagu bolest uzrokovanu *C.difficile*, u odnosu na one miševe s predominantno zastupljenom *E.coli* čija je infekcija završila smrtnim ishodom (128). Riječ je o razredu bakterija koji je uz *Actinomycetaceae* bio najbrojniji član crijevne mikrobiote u osoba s pozitivnim



ishodom liječenja s alo-TKMS-om (100). Smatra se da zaštitnu ulogu u kolonizaciji i infekciji *C.difficile*, *Lachnospiraceae* duguju bakteriji *Clostridium scindens* za koju je istraživanje pokazalo da posjeduje sposobnost kočenja rasta *C.difficile* in vitro (129). Konkretno, određene sekundarne žučne kiseline koče njen rast, a *C.scindens* posjeduje 7 $\alpha$ -hidroksisteroid dehidrogenazu, enzim ključan za biosintezu navedenih kiselina (130).

Navedeni primjeri naglašavaju važnost očuvane i raznolike crijevne mikrobiote u sprječavanju umnažanja, inače nisko zastupljenih, endogenih patobionata, odnosno kolonizacije i posljedičnog prodora egzogenih crijevnih patogena. No, to nije jedini način kojim eubiotična crijevna mikrobiota štiti svog domaćina od infektivnih komplikacija. Zahvaljujući svojoj ulozi u hematopoezi, crijevna mikrobiota može znatno doprinijeti imunološkom oporavku. To bi prvenstveno podrazumijevalo brži oporavak neutropenije čime bi se skratilo razdoblje imunorekonstitucije, a ujedno i rizik od razvoja infekcija. Poznato je da mikrobiota oblikuje repertoar lokalnih imunoloških stanica, ali njen utjecaj na funkciju primarnih imunoloških organa, kao i na stvaranje, diferencijaciju i razvoj krvnih stanica, predstavlja nešto noviji i relativno manje poznat koncept. Ulogu komenzalnih bakterija u regulaciji hematopoeze potvrđuju istraživanja na akseničnim miševima čije je stvaranje krvnih loza uglavnom poremećeno. Jedno od takvih istraživanja pokazalo je da GF miševi imaju izrazito oskudnu populaciju Th4 limfocita u slezeni (131), inače vrlo bitne sastavnice specifične imunosti koja ovisno o vrsti antigena usmjerava imunoreakciju prema staničnom ili humoralnom odgovoru. Također, nakon unosa patogene bakterije *Listeria monocytogenes*, aksenični miševi, ili oni tretirani antibioticima, ne uspijevaju se izboriti sa sistemskom infekcijom pa tako uglavnom nastupa smrtni ishod. Za GF miševe karakterističan je i smanjeni udio i diferencijacijski potencijal mijeloidnih progenitornih stanica, a tek nakon provedene rekolonizacije miševa konvencionalnom mikrobiotom dolazi do oporavka mijelopoeze i shodno tome smanjene osjetljivosti prema patogenu (132). Mehanizmi kojima konvencionalna mikrobiota potiče granulopoezu nisu potpuno razjašnjeni, ali smatra se da bitnu ulogu igraju MAMP-ovi, budući da su se na krvotvornim matičnim stanicama pronašli njihovi receptori (PRR) (133). Uistinu, prijelaz peptidoglikana, iz crijeva u koštanu srž miša, poboljšala je funkciju neutrofila (134). Odnos između PRR

liganda i hematopoeze uvelike ovisi o trajanju izloženosti staničnih linija koštane srži sastavnicama mikroorganizama. Dok akutno povećana aktivacija PRR-a djeluje poticajno na hematopoezu, kronična izloženost, kakvu vidamo tijekom disbioze u bolesnika tijekom alo-TKMS-a, ima mijelosupresivni učinak (135). Staffas i sur. proučavali su ulogu disbioze u oporavku hematopoeze tijekom posttransplantacijskog razdoblja (136). U odnosu na miša s očuvanom, u onom s postantibiotski narušenom mikrobiotom zabilježen je smanjen broj limfocita i neutrofila te posljedično smanjena sposobnost uklanjanja patogena nakon alotransplantacije. S pojavom limfopenije, primijećena je i smanjena apsorpcija hranjivih tvari, a tek se kalorijskom nadoknadom limfopoeza miša oporavila, sugerirajući važnost energijskog unosa u imunorekonstituciji i posttransplantacijskom oporavku. Zdrava crijevna mikrobiota nužna je za uredan energijski unos, a doprinos tome ostvaruje putem razgradnje složenih ugljikohidrata na jednostavne šećere čime se olakšava njihova apsorpcija ili putem učinaka na funkcionalne te apsorptivne karakteristika crijeva (136).

Dakle, neovisno o točnom mehanizmu kojim crijevna mikrobiota utječe na hematopoezu i imunološki oporavak, njen oporavak bi potencijalno mogao ubrzati oporavak hematopoeze i tako skratiti ono rano posttransplantacijsko razdoblje koje je ujedno i najrizičnije za nastanak po život opasnih infekcija.

#### 4.2.3. PLUĆNE KOMPLIKACIJE

Plućne komplikacije, poput akutne ozljede pluća i akutnog respiratornog distres sindroma povezanog sa sepsom, nisu rijedak uzrok morbiditeta i mortaliteta nakon alo-TKMS-a (137). Budući da je već istraživana povezanost disbioze crijevne mikrobiote i plućnih manifestacija niza bolesti, kao što su cistična fibroza (138) ili alergija gornjih dišnih puteva (139), a uz to su dokazane i znatne promjene unutar crijevne mikrobiote tijekom alo-TKMS-a, logično bi bilo posumnjati kako bi nastala disbioza mogla biti upletena i u razvoju plućnih komplikacija tijekom i nakon transplantacije. Hariss i kolege osmislili su istraživanje u kojemu je uočena povezanost između disbioze, karakterizirane smanjenom raznolikošću crijevne mikrobiote i dominacijom razreda *Gammaproteobacteria* iz koljena *Proteobacteria*, s plućnim komplikacijama u ranom posttransplantacijskom razdoblju (140).

Također, povišena zastupljenost *Gammaproteobacteria*, kao i same plućne komplikacije, identificirani su kao neovisni prediktori mortaliteta nakon transplantacije. Koljeno *Proteobacteria* sadržava veliki broj gram-negativnih bakterija od kojih se barem nekolicina, predvođena s *K. pneumoniae* i *K. oxytoca*, svrstava u respiratorne patogene. Izravni mehanizmi kojima bi crijevna mikrobiota mogla doprinijeti razvoju plućnih komplikacija podrazumijevaju prijelaz bakterijskih sastavnica, ili njenih metabolita, iz lumena crijeva u plućni parenhim, a neizravni uključuju utjecaj na sistemski ili lokalni upalni odgovor. Ovo otkriće pružilo je novu perspektivu u kojoj sastav crijevne mikrobiote dobiva dijagnostičku dimenziju te potencijalno može poslužiti kao prediktivni alat za razvoj plućnih komplikacija.

#### 4.2.4. RELAPS

Uz GvHD i posttransplantacijske infekcije, vodeći uzrok smrti bolesnika nakon alo-TKMS-a je relaps zloćudne bolesti. Rizični čimbenici za relaps mogu se grupirati u dvije skupine: oni povezani s liječenjem, odnosno s osnovnom bolešću (141). Intenzitet pretransplantacijskog kondicioniranja, izvor krvotvornih matičnih stanica, nepodudarnost alela HLA-DPB1, somatske mutacije gena i GvHD samo su neki od njih (142).

