

# Crijevana mikrobiota kod djece s akutnim leukemijama

---

Ujaković, Vid

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:105:105589>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**  
**SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI**  
**STUDIJ MEDICINE**

**Vid Ujaković**

**Crijevna mikrobiota kod djece s akutnim leukemijama**

**Diplomski rad**



Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Kliničkom bolničkom centru Zagreb u Klinici za pedijatriju, Zavodu za pedijatrijsku hematologiju i onkologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof.dr.sc. Ernesta Bilića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2023./2024.

## SADRŽAJ

POPIS I OBJAŠNENJE KRATICA.....	1
SAŽETAK.....	1
SUMMARY.....	1
1. UVOD.....	1
1.1. LEUKEMIJE.....	1
1.2. AKUTNA LIMFOBLASTIČNA LEUKEMIJA.....	1
1.3. AKUTNA MIJELOIČNA LEUKEMIJA.....	4
1.4. OSNOVNI POJMOVI VEZANI UZ ANALIZU SASTAVA MIKROBIOTE.....	6
1.5. NORMALAN RAZVOJ MIKROBIOTE DJETETA.....	8
2. PREGLED LITERATURE.....	10
2.1. POVEZANOST AKUTNIH LEUKEMIJA I ČIMBENIKA OKOLIŠA.....	10
2.2. UZROCI CRIJEVNE DISBIOZE U DJECE.....	12
2.3. MIKROBIOTA DJECE PRI DIJAGNOZI ALL-A.....	14
2.4. METABOLIČKE I IMUNOSNE POSLJEDICE PROMIJENJENE MIKROBIOTE.....	17
2.5. CRIJEVNA MIKROBIOTA I KEMOTERAPIJA.....	18
2.6. CRIJEVNA MIKROBIOTA I ANTIBIOTICI.....	20
2.7. CRIJEVNA MIKROBIOTA I HSCT.....	23
2.8. DUGOROČNE POSLJEDICE CRIJEVNE DISBIOZE.....	36
3. RASPRAVA.....	38
3.1. ISTRAŽIVANJA POVEZANOSTI DISBIOZE I AKUTNIH LEUKEMIJA.....	38
3.2. TRADICIONALNE METODE MODIFIKACIJE CRIJEVNE FLORE.....	39
3.3. SUVREMENE METODE MODIFIKACIJE CRIJEVNE FLORE.....	40
4. ZAKLJUČAK.....	46
5. ZAHVALE.....	47
6. LITERATURA.....	48
7. ŽIVOTOPIS.....	64

## Popis i objašnjenje kratica

ABC transporter – transporter koji veže adenozin-trifosfat (engl. *ATP-binding cassette transporter*)

AIC – protuupalne klostridije (engl. *anti-inflammatory Clostridia*)

AID – aktivacijom inducirana citozinska deaminaza (engl. *Activation-induced cytidine deaminase*)

ALL – akutna limfoblastična leukemija

ALP – alkalna fosfataza

AML – akutna mijeloična leukemija

APC – antigen-prezentirajuće stanice (engl. *antigen-presenting cells*)

ARB – bakterije rezistentne na antibiotike (engl. *antimicrobial resistant bacteria*)

ATG – anti-timocitni globulin

CAR-T – terapija T-stanicama s kimeričnim receptorima (engl. *chimeric Antigen Receptor T-cell therapy*)

CMV - citomegalovirus

CRP - C-reaktivni protein

cGVHD/aGVHD/GVHD – kronična/akutna bolest presatka protiv domaćina (engl. *graft-versus-host disease*)

CML – kronična mijeloična leukemija

DIK - diseminirana intravaskularna koagulacija

DM – *diabetes mellitus*

ECIL – Europska konferencija o infekcijama prilikom leukemija (engl. *European Conference on Infections in Leukemia*)

EBV - *Epstein-Barr* virus

FISH – fluorescentna *in situ* hibridizacija (engl. *fluorescence in situ hybridization*)

FMT – transplantacija fekalne mikrobiote (engl. *fecal microbiota transplantation*)

FUO – vrućica nepoznatog uzroka (engl. *fever of unknown origin*)

GI trakt – gastrointestinalni trakt

GM-CSF – faktor rasta granulocita i monocita (engl. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