Uz mnoštvo bliskih interakcija sa susjednom crijevnom sluznicom i njenim sastavnicama, crijevna mikrobiota ostvaruje i niz, najčešće imunomodulacijskih, učinaka koji sežu izvan GIT-a. Nedavna istraživanja potvrdila su da neki od tih učinaka sudjeluju u oblikovanju imunološkog odgovora na antitumorsku terapiju. Ono može biti posredovano metaboličkom ili imunomodulacijskom ulogom mikrobiote. U prvom slučaju, svojim sudjelovanjem u metabolizmu određenog kemoterapeutika, mikrobiota djeluje i na njegovu farmakokinetiku te mijenja toksičnost lijeka, čime može pojačati ili smanjiti antitumorsko djelovanje citostatika (143). Osim djelovanja na farmakokinetiku lijeka, mikrobiota oblikuje i njegovu farmakodinamiku. Primjerice, aksenični ili antibioticima tretirani miševi posjedovali su smanjen broj Th17 stanica te slabiji odgovor na ciklofosamid, što sugerira da je antitumorsko djelovanje lijeka posredovano crijevnom mikrobiotom (144). Ciklofosamid svoj antitumorski učinak jednim dijelom ostvaruje poticanjem domaćiniovih izvršnih mehanizama imunološkog sustava, poput novačenja Th17 i

Th1 stanica, čiju aktivaciju omogućuje prijelaz bakterija iz lumena crijeva u sekundarne limfne organe. Također, mikrobiota može utjecati na mikrookoliš tumora mijenjajući razinu citokina i posljedično stupanj nekroze tumorskih stanica (145). Tumori miševa s antibioticima potaknutom disbiozom pokazali su značajno slabiji odgovor na imunoterapiju CpG-oligonukleotida što se pripisalo nepovoljnim mikrookolišem tumora s niskom zastupljenošću citokina te reaktivnih kisikovih spojeva. Oba istraživanja pokazala su važnost očuvane mikrobiote u ostvarivanju antitumorskih imunoloških odgovora.

S obzirom na postojanje komunikacije crijevne mikrobiote sa sistemskim imunološkim sustavom, kao i utjecajem na aloreaktivnost u sklopu GvHD-a, prirodno je za očekivati da bi mikrobiota mogla utjecati i na GvL učinak i posljedično posttransplantacijski relaps. Kako bi ispitali povezanosti između mikrobiote i relapsa, odnosno napredovanja osnovne bolesti, Peled i sur. osmislili su retrospektivno istraživanje s kohortom od 541 bolesnika u kojoj su 2 godine nakon alo-TKMS-a pratili ishod liječenja u ovisnosti sa strukturom mikrobiote analiziranom iz uzoraka stolica prikupljenih od 0. do 21. dana liječenja (142). Istraživanje je rezultiralo identifikacijom skupine bakterija koje se povezuju s manjim rizikom od relapsa/napredovanja bolesti. One su predominantno bile zastupljene u primatelja transplantata obogaćenih imunokompetentnim limfocitima T (u odnosu na primatelje presatka s manjkom T stanica), zbog čega bi mogle poslužiti kao bakterijski biomarker GvL-a. Zabilježena skupina bakterija bila je predvođena s *Eubacterium limosum*, uobičajenim članom anaerobne komenzalne mikrobiote, čiji su učinci poznati u kontekstu protuupalnog djelovanja na eksperimentalni model kolitisa (146), ali izravne mehanizme kojima *E.limosum* utječe na alo-TKMS još preostaje istražiti.

Unatoč nedostatku podataka o uzročno-posljedičnom odnosu određenih članova crijevne mikrobiote i relapsa osnovne bolesti, već i ovo otkriće bi se moglo iskoristiti kao potencijalni dijagnostički biomarker ili još važnije, kao potencijalna terapijska strategija (147).

## 5. MODIFIKACIJA MIKROBIOTE NAKON ALO-TKMS-a

Pojava sve većeg broja metabolomskih i metagenomskih istraživanja rasvijetlila je ulogu crijevne mikrobiote u razvoju niza komplikacija koje se javljaju tijekom alo-TKMS-a, a uz to znatno utječu i na povećavanje morbiditeta i mortaliteta. Shodno tome, pojavila se potreba za traganjem učinkovitih, ali istovremeno i sigurnih terapijskih pristupa, kojima bi se modificirao sastav mikrobiote te tako oporavila znatno narušena ravnoteža crijevne mikrobiote kakva se viđa u bolesnika liječenih s alo-TKMS-om. Budući da je smanjena raznolikost mikrobiote identificirana kao neovisni prediktor mortaliteta nakon alo-TKMS-a, osmišljavaju se preventivne ili terapijske metode temeljene na manipuliranju mikrobiote s ciljem poboljšanja ishoda liječenja i smanjenja smrtnosti. Pozitivni rezultati navedenih postupaka u zdravih osoba ili onih s različitim gastrointestinalnim bolestima dodatno su potaknuli razmišljanja o primjeni istih u posttransplantiranih pojedinaca. Metode kojima se oblikuje mikrobiota obuhvaćaju primjenu antibiotika, probiotika, prebiotika te postbiotika (148).

### 5.1. ANTIBIOTICI

S obzirom na to da su bolesnici u posttransplantacijskom razdoblju visoko osjetljivi na infekcije, primjena antibiotika svakako je neizbježna. Ipak, korisni učinci njihove primjene ograničeni su uklanjanjem korisnih mikroorganizama kao i rastućim trendom stvaranja antibiotske rezistencije. Navedeno bi se moglo izbjeći odabirom antibiotika s užim spektrom djelovanja, koji bi poštedjeli obligatne anaerobne bakterije s protuupalnim učincima, ili minimiziranjem trajanja primjene antibiotika, čime bi se potencijalno spriječio rast bakterija poput *A. muciniphila* koja šteti domaćinu tako što razgrađuje njegovu mucinsku ovojnica i olakšava prijelaz LPS-a i ostalih liganda bitnih za pokretanje upalnog odgovora GvHD-a (147). Važnost sužavanja spektra djelovanja potvrđuje i istraživanje koje je zabilježilo povezanost između primjene imipenem-cilastatina i piperacilin-tazobaktama, kao predstavnika antibiotika širokog spektra, s povećanim mortalitetom vezanim uz GvHD. S druge strane, nikakva slična povezanost s navedenim ishodom nije pronađena pri primjeni antibiotika s užim spektrom djelovanja poput cefepima ili aztreonama (149).

Danas se traga za antibioticima koji će održavati raznolikost crijevne mikrobiote, ne dovodeći do njene disbioze i komplikacija istih, a istovremeno neće povećavati osjetljivost prema infekcijama. Jedan od takvih je rifaximin, antibiotik čiji je djelotvoran učinak u bolesnika s upalnom bolesti crijeva potvrđen u nekoliko istraživanja (150). U bolesnika liječenih rifaximinom, u odnosu na one liječene kombinacijom ciprofloksacina i metronidazola, pronađene su znatno više razine 3-IS-a, metabolita čije su vrijednosti proporcionalne s bioraznolikošću mikrobiote, te smanjena dominacija enterokoka tijekom i nakon alo-TKMS-a, što pokazuje njegovu važnu ulogu u očuvanju raznovrsne mikrobiote. Također, u istih bolesnika registriran je i smanjen mortalitet vezan uz transplantaciju kao i povećano sveukupno preživljenje (151). Primjenom rifaximina povećala se čak i zastupljenost bakterija, poput *F.prausnitzii*, iz reda *Clostridiales* koji se povezuje sa smanjenim mortalitetom of GvHD-a (152).