GPR43 – receptor povezan s G-proteinom 43 (engl. *G protein-coupled receptor 43*)

GOS/FOS – galaktooligosaharidi/fruktooligosaharidi

GVLR – reakcija presatka protiv leukemije (engl. *graft-versus-leukemia reaction*)

HDAC – histonske deacetilaze (engl. *histone deacetylase*)

HLA kompleks – kompleks antigena ljudskih leukocita (engl. *human leukocyte antigen complex*)

HMO – oligosaharidi ljudskog mlijeka (engl. *human milk oligosaccharides*)

HSCT – transplantacija matičnih hematopoetskih stanica (engl. *hematopoietic stem cell transplantation*)

IFN- $\gamma$  – interferon gama

IL-1, 1R, 2, 6, 10 – interleukin-1,2,6,10; interleukin-1 receptor

IPP – inhibitor protonske pumpe

JAK/STAT put – signalni put Janus kinaze/prijenosnika signala i aktivacije transkripcije (engl. *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathway*)

KVB - kardiovaskularna bolest

MAMP – molekularni obrazac povezan s mikroorganizmima (engl. *microbe-associated molecular pattern*)

MDSC – mijeloidne supresorske stanice (engl. *myeloid-derived suppressor cell*)

MEK – mitogenom aktivirana proteinska kinaza kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase kinase*)

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

mRNA – glasnička RNA (engl. *messenger RNA*)

mTOR inhibitori – inhibitori ciljne molekule rapamicina u sisavaca (engl. *mammalian target of rapamycin inhibitors*)

NLRP3 – NOD-sličan receptor s pirinskom domenom 3 (engl. *NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3*)

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

NF- $\kappa$ B – nuklearni faktor kappa beta (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

PNET – primitivni neuroektodermalni tumor

PDGF – faktor rasta trombocita (engl. *platelet-derived growth factor*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PT-Cy – posttransplantacijski ciklofosfamid (engl. *post-transplant cyclophosphamide*)

RAG protein – protein koji aktivira rekombinaciju (engl. *recombination-activating gene protein*)

RCT – randomizirano kliničko istraživanje (engl. *randomized controlled trial*)

ROS – reaktivne vrste kisika (engl. *reactive oxygen species*)

RT-PCR – lančana reakcija polimerazom uz upotrebu reverzne transkriptaze (engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*)

SCFA – masne kiseline kratkog lanca (engl. *short-chain fatty acids*)

STORMS sustav – sustav prijavljivanja studija u području ljudskog mikrobioma (engl. *Strengthening The Organizing and Reporting of Microbiome Studies*)

SŽS – središnji živčani sustav

TGF- $\beta$  – transformirajući faktor rasta beta (engl. *Transforming Growth Factor beta*)

TNF- $\alpha$  – faktor tumorske nekroze alfa (engl. *Tumor necrosis factor alpha*)

TMP-SMX – trimetoprim i sulfametoksazol (engl. *Trimethoprim-Sulfamethoxazole*)

V(D)J rekombinacija – preslagivanje gena koje uključuje varijabilni, raznoliki i spojni dio gena (engl. *Variable (diversity) joining gene rearrangement*)