## 5.2. PREBIOTICI

Primjena prebiotika podrazumijeva unos potpuno ili djelomično neprobavljivih ugljikohidrata, uglavnom oligosaharida, koji služe kao supstrati metaboličkih procesa komenzalne mikrobiote u kojima kao rezultat nastaju SCFA. Navedene kiseline znatno doprinose zdravlju domaćina, a u kontekstu alo-TKMS-a posebno je značajan njihov doprinos u poticanju lučenja protuupalnih citokina, održavanju cjelovitosti crijevne sluznice te imunosupresiji. Inulini, arabinoksilani i oligofruktoza, prebiotici su čiji su učinci na crijevnu mikrobiotu i posljedično na zdravlje čovjeka najčešće ispitivani (153). No potrebno je napomenuti da je velika većina kliničkih istraživanja obuhvaćala samo zdrave dobrovoljce, dok je do danas tek jedno retrospektivno istraživanje, ono Lyame i sur. ispitalo djelotvornost i sigurnost prebiotika u bolesnika podvrgnutih alo-TKMS-u (154). Bolesnici koji su primali enteralne pripravke obogaćene glutaminom, vlaknima te oligofruktozom, u odnosu na kontrolnu skupinu, prezentirali su se sa značajno smanjenim brojem dana umjerene te jake dijareje uz smanjen stupanj mukozitisa. Također, zabilježena je razlika u preživljenju između dviju skupina gdje je u onoj intervencijskoj ono iznosilo 100% u odnosu na 77% među bolesnicima u kojih je primjena prebiotika izostala. Naravno, potrebno je osmisliti i provesti znatno veća

prospektivna istraživanja s ciljem dodatnog ispitivanja uloge i sigurnosti primjene prebiotika tijekom alo-TKMS-a, a trenutno je u tijeku randomizirano kliničko istraživanje čiji je cilj analizirati učinke škroba na ishod alo-TKMS-a, pod hipotezom da je primjena škroba krumpira sposobna povisiti razine butirata i posljedično smanjiti rizik od akutnog GvHD-a (155).

### 5.3. PROBIOTICI I TRANSPLANTACIJA FEKALNE MIKROBIOTE

Primjena probiotika, kao postupka kojim se mijenja sastav mikrobiote, poznata je još od davnina, a ista uključuje izravan unos jednog ili više sojeva živih mikroorganizama s poznatim pozitivnim učincima po zdravlje domaćina. Mehanizmi probiotika temelje se na obnovi crijevne mikrobiote bakterijama koje će, svojim zaštitnim i imunomodulacijskim učincima, pružiti zaštitu od endogenih patobionata i egzogenih patogena, i pri tome stupanj upale u crijevima svesti na minimum. Već je dokazana učinkovitost probiotika u raznim upalnim i infektivnim stanjima GIT-a, uključujući antibioticima potaknutu dijareju, infektivni gastroenteritis, nekrotizirajući enterokolitis te sindrom iritabilnog kolona (156).

Jedna od relativno novijih probiotskih metoda je terapija transplantacijom fekalne mikrobiote (FMT). Za razliku od klasične oralne primjene probiotskih pripravaka, koji uglavnom sadrže jedan soj bakterija, FMT podrazumijeva postupak kojim se čitava mikrobiota porijeklom od zdravog davatelja, a sadržana u tekućem filtratu stolice, prenosi u gastrointestinalni sustav primatelja. Unos uzorka fecesa moguć je rektalno, putem kolonoskopskog katetera ili oralno, odnosno nazalno putem različitih endoskopskih sonda (157). Do danas, primjena FMT-a najiscrpnije je istražena u liječenju refraktorne infekcije povezane s *Clostridium difficile*, bolesti čija se patogeneza odvija na podlozi disbioze crijevne mikrobiote, uzrokovane prekomjernom uporabom antibiotika širokog spektra. Budući da se u takvim slučajevima FMT pokazao kao uspješna i sigurna intervencija (158), počela se razmatrati primjena i u drugim bolestima čiji nastanak posreduje crijevna disbioza. Kako su bolesnici liječeni s alo-TKMS-om identificirani kao populacija s vjerojatno najdramatičnijim poremećajima crijevne mikrobiote, a ujedno i s visokom pojavnosću *C. difficile* infekcija, FMT za njih svakako predstavlja potencijalno učinkovit terapijski pristup. Unatoč tome, postoji opravdani strah od šire primjene

FMT-a u navedenoj populaciji, uglavnom uslijed manjka istraživanja s visokom razinom dokaza o njenoj sigurnosti. Strahu pridonose i primijećene neželjene posljedice primjene FMT-a u bolesnika s upalnom bolesti crijeva, koje su se očitovale bakterijemijom ili pogoršanjem osnovne bolesti (159). Imajući na umu izraženu imunodeficijenciju te gastrointestinalnu ozljedu, kao jasnih rizičnih čimbenika za nastanak bakterijemije, u bolesnika tijekom alo-TKMS-a, jasno je da šira primjena FMT-a u toj populaciji još nije zaživjela. Ipak, rastući je broj prikaza slučajeva (160–162) koji su zabilježili učinkovitost i sigurnost primjene FMT-a u posttransplantacijskom razdoblju bolesnika opterećenih bolešću povezanom s *C.difficile*. Nadalje, nedavno kliničko istraživanje opisalo je liječenje steroid-rezistentnog GvHD-a FMT-om, uz potpuni ili djelomični oporavak, i to bez značajnijih štetnih događaja (163). Navedeni rezultati ukazuju na potrebu za daljnjim istraživanjima s ciljem traganja za minimiziranjem štetnosti, a zadržavanjem učinkovitosti ovog potencijalno novog terapijskog pristupa. Jasan uvid u sastav fekalne mikrobiote davatelja od posebne je važnosti za imunokompromitirane pacijente, budući da prisutnost ponekog patobionta predstavlja veliki rizik za bakterijemiju, odnosno sepsu. Pitanje optimalnog davatelja fekalne mikrobiote također ostaje neodgovoreno, a rasprava se vodi između davatelja krvotvornih matičnih stanica, drugih zdravih dobrovoljaca i srodnika. Moguća opcija bila bi i autologna FMT u kojoj bi davatelj i primatelj bile iste osobe, a uzorak stolice bolesnika bi se prikupljao prije početka liječenja, dok još ne nastupi disbioza crijevne mikrobiote. Iako postoje još brojna neodgovorena pitanja vezana uz FMT, a posebno uz njenu sigurnost za imunosuprimirane osobe te dugoročne učinke liječenja na sveukupno preživljenje bolesnika nakon alo-TKMS-a, mijenjanje mikrobiote kroz transplantaciju fekalnih uzoraka moglo bi zamijeniti dosadašnje zlatne standarde, s ograničenom učinkovitosti i nizom neželjenih posljedica (antibiotike i steroide), u liječenju posttransplantacijskih komplikacija.

Probiotska strategija s još sigurnijim i učinkovitijim djelovanjem u odnosu na FMT bila bi primjena sintetski dizajnirane mikrobiote koja bi obuhvaćala isključivo one bakterije s dokazanim pozitivnim učincima na zdravlje domaćina. Članovi takve mikrobiote svakako bi bile bakterije koje proizvode butirat, poput *Faecalibacterium prausnitzii* čija je primjena smanjila stupanj upalnog kolitisa u životinjskom modelu



(164), ili *Eubacterium limosum*, bakterije koja se povezuje sa smanjenim rizikom od relapsa ili napredovanja bolesti. Još iscrpnijim metagenomskim studijama, s ciljem otkrivanja uloga i ostalih članova crijevne mikrobiote, u budućnosti bi se mogla dizajnirati specifična mikrobiota za svaku patologiju vezanu uz njenu disbiozu, čime bi se pružio optimalan terapijski odgovor i na individualiziran način pristupilo svakom bolesniku.