VZV - *Varicella-Zoster* virus

WMW test - Wilcoxon-Mann-Whitney test

## Sažetak

### Crijevna mikrobiota kod djece s akutnim leukemijama

Vid Ujaković

Akutne leukemije predstavljaju najčešću dječju malignost, a definiramo ih kao bolesti, koje karakterizira zastoj sazrijevanja i diferencijacije uz nekontrolirano dijeljenje malignih stanica limfocitnog ili mijeloidnog reda. Znajući da se i do 5% živorođene djece rađa s određenim mutacijama, koje predisponiraju za razvoj leukemije, a samo malen broj ovakve djece i oboli, počeo se razmatrati utjecaj okolišnih čimbenika u *two-hit* modelima razvoja leukemija. Prva teorija je bila tzv. „hipoteza odgođene infekcije“ koja se temeljila na pretpostavci da bi infekcije mogle predisponirati razvoju leukemija, uzevši u obzir sličnu dob vrhunca incidencije, u usporedbi s drugim bolestima uz koje vežemo izlaganje stranim antigenima, poput alergija. *V(D)J* rekombinacija predstavlja glavnu postnatalnu genetsku modifikaciju B-limfocita, no ipak pokazalo se da ona sama nije dovoljna za razvoj malignog klona, nego je potrebna i određena sklonost prema patološkom upalnom odgovoru. Znajući da je imunološki trening B-limfocita usko povezan s crijevnom florom i da su svi čimbenici, koji utječu na smanjenu raznolikost crijevnog flore djeteta (carski rez, izostanak dojenja, socijalna izolacija i antibiotici), povezani s povećanim rizikom od leukemija, smatra se da bi upravo crijevna disbioza mogla biti sekundarni čimbenik u *two-hit* modelima. Prilikom izrade ovog rada, prvo sam se osvrnuo na fiziološki razvoj crijevnog mikrobiote djeteta i na to kako pojedini čimbenici okoliša ometaju tok razvoja crijevnog flore. Nakon toga, bavio sam se crijevnom florom u trenutku postavljanja dijagnoze, a potom i interakcijom između kemoterapijskih protokola, antibiotika, razvoja GVHD-a i crijevnog flore. Naposljetku, bavio sam se metodama modifikacije flore poput FMT-a, pro-, pre- i postbiotika te racionalnog korištenja antibiotika.

**Ključne riječi:** *akutne leukemije, crijevna disbioza, okoliš i patogeneza leukemija, crijevna flora u liječenju leukemija, metode modifikacije crijevnog flore*



## Summary

Intestinal microbiota in children with acute leukemias

Vid Ujaković

Acute leukemias represent the most common childhood malignancy. They are defined as diseases characterized by arrested maturation and differentiation, accompanied by uncontrolled proliferation of malignant cells of lymphocytic or myeloid origin. Recognizing that up to 5% of newborns harbor mutations predisposing them to leukemia development and that only a fraction of those develop leukemia, the influence of environment in *two-hit* models of leukemia development has been contemplated. The initial theory, the "delayed infection hypothesis," proposed that infections predispose to leukemia development. This theory considered a shared age peak of incidence with other diseases linked to exposure to foreign antigens, such as allergies. While the *V(D)J* recombination represents a major postnatal genetic modification of B lymphocytes, it is thought that this process alone is insufficient for the development of the malignant clone. Rather, a predisposition to a pathological inflammatory response is required. Understanding the association between the immune training of B lymphocytes and the gut flora, and considering factors diminishing the diversity of gut flora (e.g., cesarean delivery, lack of breastfeeding, social isolation and antibiotics), it has been proposed that gut dysbiosis might be a secondary factor in *two-hit* models. This paper delves into the development of the gut flora and explores how specific factors disrupt this process. Subsequently, it addresses gut dysbiosis at the time of diagnosis, followed by an insight into the interplay between chemotherapy, antibiotics, GVHD and gut flora. Finally, it examines methods of modifying gut flora, such as FMT, pro-, pre- and postbiotics, as well as the rational use of antibiotics.

**Key words:** *acute leukemias, gut dysbiosis, environment and leukemia development, gut flora in leukemia treatment, methods of gut flora modification*

## **1. Uvod**

### **1.1. Leukemije**

Leukemije su bolesti koje karakterizira zastoj sazrijevanja i diferencijacije stanica uz nekontrolirano dijeljenje i bujanje malignih stanica limfocitnog ili mijeloidnog reda. Leukemije predstavljaju najčešću dječju malignost, sudjelujući u ukupnom broju s udjelom od 30%. U djece do 15 godina života 97% leukemija su akutne, a 3% kronične. U djece nalazimo 3 glavna tipa leukemija: akutna limfoblastična leukemija (ALL), akutna mijeloična leukemija (AML) i kronična mijeloična leukemija (CML). ALL je najčešći podtip, javlja se u 80% slučajeva, AML se javlja u 15% slučajeva, dok je CML najrjeđi. Kronične limfocitne leukemije nema u dječjoj dobi.(1) Unutar AML-a i ALL-a postoje brojni podtipovi obzirom na morfologiju, imunofenotip i gensku ekspresiju koji značajno utječu na biološke karakteristike leukemije, kliničku prezentaciju, metode liječenja i na samu prognozu. Današnja suvremena terapija akutnih leukemija je individualna i prilagođena riziku pacijenta, što je dovelo do značajnog pomaka u preživljenju. Ipak, relapsi bolesti, komplikacije koje se javljaju uslijed samog liječenja, uslijed imunosupresije, te komplikacije koje se javljaju i godinama nakon kao trajna posljedica učinaka novih ciljanih i imunoterapijskih metoda i dalje predstavljaju značajan izazov u dijagnostici i terapijskom pristupu.(2)

### **1.2. Akutna limfoblastična leukemija**

Akutna limfoblastična leukemija je maligna proliferacija limfatičnih stanica u ranom stadiju diferencijacije koja može zahvatiti krv, koštanu srž i ekstramedularna sjela. Incidencija bolesti je 2018. godine u SAD-u iznosila 1,57 na 100 000, a te godine je registrirano 5960 novooboljelih i 1470 smrti. Dobno-specifična incidencija najveća je u dobi od 1-4 godine nakon čega naglo pada kroz djetinjstvo i adolescenciju te doseže najnižu razinu između 25-45

godina.(3) Omjer oboljelih muškaraca i žena iznosi 1,2:1 , a 60% svih slučajeva pojavljuje se u osoba mlađih od 20 godina.(4)

ALL se uglavnom pojavljuje *de novo*, kod zdravih individua, iako postoje određeni okolišni faktori i genske sklonosti koji utječu na pojavu bolesti. Brojne epidemiološke studije pokazale su da leukemija može biti inicirana već *in utero*, što je dokazano na primjeru jednojajčanih blizanaca s akutnim leukemijama.(5) Stoga, izloženost određenim faktorima rizika tijekom trudnoće i djetinjstva može biti povezana s povećanim rizikom za razvoj leukemije. U prvom redu tu spadaju izloženost ionizirajućem zračenju, pesticidima i infekcijama *in utero* i u ranom djetinjstvu. Što se tiče genetskih faktora rizika, možemo ih podijeliti na sindromske i na rekurirajuće kromosomske alteracije. ALL je povezan s određenim sindromima poput sindroma Down, Fanconijeve anemije i sindroma Ataksije-teleangiektazije. Kromosomske alteracije koje nalazimo u B-imunofenotipu ALL-a možemo podijeliti na češće s boljom prognozom poput visoke hiperploidijske (>5 dodatnih kromosoma, javlja se u 25% djece), *ETV6-RUNX1* fuzije uz translokaciju *t(12;21)* (javlja se u 30% djece) i na one rjeđe sa lošijom prognozom poput hipoploidije i *KMT2A/MLL* preslagivanja (1% djece) te *BCR-ABL1* Philadelphia kromosoma (10% djece). U T-imunofenotipu ALL-a nalazimo mutacije *p16* i *p14* gena na *CDKN2A* lokusu koji sudjeluju u NOTCH signalnom putu (70% djece) te mutacije gena koji kodiraju za podjedinice *TCR* (50% djece).(6)

Pacijenti u pedijatrijskoj populaciji se najčešće prezentiraju infiltrativnim (hepatomegalija, splenomegalija), hematološkim (modrice, sklonost krvarenju iz sluznica), infektivnim (vrućica), lokomotornim (bol u mišićima i kostima udova) te općim simptomima (umor, malaksalost, anoreksija i gubitak težine).(7)

Dijagnoza ALL-a se postavlja kad je citomorfološkom analizom aspirata koštana srži utvrđena prisutnost više od 25% malignih blasta, a temelji se na smjernicama WHO iz 2016. koja dijeli podtipove ALL-a s obzirom na morfologiju, imunofenotip te citogenetiku i genetiku stanica.