#### 5.4. POSTBIOTICI

Pronalaskom uloge metaboloma u zdravlju i bolesti, svoje mjesto u postupcima oblikovanja mikrobiote našli su i postbiotici. Ova metoda podrazumijeva izravnu primjenu metaboličkih proizvoda mikrobiote, izuzimajući unos živih mikroorganizama. Upravo zbog te sterilnosti, postbiotske metode predstavljaju znatno sigurniji pristup tijekom i nakon alo-TKMS-a, ne predstavljajući rizik od bakterijemija. Učinkovitost takve metode potvrđuje istraživanje u kojemu se analizirao učinak sterilnih fekalnih filtrata na ponavljajuće infekcije *C.difficile* (165). Primjenom sterilnih fekalnih filtrata, s različitim metaboličkim proizvodima mikrobiote, nestali su simptomi infekcije svih 5 bolesnika u razdoblju od minimalno 6 mjeseci. Među svim metabolitima mikrobiote najviše se izdvajaju SCFA, a posebice acetat, propionat i butirat. U kontekstu alo-TKMS-a, Fujiwara i sur. pokazali su da primjena butirata i propionata smanjuje GvHD u miša i to putem aktivacije receptora GPR43 (166). Niz kliničkih istraživanja potvrdilo je značajan pad u zastupljenosti SCFA-a tijekom GvHD-a (167), podrazumijevajući njihove imunomodulacijske učinke kojima pružaju zaštitu od razvoja upalnih bolesti. Već se na nekoliko mjesta u ovome radu spominje važnost SCFA, ali ne treba zanemariti niti AhR ligande, kataboličke proizvode triptofana koje predominantno stvaraju *Lactobacillus* spp. Miševi s mutiranim receptorom AhR liganda ili oni s nemogućnošću stvaranja liganda pokazuju veću osjetljivost prema infekcijama, dok oni s urednom proizvodnjom pokazuju otpornost prema gram-negativnim bakterijama i *Candida* spp. (168). Osim metabolita triptofana, i oni izvedeni iz tirozina mogli bi imati ulogu u GvHD-u i uklopiti se u postbiotsku terapiju. Pretkliničko istraživanje (169) pokazuje manjak tirozina u miševa s GvHD-om te smanjen stupanj upale u onih u kojih je provedena nadoknada tirozina, što je potvrđeno i jednim kliničkim istraživanjem (170).

## 6. ZAKLJUČAK

Istraživanja u području metagenomike i metabolomike ljudskog GIT-a, kao znanstvenima granama čiji je cilj identificirati strukturu i funkciju crijevne mikrobiote i njenih metabolita, unaprijedila su znanja o patogenezi i liječenju mnogih dobroćudnih i zloćudnih bolesti čovjeka, a iznimka nisu ni hematološke bolesti. To se posebice odnosi na posttransplantacijske komplikacije u bolesnika koji se podvrgavaju alo-TKMS-u, a u čijem nastanku i pogoršanju može sudjelovati crijevna mikrobiota. Kao posljedica otkrivanja povezanosti između neuravnotežene mikrobiote crijeva i negativnog ishoda alo-TKMS-a, počinju se osmišljavati i primjenjivati različiti postupci za modifikaciju crijevne mikrobiote, poput FMT-a, kojima se mikrobiota vraća u svoje ravnotežno stanje. Bez obzira na postojanje pozitivne povezanosti između disbioze i mortaliteta vezanog uz liječenje alo-TKMS-a, izravnu uzročno-posljedičnu vezu tek treba utvrditi. Također, rezultati dosadašnjih kliničkih istraživanja trebali bi se potvrditi barem još nekolicinom prospektivnih randomiziranih studija, kako bi se utjecaj klimatskih čimbenika različitih podneblja na promatrani učinak isključio. Imajući na umu veličinu mikrobioma GIT-a čovjeka, zasigurno postoje još neidentificirani mikroorganizmi sa svojim manje poznatim funkcijama, čije će otkrivanje u budućnosti dati još jasniji uvid u ulogu mikrobiote u alo-TKMS-u. Time će se utvrditi stvarna vrijednost crijevne mikrobiote u dijagnozi, prognozi i liječenju oboljelih od hematoloških bolesti.

## 7. ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici, doc.dr.sc. Zinaidi Perić, na stručnim savjetima, trudu, uloženom vremenu i vodstvu tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala mojim roditeljima Krešimiru i Marici, sestri Tihani i ostatku obitelji na bezuvjetnoj ljubavi i podršci koju su mi pružali tijekom ovih šest godina studiranja. Zahvaljujem i svojim dragim prijateljima, a posebice Ivoni i Pauli, na svim savjetima, ohrabrivanju i vjeri u moj uspjeh. Veliko hvala mom najvećem osloncu, dečku Karlu, koji je uvijek tu za mene.

## 8. LITERATURA

1. Hawrelak JA, Myers SP. The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern Med Rev J Clin Ther.* 2004;9(2):180–97.
2. NEISH AS. Microbes in Gastrointestinal Health and Disease. *Gastroenterology.* 2009 Jan;136(1):65–80.
3. Gebbers JO, Laissue JA. Immunologic structures and functions of the gut. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 1989;131(5):221–38.
4. McFall-Ngai M. Adaptive immunity: care for the community. *Nature.* 2007 Jan 11;445(7124):153.
5. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 2006 Jul;7(7):688–93.
6. DeGruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflamm Bowel Dis.* 2016 May;22(5):1137–50.
7. Pascal M, Perez-Gordo M, Caballero T, Escribese MM, Lopez Longo MN, Luengo O, i sur. Microbiome and Allergic Diseases. *Front Immunol [Internet].* 2018 Jul 17 [pristupljeno 8.5.2021.];9:1584. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6056614/>
8. Ley RE. Obesity and the human microbiome. *Curr Opin Gastroenterol.* 2010 Jan;26(1):5–11.
9. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal Interactions of the Intestinal Microbiota and Immune System. *Nature.* 2012 Sep 13;489(7415):231–41.
10. Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, i sur. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science.* 2006 Jun 2;312(5778):1355–9.
11. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, i sur. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010 Mar 4;464(7285):59–65.
12. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, i sur. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science.* 2005 Jun 10;308(5728):1635–8.
13. Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Pace NR, Stahl DA. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol.* 1986;40:337–65.

14. Weinstock GM. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature*. 2012 Sep 13;489(7415):250–6.
15. Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, i sur. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol*. 2008 Apr;159(3):187–93.
16. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, i sur. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 29;107(26):11971–5.
17. Bager P, Wohlfahrt J, Westergaard T. Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disease: meta-analyses. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2008 Apr;38(4):634–42.
18. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biol* [Internet]. 2007 Jul [pristupljeno 8.5.2021.];5(7):e177. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1896187/>
19. Turnbaugh PJ, Quince C, Faith JJ, McHardy AC, Yatsunencko T, Niazi F, i sur. Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 20;107(16):7503–8.
20. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol Rev*. 2010 Jul 1;90(3):859–904.
21. Frank DN, St. Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug 21;104(34):13780–5.
22. Gordon JH, Dubos R. THE ANAEROBIC BACTERIAL FLORA OF THE MOUSE CECUM. *J Exp Med*. 1970 Aug 1;132(2):251–60.
23. Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL, Blumberg RS. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science*. 2016 Apr 29;352(6285):539–44.
24. Wrzosek L, Miquel S, Noordine M-L, Bouet S, Chevalier-Curt MJ, Robert V, i sur. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biol*. 2013 May 21;11:61.
25. Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic Bacteria Direct Expression of an Intestinal Bactericidal Lectin. *Science*. 2006 Aug 25;313(5790):1126–30.

26. Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, Young AN, Hobert ME, Karmali V, i sur. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I $\kappa$ B- $\alpha$  ubiquitination. *Science*. 2000 Sep 1;289(5484):1560–3.
27. Hill DA, Artis D. Intestinal Bacteria and the Regulation of Immune Cell Homeostasis. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:623–67.
28. Rescigno M, Di Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J Clin Invest*. 2009 Sep 1;119(9):2441–50.
29. Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993 Oct 22;75(2):263–74.
30. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, i sur. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009 Oct 29;461(7268):1282–6.
31. López-Boado YS, Wilson CL, Hooper LV, Gordon JI, Hultgren SJ, Parks WC. Bacterial Exposure Induces and Activates Matrilysin in Mucosal Epithelial Cells. *J Cell Biol*. 2000 Mar 20;148(6):1305–15.
32. Alakomi H-L, Skyttä E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Appl Environ Microbiol*. 2000 May;66(5):2001–5.
33. Banasaz M, Norin E, Holma R, Midtvedt T. Increased Enterocyte Production in Gnotobiotic Rats Mono-Associated with *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Jun;68(6):3031–4.
34. Yan F, Cao H, Cover TL, Washington MK, Shi Y, Liu L, i sur. Colon-specific delivery of a probiotic-derived soluble protein ameliorates intestinal inflammation in mice through an EGFR-dependent mechanism. *J Clin Invest*. 2011 Jun 1;121(6):2242–53.
35. Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15451–5.
36. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine. *Science*. 2001 Feb 2;291(5505):881–4.
37. Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, i sur. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr*. 2018;57(1):1–24.
38. Fattizzo B, Cavallaro F, Folino F, Barcellini W. Recent insights into the role of the microbiome in malignant and benign hematologic diseases. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021 Apr;160:103289.

39. Manzo VE, Bhatt AS. The human microbiome in hematopoiesis and hematologic disorders. *Blood*. 2015 Jul 16;126(3):311–8.
40. Young NS. APLASTIC ANEMIA. *N Engl J Med*. 2018 Oct 25;379(17):1643–56.
41. Zeng Y, Katsanis E. The complex pathophysiology of acquired aplastic anaemia. *Clin Exp Immunol*. 2015 Jun;180(3):361–70.
42. Espinoza JL, Elbadry MI, Nakao S. An altered gut microbiota may trigger autoimmune-mediated acquired bone marrow failure syndromes. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2016 Oct;171:62–4.
43. Wu H-J, Wu E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes*. 2012 Jan 1;3(1):4–14.
44. Lerner A, Aminov R, Matthias T. Dysbiosis May Trigger Autoimmune Diseases via Inappropriate Post-Translational Modification of Host Proteins. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 Feb 5 [pristupljeno 27.5.2021.];7:84. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4742538/>
45. Muller S, Radic M. Citrullinated Autoantigens: From Diagnostic Markers to Pathogenetic Mechanisms. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2015 Oct;49(2):232–9.
46. Chervonsky AV. Microbiota and Autoimmunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2013 Mar [pristupljeno 27.5.2021.];5(3):a007294. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3578358/>
47. Uribe-Herranz M, Klein-González N, Rodríguez-Lobato LG, Juan M, Fernández de Larrea C. Gut Microbiota Influence in Hematological Malignancies: From Genesis to Cure. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Jan 20 [pristupljeno 31.5.2021.];22(3):1026. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7864170/>
48. Yamamoto ML, Maier I, Dang AT, Berry D, Liu J, Ruegger PM, i sur. Intestinal bacteria modify lymphoma incidence and latency by affecting systemic inflammatory state, oxidative stress, and leucocyte genotoxicity. *Cancer Res*. 2013 Jul 15;73(14):4222–32.
49. Cozen W, Yu G, Gail MH, Ridaura VK, Nathwani BN, Hwang AE, i sur. Fecal microbiota diversity in survivors of adolescent/young adult Hodgkin lymphoma: a study of twins. *Br J Cancer*. 2013 Mar 19;108(5):1163–7.
50. Francis SS, Selvin S, Metayer C, Wallace AD, Crouse V, Moore TB, i sur. Mode of delivery and risk of childhood leukemia. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2014 May;23(5):876–81.
51. Rajagopala SV, Yooseph S, Harkins DM, Moncera KJ, Zabokrtsky KB, Torralba MG, i sur. Gastrointestinal microbial populations can distinguish pediatric and adolescent Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) at the time of

- disease diagnosis. *BMC Genomics* [Internet]. 2016 Aug 15 [pristupljeno 31.5.2021.];17:635. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4986186/>
52. Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, Kawashima T, Hudson MM, Meadows AT, i sur. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med*. 2006 Oct 12;355(15):1572–82.
  53. Chua LL, Rajasuriar R, Azanan MS, Abdullah NK, Tang MS, Lee SC, i sur. Reduced microbial diversity in adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia and microbial associations with increased immune activation. *Microbiome* [Internet]. 2017 Mar 20 [pristupljeno 31.5.2021.];5(1):35. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5359958/>
  54. Pflug N, Kluth S, Vehreschild JJ, Bahlo J, Tacke D, Biehl L, i sur. Efficacy of antineoplastic treatment is associated with the use of antibiotics that modulate intestinal microbiota. *Oncoimmunology* [Internet]. 2016 Apr 22 [pristupljeno 31.5.2021.];5(6):e1150399. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4938364/>
  55. Jagasia M, Arora M, Flowers MED, Chao NJ, McCarthy PL, Cutler CS, i sur. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2012 Jan 5;119(1):296–307.
  56. Holler E, Butzhammer P, Schmid K, Hundsrucker C, Koestler J, Peter K, i sur. Metagenomic Analysis of the Stool Microbiome in Patients Receiving Allogeneic Stem Cell Transplantation: Loss of Diversity Is Associated with Use of Systemic Antibiotics and More Pronounced in Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2014 May;20(5):640–5.
  57. Jenq RR, Ubeda C, Taur Y, Menezes CC, Khanin R, Dudakov JA, i sur. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med*. 2012 May 7;209(5):903–11.
  58. Jenq RR, van den Brink MRM. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010 Mar;10(3):213–21.
  59. Blijlevens N, Donnelly J, De Pauw B. Mucosal barrier injury: biology, pathology, clinical counterparts and consequences of intensive treatment for haematological malignancy: an overview. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25(12):1269–78.
  60. Stringer AM, Gibson RJ, Bowen JM, Logan RM, Ashton K, Yeoh AS, i sur. Irinotecan-induced mucositis manifesting as diarrhoea corresponds with an amended intestinal flora and mucin profile. *Int J Exp Pathol*. 2009 Oct;90(5):489–99.
  61. van Vliet MJ, Tissing WJE, Dun CAJ, Meessen NEL, Kamps WA, de Bont ESJM, i sur. Chemotherapy treatment in pediatric patients with acute



- myeloid leukemia receiving antimicrobial prophylaxis leads to a relative increase of colonization with potentially pathogenic bacteria in the gut. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2009 Jul 15;49(2):262–70.
62. Montassier E, Batard E, Massart S, Gastinne T, Carton T, Caillon J, i sur. 16S rRNA gene pyrosequencing reveals shift in patient faecal microbiota during high-dose chemotherapy as conditioning regimen for bone marrow transplantation. *Microb Ecol*. 2014 Apr;67(3):690–9.
  63. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006 Dec 21;444(7122):1027–31.
  64. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux J-J, i sur. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 28;105(43):16731–6.
  65. Montassier E, Batard E, Gastinne T, Potel G, de La Cochetière MF. Recent changes in bacteremia in patients with cancer: a systematic review of epidemiology and antibiotic resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2013 Jul;32(7):841–50.
  66. O'Hara AM, O'Regan P, Fanning Á, O'Mahony C, MacSharry J, Lyons A, i sur. Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology*. 2006 Jun;118(2):202–15.
  67. Ewaschuk JB, Diaz H, Meddings L, Diederichs B, Dmytrash A, Backer J, i sur. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*. 2008 Nov 1;295(5):G1025–34.
  68. Abderrahmani R, François A, Buard V, Tarlet G, Blirando K, Hneino M, i sur. PAI-1-Dependent Endothelial Cell Death Determines Severity of Radiation-Induced Intestinal Injury. *PLoS ONE [Internet]*. 2012 Apr 26 [pristupljeno 8.5.2021.];7(4):e35740. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3338537/>
  69. Delia P, Sansotta G, Donato V, Frosina P, Messina G, De Renzis C, i sur. Use of probiotics for prevention of radiation-induced diarrhea. *World J Gastroenterol*. 2007 Feb 14;13(6):912–5.
  70. Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, i sur. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J*. 2011 Feb;5(2):220–30.
  71. Papadopoulou A, Lloyd DR, Williams MD, Darbyshire PJ, Booth IW. Gastrointestinal and nutritional sequelae of bone marrow transplantation. *Arch Dis Child*. 1996 Sep;75(3):208–13.