Morfološka analiza limfocita može potvrditi prisutnost u perifernoj krvi ili invaziju koštane srži dok je imunofenotipizacija zlatni standard dijagnostike, ona nam omogućuje da utvrdimo ishodišnu lozu u svrhu klasifikacije, što je bitno za prognozu i terapiju, te nam također pomaže u potrazi za minimalnom rezidualnom bolešću nakon liječenja.(6) Najčešće se radi o *common* imunofenotipu gdje dolazi do zastoja u razvoju na razini „pre B“ limfocita, a ovaj imunofenotip je karakteriziran CD10 biljgom, dobrom prognozom i javlja se u 80-85% slučajeva. U 10-15% slučajeva radi se o T-imunofenotipu koji karakterizira lošija prognoza i tipična klinička slika dječaka u pubertetu s povećanim mediastinalnim limfnim čvorovima i hiperleukocitozom. Oko 1% slučajeva čini „zreli“ B imunofenotip izrazito loše prognoze.(1) Svakom bolesniku bi trebalo napraviti konvencionalnu citogenetiku, odnosno kariogram, uz nadopunu FISH-om ili RT-PCR-om. Konvencionalnom citogenetikom pronaći ćemo kromosomske alteracije, a FISH-om i RT-PCR-om prognostički značajne translokacije. Upotreba protočne citometrije i NGS-a predstavlja nove dijagnostičke pravce u dijagnostici ALL-a. (8)

Povoljne prognostičke faktore dijelimo na one od strane bolesnika (mlađa dob, ženski spol, bijela ili žuta rasa), od strane same bolesti (bez zahvaćanja SŽS-a i manje od  $50 \times 10^9$  leukocita pri dijagnozi, B imunofenotip, hiperploidija i povoljne translokacije) te na faktore od strane odgovora na terapiju (MRD postignuta već pri indukciji terapije). (6)

Standardna terapija ALL-a se obavlja u 4 faze: indukcija, konsolidacija, intenzifikacija te dugotrajna terapija održavanja. Alogeni HSCT koristi se kod bolesnika visokog rizika, relapsa bolesti ili bolesnika s perzistentnom MRD. Ovim terapijskim režimom postignuto je 5-godišnje preživljenje od 90% u djece, dok je kod odraslih značajno manje. Cilj indukcije je postići remisiju i uspostaviti fiziološku hematopoezu. U tu svrhu koriste se kombinacija glukokortikoida (prednizon ili deksametazon) te vinkristina, L-asparaginaze i antraciklina (daunorubicin ili doksorubicin). Tijekom konsolidacijske faze cilj je spriječiti povrat bolesti koristeći kratke intervale davanja kemoterapije svaka 2 tjedna tijekom 12 tjedana. Koriste se

visoke doze metotreksata ( $>500 \text{ mg/m}^2$ , uz nadomjestak folata), asparaginaza, glukokortikoidi, vinkristin i merkaptopurin. Nakon toga slijedi intenzifikacija, koja se naziva još i reindukcijska terapija, pri čemu se koriste isti lijekovi kao i tijekom prve faze liječenja. Završna faza je faza održavanja kada se terapija sastoji od merkaptopurina na dnevnoj bazi i metotreksata na tjednoj bazi. Terapija ukupno traje 2 godine, a dulje trajanje nije pokazalo značajne benefite u preživljenju. U terapiji se također koristi i intratekalni metotreksat u svrhu profilakse širenja leukemije u SŽS. Ostale novije metode liječenja uključuju monoklonalna protutijela (rituksimab (anti-CD20) i blinatumomab (anti-CD19)), CAR-T stanice i inhibitore tirozinskih kinaza (imatinib i dasatinib kod *BCR-ABL* fuzije uz *t(9;22)*). (6)

### 1.3. Akutna mijeloična leukemija

Akutna mijeloična leukemija je rijetka i vrlo heterogena bolest čija incidencija globalno iznosi 7 na milijun osoba. U razvijenom svijetu napretkom terapije danas preživljenje u djece dostiže i do 70%. Oko 95% slučajeva AML-a javlja se *de novo*, dok se u oko 1% slučajeva radi o sekundarnom/MDS-related AML-u, a u 70-80% slučajeva nalazimo abnormalan kariotip malignih stanica, što naglašava važnost citogenetičke analize. (8) U Hrvatskoj godišnje oboli 4-6 djece. Osim toga važno je naglasiti povezanost sa sindromom Down, naime djeca oboljela od navedenog sindroma imaju 14 puta veći rizika od razvoja AML-a te često nakon rođenja imaju tzv. „prolazni mijeloproliferativni sindrom“ koji se ne smije zamijeniti za leukemiju. U svakom slučaju, ovakvu djecu treba pratiti jer imaju nezanemariv rizik od oko 25% za kasniji razvoj bolesti. (1)

Klinička slika AML-a gotovo je istovjetna ALL-u, ali važno je naglasiti da se pojedini podtipovi mogu prezentirati specifičnim kliničkim obilježjima. AML se, u odnosu na ALL, češće prezentira hiperleukocitozom. Akutna monocitna leukemija može se prezentirati infiltratima na gingivama i u potkožju te bolovima u udovima, dok se akutna promijelocitna leukemija veže uz učestaliju pojavu diseminirane intravaskularne koagulacije.(1) Posebni entitet predstavlja

neonatalna AML, koja čini manje od 1% slučajeva, a može se prezentirati hepatosplenomegalijom, žuticom, ascitesom, hepatalnom insuficijencijom, koja može dovesti do smrti neovisno o primarnoj bolesti, te pleuralnim izljevom. U 50% neonatalnih slučajeva zahvaćen je i SŽS što se prezentira znakova povećanog intrakranijalnog tlaka poput papiledema, izbočene fontanele i retinalnih krvarenja, a nisu rijetki niti poremećaji stanja svijesti. Mogu se pojaviti i kožne lezije, odnosno tzv. *leukemia cutis*, u obliku raznobojnih čvorića, a prisutni su u 2/3 slučajeva čak i kada nisu zahvaćene niti koštana srž niti periferna krv. (7,9)

Dijagnoza se kao i kod ALL-a postavlja kada u aspiratu koštane srži nalazimo više od 20% malignih blasta. Daljnja dijagnostika aspirata obuhvaća imunofenotipizaciju, kariotipizaciju te FISH i molekularne genetičke testove radi detekcije translokacija. Prognostički povoljne genetičke promjene su  $t(15;17)$  (*PML-RARA*) koja karakterizira akutnu promijelocitnu leukemiju,  $t(8;21)$  koja karakterizira AML sa znakovima sazrijevanja te delecija ili inverzija kromosoma 16. Nepovoljne promjene su delecije kromosoma 5 ili 7, promjene na 11q23, kompleksne promjene s više od tri translokacije i  $t(9;22)$ . (1) Lumbalna punkcija se kod djece obavezno radi, osim u slučaju akutne promijelocitne leukemije radi rizika od DIK-a ili kod drugih kontraindikacija. Zahvaćenost SŽS-a definiramo kao  $>5 \times 10^6/L$  leukocita u likvoru uz prisutnost malignih blasta i isključenje traumatske punkcije.(8)

Terapija se značajno razlikuje od terapije ALL-a te traje oko 18 mjeseci nakon čega se pacijenti nastavljaju intenzivno pratiti. Koriste se brojni kemoterapijski protokoli uglavnom na bazi citozin-arabinozida uz dodatak inhibitora topoizomeraze (etopozid) i antraciklina (dauno-/doksorubicina) u visokim dozama i na tjednoj bazi, nakon čega bolesnici upadnu u razdoblje duboke imunosupresije koje sa sobom donosi i značajan rizik od infekcije. Noviji terapijski režimi uključuju liposomalne antracikline, inhibitore tirozinskih kinaza (npr. Sorafenib ili gilterinib kod *FLT3-ITD* translokacije koja se javlja u oko 15% pedijatrijskih slučajeva) te

upotrebu monoklonalnih protutijela poput gemtuzumab ozogamicina (anti-CD33). HSCT je rezerviran za slučajeve visokog rizika i za relapse bolesti. (1,10)