72. Schulte C, Reinhardt W, Beelen D, Mann K, Schaefer U. Low T3-syndrome and nutritional status as prognostic factors in patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1998 Dec;22(12):1171–8.
73. Seguy D, Duhamel A, Rejeb MB, Gomez E, Buhl ND, Bruno B, i sur. Better outcome of patients undergoing enteral tube feeding after myeloablative conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation*. 2012 Aug 15;94(3):287–94.
74. Miyasaka E, Erb-Downward J, Falkowski N, Gilliland III M, Huffnagle G, Teitelbaum D. Total parenteral nutrition (TPN) in a mouse model leads to major population shifts in the intestinal microbiome. In 2011.
75. Jenq RR, Taur Y, Devlin SM, Ponce DM, Goldberg JD, Ahr KF, i sur. Intestinal *Blautia* is associated with reduced death from graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2015 Aug;21(8):1373–83.
76. Russell WR, Gratz SW, Duncan SH, Holtrop G, Ince J, Scobbie L, i sur. High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *Am J Clin Nutr*. 2011 May;93(5):1062–72.
77. Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, i sur. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*. 2016 Mar 1;65(3):426–36.
78. Engels EA, Ellis CA, Supran SE, Schmid CH, Barza M, Schenkein DP, i sur. Early infection in bone marrow transplantation: quantitative study of clinical factors that affect risk. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1999 Feb;28(2):256–66.
79. Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J*. 2007 May;1(1):56–66.
80. Robinson CJ, Young VB. Antibiotic administration alters the community structure of the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*. 2010;1(4):279–84.
81. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*. 2000 May 18;405(6784):299–304.
82. Smillie CS, Smith MB, Friedman J, Cordero OX, David LA, Alm EJ. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. *Nature*. 2011 Oct 30;480(7376):241–4.
83. Lange K, Buerger M, Stallmach A, Bruns T. Effects of Antibiotics on Gut Microbiota. *Dig Dis Basel Switz*. 2016;34(3):260–8.
84. Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, i sur. Intestinal Domination and the Risk of Bacteremia in Patients Undergoing

- Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2012 Oct 1;55(7):905–14.
85. Ubeda C, Taur Y, Jenq RR, Equinda MJ, Son T, Samstein M, i sur. Vancomycin-resistant Enterococcus domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest*. 2010 Dec 1;120(12):4332–41.
  86. Donskey CJ, Chowdhry TK, Hecker MT, Huyen CK, Hanrahan JA, Huger AM, i sur. EFFECT OF ANTIBIOTIC THERAPY ON THE DENSITY OF VANCOMYCIN-RESISTANT ENTEROCOCCI IN THE STOOL OF COLONIZED PATIENTS. *N Engl J Med*. 2000 Dec 28;343(26):1925–32.
  87. van der Waaij D, Vries JMB, der Wees JECL. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J Hyg (Lond)*. 1971 Sep;69(3):405–11.
  88. Brandl K, Plitas G, Mihu CN, Ubeda C, Jia T, Fleisher M, i sur. Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. *Nature*. 2008 Oct 9;455(7214):804–7.
  89. Kinnebrew MA, Ubeda C, Zenewicz LA, Smith N, Flavell RA, Pamer EG. Bacterial flagellin stimulates TLR5-dependent defense against vancomycin-resistant Enterococcus infection. *J Infect Dis*. 2010 Feb 15;201(4):534–43.
  90. Reddy P, Arora M, Guimond M, Mackall CL, Weisdorf D. GVHD: a continuing barrier to the safety of allogeneic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2008 Jan;15(1 Suppl):162–8.
  91. Choi SW, Levine JE, Ferrara JLM. Pathogenesis and Management of Graft versus Host Disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2010 Feb;30(1):75–101.
  92. Reddy P, Ferrara JLM. Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Blood Rev*. 2003 Dec;17(4):187–94.
  93. Hill GR, Ferrara JLM. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2000 May 1;95(9):2754–9.
  94. D'Amico F, Soverini M, Zama D, Consolandi C, Severgnini M, Prete A, i sur. Gut resistome plasticity in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Sci Rep*. 2019 Apr 4;9(1):5649.
  95. Eriguchi Y, Takashima S, Oka H, Shimoji S, Nakamura K, Uryu H, i sur. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of  $\alpha$ -defensins. *Blood*. 2012 Jul 5;120(1):223–31.

96. Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol.* 2000 Aug;1(2):113–8.
97. Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L, Hooper LV. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 30;105(52):20858–63.
98. Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, i sur. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature.* 2011 Jan 20;469(7330):415–8.
99. Hayase E, Hashimoto D, Nakamura K, Noizat C, Ogasawara R, Takahashi S, i sur. R-Spondin1 expands Paneth cells and prevents dysbiosis induced by graft-versus-host disease. *J Exp Med.* 2017 Dec 4;214(12):3507–18.
100. Taur Y, Jenq RR, Perales M-A, Littmann ER, Morjaria S, Ling L, i sur. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2014 Aug 14;124(7):1174–82.
101. Weber D, Oefner PJ, Hiergeist A, Koestler J, Gessner A, Weber M, i sur. Low urinary indoxyl sulfate levels early after transplantation reflect a disrupted microbiome and are associated with poor outcome. *Blood.* 2015 Oct 1;126(14):1723–8.
102. Bansal T, Alaniz RC, Wood TK, Jayaraman A. The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jan 5;107(1):228–33.
103. Tittsler RP, Sandholzer LA. The Bacteriostatic Action of Indole on Gram-Negative Enteric Bacilli and on Certain Cocci\*. *J Infect Dis.* 1935 Jul 1;57(1):64–9.
104. van Bekkum DW, Knaan S. Role of bacterial microflora in development of intestinal lesions from graft-versus-host reaction. *J Natl Cancer Inst.* 1977 Mar;58(3):787–90.
105. van Bekkum DW, Roodenburg J, Heidt PJ, van der Waaij D. Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora. *J Natl Cancer Inst.* 1974 Feb;52(2):401–4.
106. Storb R, Prentice RL, Buckner CD, Clift RA, Appelbaum F, Deeg J, i sur. Graft-versus-host disease and survival in patients with aplastic anemia treated by marrow grafts from HLA-identical siblings. Beneficial effect of a protective environment. *N Engl J Med.* 1983 Feb 10;308(6):302–7.
107. Vossen JM, Heidt PJ, van den Berg H, Gerritsen EJ, Hermans J, Dooren LJ. Prevention of infection and graft-versus-host disease by suppression of intestinal microflora in children treated with allogeneic bone marrow

- transplantation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 1990 Jan;9(1):14–23.
108. Beelen DW, Haralambie E, Brandt H, Linzenmeier G, Muller K-D, Quabeck K, i sur. Evidence That Sustained Growth Suppression of Intestinal Anaerobic Bacteria Reduces the Risk of Acute Graft-Versus-Host Disease After Sibling Marrow Transplantation. *Blood.* 1992 Nov 15;80(10):2668–76.
  109. Russell JA, Chaudhry A, Booth K, Brown C, Woodman RC, Valentine K, i sur. Early outcomes after allogeneic stem cell transplantation for leukemia and myelodysplasia without protective isolation: A 10-year experience. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2000 Mar;6(2):109–14.
  110. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiome shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009 May;9(5):313–23.
  111. Golob JL, Pergam SA, Srinivasan S, Fiedler TL, Liu C, Garcia K, i sur. Stool Microbiota at Neutrophil Recovery Is Predictive for Severe Acute Graft vs Host Disease After Hematopoietic Cell Transplantation. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2017 Dec 15;65(12):1984–91.
  112. Steck N, Hoffmann M, Sava IG, Kim SC, Hahne H, Tonkonogy SL, i sur. *Enterococcus faecalis* metalloprotease compromises epithelial barrier and contributes to intestinal inflammation. *Gastroenterology.* 2011 Sep;141(3):959–71.
  113. Kim SO, Sheikh HI, Ha S-D, Martins A, Reid G. G-CSF-mediated inhibition of JNK is a key mechanism for *Lactobacillus rhamnosus*-induced suppression of TNF production in macrophages. *Cell Microbiol.* 2006 Dec;8(12):1958–71.
  114. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, i sur. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature.* 2013 Dec 19;504(7480):446–50.
  115. Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, Duncan SH, Stewart CS, Henderson C, i sur. Phylogenetic Relationships of Butyrate-Producing Bacteria from the Human Gut. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Apr;66(4):1654–61.
  116. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, i sur. Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature.* 2013 Aug 8;500(7461):232–6.
  117. Finnie IA, Dwarakanath AD, Taylor BA, Rhodes JM. Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate. *Gut.* 1995 Jan;36(1):93–9.
  118. Mathewson ND, Jenq R, Mathew AV, Koenigsnecht M, Hanash A, Toubai T, i sur. Gut microbiome derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate Graft-versus-Host Disease. *Nat Immunol.* 2016 May;17(5):505–13.

119. Junghanss C, Marr KA, Carter RA, Sandmaier BM, Maris MB, Maloney DG, i sur. Incidence and outcome of bacterial and fungal infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A matched control study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002 Sep 1;8(9):512–20.
120. Almyroudis NG, Fuller A, Jakubowski A, Sepkowitz K, Jaffe D, Small TN, i sur. Pre- and post-engraftment bloodstream infection rates and associated mortality in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.* 2005 Mar;7(1):11–7.
121. Tamburini FB, Andermann TM, Tkatchenko E, Senchyna F, Banaei N, Bhatt AS. Precision Identification of Diverse Bloodstream Pathogens in the Gut Microbiome. *Nat Med.* 2018 Dec;24(12):1809–14.
122. Weinstock DM, Conlon M, Iovino C, Aubrey T, Gudiol C, Riedel E, i sur. Colonization, Bloodstream Infection, and Mortality Caused by Vancomycin-Resistant Enterococcus Early after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007 May 1;13(5):615–21.
123. Ford CD, Gazdik MA, Lopansri BK, Webb B, Mitchell B, Coombs J, i sur. Vancomycin-Resistant Enterococcus Colonization and Bacteremia and Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017 Feb 1;23(2):340–6.
124. Ubeda C, Bucci V, Caballero S, Djukovic A, Toussaint NC, Equinda M, i sur. Intestinal Microbiota Containing *Barnesiella* Species Cures Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Colonization. *Infect Immun.* 2013 Mar;81(3):965–73.
125. Ferreira RBR, Gill N, Willing BP, Antunes LCM, Russell SL, Croxen MA, i sur. The Intestinal Microbiota Plays a Role in Salmonella-Induced Colitis Independent of Pathogen Colonization. *PLoS ONE [Internet].* 2011 May 25 [pristupljeno 13.5.2021.];6(5):e20338. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3102097/>
126. Chopra T, Chandrasekar P, Salimnia H, Heilbrun LK, Smith D, Alangaden GJ. Recent epidemiology of *Clostridium difficile* infection during hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Transplant [Internet].* 2011 [pristupljeno 13.5.2021.];25(1):E82-7. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3860287/>
127. Kinnebrew MA, Lee YJ, Jenq RR, Lipuma L, Littmann ER, Gobourne A, i sur. Early *Clostridium difficile* Infection during Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *PLoS ONE [Internet].* 2014 Mar 24 [pristupljeno 13.5.2021.];9(3):e90158. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3963842/>
128. Reeves AE, Koenigsnecht MJ, Bergin IL, Young VB. Suppression of *Clostridium difficile* in the Gastrointestinal Tracts of Germfree Mice

- Inoculated with a Murine Isolate from the Family Lachnospiraceae. *Infect Immun*. 2012 Nov;80(11):3786–94.
129. Buffie CG, Bucci V, Stein RR, McKenney PT, Ling L, Gobourne A, i sur. Precision microbiome restoration of bile acid-mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature*. 2015 Jan 8;517(7533):205–8.
  130. Kang D-J, Ridlon JM, Moore DR, Barnes S, Hylemon PB. *Clostridium scindens* baiCD and baiH genes encode stereo-specific 7 $\alpha$ /7 $\beta$ -hydroxy-3-oxo- $\Delta$ 4-cholenoic acid oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1781(1–2):16–25.
  131. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. *Cell*. 2005 Jul 15;122(1):107–18.
  132. Khosravi A, Yáñez A, Price JG, Chow A, Merad M, Goodridge HS, i sur. Gut microbiota promotes hematopoiesis to control bacterial infection. *Cell Host Microbe*. 2014 Mar 12;15(3):374–81.
  133. Boiko JR, Borghesi L. Hematopoiesis sculpted by pathogens: Toll-like receptors and inflammatory mediators directly activate stem cells. *Cytokine*. 2012 Jan;57(1):1–8.
  134. Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, Zhou AY, Yu Y, Weiser JN. Recognition of Peptidoglycan from the Microbiota by Nod1 Enhances Systemic Innate Immunity. *Nat Med*. 2010 Feb;16(2):228–31.
  135. Takizawa H, Regoes RR, Boddupalli CS, Bonhoeffer S, Manz MG. Dynamic variation in cycling of hematopoietic stem cells in steady state and inflammation. *J Exp Med*. 2011 Feb 14;208(2):273–84.
  136. Staffas A, da Silva MB, Slingerland AE, Lazrak A, Bare CJ, Holman CD, i sur. Nutritional support from the intestinal microbiota improves hematopoietic reconstitution after bone marrow transplantation in mice. *Cell Host Microbe*. 2018 Apr 11;23(4):447–457.e4.
  137. Peters SG, Afessa B. Acute lung injury after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Chest Med*. 2005 Dec;26(4):561–9, vi.
  138. Madan JC, Koestler DC, Stanton BA, Davidson L, Moulton LA, Housman ML, i sur. Serial Analysis of the Gut and Respiratory Microbiome in Cystic Fibrosis in Infancy: Interaction between Intestinal and Respiratory Tracts and Impact of Nutritional Exposures. *mBio* [Internet]. 2012 Aug 21 [pristupljeno 13.5.2021.].3(4):e00251-12. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3428694/>
  139. Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Oct;108(4):516–20.

140. Harris B, Morjaria SM, Littmann ER, Geyer AI, Stover DE, Barker JN, i sur. Gut Microbiota Predict Pulmonary Infiltrates after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Aug 15;194(4):450–63.
141. Ossenkoppele GJ, Janssen JJWM, van de Loosdrecht AA. Risk factors for relapse after allogeneic transplantation in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2016 Jan;101(1):20–5.
142. Peled JU, Devlin SM, Staffas A, Lumish M, Khanin R, Littmann ER, i sur. Intestinal Microbiota and Relapse After Hematopoietic-Cell Transplantation. *J Clin Oncol*. 2017 May 20;35(15):1650–9.
143. Wallace BD, Wang H, Lane KT, Scott JE, Orans J, Koo JS, i sur. Alleviating Cancer Drug Toxicity by Inhibiting a Bacterial Enzyme. *Science*. 2010 Nov 5;330(6005):831–5.
144. Viaud S, Saccheri F, Mignot G, Yamazaki T, Daillère R, Hannani D, i sur. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science*. 2013 Nov 22;342(6161):971–6.
145. Iida N, Dzutsev A, Stewart CA, Smith L, Bouladoux N, Weingarten RA, i sur. Commensal Bacteria Control Cancer Response to Therapy by Modulating the Tumor Microenvironment. *Science*. 2013 Nov 22;342(6161):967–70.
146. Kanauchi O, Fukuda M, Matsumoto Y, Ishii S, Ozawa T, Shimizu M, i sur. *Eubacterium limosum* ameliorates experimental colitis and metabolite of microbe attenuates colonic inflammatory action with increase of mucosal integrity. *World J Gastroenterol WJG*. 2006 Feb 21;12(7):1071–7.
147. Shono Y, van den Brink MRM. Gut microbiota injury in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Nat Rev Cancer*. 2018 May;18(5):283–95.
148. Peled JU, Jenq RR, Holler E, van den Brink MRM. Role of gut flora after bone marrow transplantation. *Nat Microbiol*. 2016 Mar 29;1:16036.
149. Shono Y, Docampo MD, Peled JU, Perobelli SM, Velardi E, Tsai JJ, i sur. Increased GVHD-related mortality with broad-spectrum antibiotic use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in human patients and mice. *Sci Transl Med*. 2016 May 18;8(339):339ra71.
150. Prantera C, Lochs H, Campieri M, Scribano ML, Sturniolo GC, Castiglione F, i sur. Antibiotic treatment of Crohn's disease: results of a multicentre, double blind, randomized, placebo-controlled trial with rifaximin. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;23(8):1117–25.
151. Weber D, Oefner PJ, Dettmer K, Hiergeist A, Koestler J, Gessner A, i sur. Rifaximin preserves intestinal microbiota balance in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2016 Aug;51(8):1087–92.



152. Maccaferri S, Vitali B, Klinder A, Kolida S, Ndagijimana M, Laghi L, i sur. Rifaximin modulates the colonic microbiota of patients with Crohn's disease: an in vitro approach using a continuous culture colonic model system. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Dec;65(12):2556–65.
153. Andermann TM, Rezvani A, Bhatt AS. Microbiota Manipulation With Prebiotics and Probiotics in Patients Undergoing Stem Cell Transplantation. *Curr Hematol Malig Rep.* 2016 Feb;11(1):19–28.
154. Iyama S, Sato T, Tatsumi H, Hashimoto A, Tatekoshi A, Kamihara Y, i sur. Efficacy of Enteral Supplementation Enriched with Glutamine, Fiber, and Oligosaccharide on Mucosal Injury following Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Case Rep Oncol.* 2014 Oct 22;7(3):692–9.
155. University of Michigan Rogel Cancer Center. Dietary Manipulation of the Microbiome-metabolomic Axis for Mitigating GVHD in Allo HCT Patients [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2020 Dec [pristupljeno 11.5.2021.]. Report No.: NCT02763033. Dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02763033>
156. Vitetta L, Briskey D, Alford H, Hall S, Coulson S. Probiotics, prebiotics and the gastrointestinal tract in health and disease. *Inflammopharmacology.* 2014 Jun;22(3):135–54.
157. Scott KP, Antoine J-M, Midtvedt T, van Hemert S. Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease. *Microb Ecol Health Dis* [Internet]. 2015 Feb 2 [pristupljeno 17.5.2021.];26:25877. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4315778/>
158. Drekonja D, Reich J, Gezahegn S, Greer N, Shaukat A, MacDonald R, i sur. Fecal Microbiota Transplantation for *Clostridium difficile* Infection: A Systematic Review. *Ann Intern Med.* 2015 May 5;162(9):630–8.
159. Ianiro G, Bibbò S, Scaldaferrì F, Gasbarrini A, Cammarota G. Fecal Microbiota Transplantation in Inflammatory Bowel Disease: Beyond the Excitement. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2014 Oct 17 [pristupljeno 17.5.2021];93(19):e97. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4616323/>
160. Neemann K, Eichele DD, Smith PW, Bociek R, Akhtari M, Freifeld A. Fecal microbiota transplantation for fulminant *Clostridium difficile* infection in an allogeneic stem cell transplant patient. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.* 2012 Dec;14(6):E161-165.
161. de Castro CG, Ganc AJ, Ganc RL, Petrolli MS, Hamerschlack N. Fecal microbiota transplant after hematopoietic SCT: report of a successful case. *Bone Marrow Transplant.* 2015 Jan;50(1):145.
162. Mittal C, Miller N, Meighani A, Hart BR, John A, Ramesh M. Fecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection after peripheral autologous stem cell transplant for diffuse large B-cell lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* 2015 Jul;50(7):1010.

163. Kakahana K, Fujioka Y, Suda W, Najima Y, Kuwata G, Sasajima S, i sur. Fecal microbiota transplantation for patients with steroid-resistant acute graft-versus-host disease of the gut. *Blood*. 2016 Oct 20;128(16):2083–8.
164. Miquel S, Martín R, Rossi O, Bermúdez-Humarán LG, Chatel JM, Sokol H, i sur. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol*. 2013 Jun;16(3):255–61.
165. Ott SJ, Waetzig GH, Rehman A, Moltzau-Anderson J, Bharti R, Grasis JA, i sur. Efficacy of Sterile Fecal Filtrate Transfer for Treating Patients With *Clostridium difficile* Infection. *Gastroenterology*. 2017 Mar 1;152(4):799-811.e7.
166. Fujiwara H, Docampo MD, Riwes M, Peltier D, Toubai T, Henig I, i sur. Microbial metabolite sensor GPR43 controls severity of experimental GVHD. *Nat Commun*. 2018 Sep 10;9(1):3674.
167. Masetti R, Zama D, Leardini D, Muratore E, Turrone S, Brigidi P, i sur. Microbiome-Derived Metabolites in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Jan 26 [pristupljeno 17.5.2021];22(3):1197. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7865777/>
168. Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, De Luca A, Giovannini G, Pieraccini G, i sur. Tryptophan Catabolites from Microbiota Engage Aryl Hydrocarbon Receptor and Balance Mucosal Reactivity via Interleukin-22. *Immunity*. 2013 Aug 22;39(2):372–85.
169. Li X, Lin Y, Li X, Xu X, Zhao Y, Xu L, i sur. Tyrosine supplement ameliorates murine aGVHD by modulation of gut microbiome and metabolome. *EBioMedicine* [Internet]. 2020 Oct 8 [pristupljeno 17.5.2021];61:103048. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7553238/>
170. Reikvam H, Hatfield K, Bruserud Ø. The pretransplant systemic metabolic profile reflects a risk of acute graft versus host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Metabolomics* [Internet]. 2016 [pristupljeno 17.5.2021];12(1):12. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5080330/>

## 9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 25.09.1995. u Požegi gdje sam završila osnovnu te srednju školu (gimnazija, matematički smjer) s odličnim uspjehom. Paralelno sam pohađala osnovnu i srednju glazbenu školu (smjer klavir). Tijekom školovanja sudjelovala sam na županijskim natjecanjima iz geografije, fizike i biologije. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2015. godine. 2021. godine aktivno sam sudjelovala na studentskoj konferenciji Juvenes pro medicina, s prikazom slučaja „Peptide receptor radionuclide therapy for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumor recurrence in patient who underwent liver transplantation“, čiji je sažetak objavljen u kongresnoj Book of abstracts. Iste godine sudjelovala sam na konferenciji u Cracowu s e-posterom pod nazivom „Spondylodiscitis as complication of aortic valve endocarditis in patient with intracardiac device“. Aktivno govorim i pišem engleski jezik. Informatički sam pismena.