#### **1.4. Osnovni pojmovi vezani uz analizu sastava mikrobiote**

Ljudsku mikrobiotu najlakše i najpreciznije je definirati kao „sve mikroorganizme koji žive na tijelu i unutar tijela“. (11) Mikrobiota se pokazala kao izrazito značajna komponenta našeg organizma, kako u zdravlju tako i u bolesti, a njen važan fiziološki i patofiziološki učinak proizlazi iz dva osnovna mehanizma – interakcije s imunim sustavom domaćina te odsustva ili prisutnosti određenih metaboličkih sposobnosti koje nisu sposobni izvesti enzimi za koje kodira sam genom domaćina. Termin mikrobiom odnosi se, u skladu s terminom „biom“, na sve žive, ali i nežive dijelove organizma, odnosno u ovom slučaju obuhvaća sve mikroorganizme, njihove genome, genom domaćina i okolišne uvjete. Značajni su još i noviji pojmovi „metagenomika“ (svi geni pristuni u organizmu, uključujući i gene mikroorganizama), „metatranskriptomika“ (sve mRNA domaćina i mikroorganizama koje pronađemo analizom cDNA) te „metaproteomika“ i „metabolomika“ (svi proteini odnosno metabolički produkti čije prisustvo utvrđujemo putem NMR, masene spektrometrije ili tekuće kromatografije). (11,12) Metode analize sastava crijevne mikrobiote možemo osnovno podijeliti na metode bazirane na kulturama, molekularne metode bazirane na detekciji nukleinskih kiselina i metode bazirane na detekciji metabolita. Metode bazirane na kulturama temelje se na standardnim mikrobiološkim metodama kultivacije te identifikaciji bakterija prisutnih u kulturi na temelju fenotipskih obilježja koja mogu biti morfološka (izgled kolonija, hemoliza) ili biokemijska (aktivnost enzima poput oksidaze, katalaze ili rezistencija). Temeljna mana ove metode je u tome što brojni obligatni anaerobi izrazito teško preživljavaju u transportnim medijima i kultiviraju, a osim toga čak i kada dođe do uspješne kultivacije aerobi značajno lakše rastu *in vitro* što dovodi do njihova umjetno povišenog udjela i lažnog zaključka da upravo oni dominiraju u mikrobioti crijeva. Iz ovih razloga, kultivacija se u kontekstu istraživanja danas rijetko koristi, uz iznimku

proučavanja pojedinih vrsti i rodova aeroba zasebno i specifičnih situacija u kliničkoj praksi.

(12)

Molekularne metode analize temelje se na analizi 16S rRNA, odnosno manje podjedinice rRNA prokariota. Bakterijska 16S rRNA sastoji se od 1500-2000 nukleotida te sadržava 9 hipervarijabilnih regija (HV1-HV9) čije razlike održavaju evolucijske promjene u različitim bakterijskim rodovima i vrstama te pružaju odličnu osnovu za njihovu razlikovanje. Za razliku od metoda temeljenih na kulturi, na molekularne metode ne utječe ni potencijal za izolaciju u kulturi niti potencijal rasta u kulturi.(13) Molekularne metode možemo podijeliti na sekvencirajuće i nesekvencirajuće. **Nesekvencirajuće** se temelje na umnožavanju regija HV1-HV9 bakterije 16S rRNA putem PCR-a i upotrebe specifičnih komplementarnih primera te odvajanje ovih segmenata, ili na temelju dužine segmenata upotrebom gel elektroforeze, ili na temelju slijeda nukleotida upotrebom DNA *microarray-a* ili FISH-om. Mane ovih metoda su teško razlikovanje filogenetski sličnih rodova bakterija te podcjenjivanje manje zastupljenih rodova. **Sekvencirajuće** metode su se ranije temelje na Sangerovom sekvenciranju koje zahtjeva relativno „čist“ uzorak DNA, a novije tehnike koriste se računalnim softverima kako bi analizirale izrazito velike količine podataka i usporedile ih sa dostupnim bazama podataka o genomu pojedinih vrsta.(12) Najnovije metode uključuju *shotgun* sekvenciranje metagenoma čije su prednosti da analizira cijeli genom bakterija, poput podataka o genima za razne enzime, te neovisnost o postojećim bazama podataka. Mana ove metode je da je uzorak vrlo često kontaminiran domaćinskom DNA. Izuzetna vrijednost ove metode je analiza cijelog genoma bakterija što nam daje, ne samo taksonomski uvid u vrste bakterije, nego i u sposobnost ovih bakterija da sudjeluju u biokemijskim procesima. Ostale grane u povojima su i „metaproteomika“ i „metabolomika“ čiji je cilj analizirati sve proteine i/ili metabolite u organizmu uz pomoć NMR ili masene spektrometrije te „metatranskriptomika“ koja putem



cDNA proučava koje točno mRNA bakterije sintetiziraju, što je izrazito bitno znajući da se ne prepisuju svi geni iz bakterijske DNA.(14,15)

Osim samog sastava, raznolikost/diverzitet crijevne mikrobiote je također izrazito važna jer se njeno smanjenje može povezati sa promjenama u normalnoj mikrobioti što se naziva i *disbioza*. (16) U tu svrhu koristimo se alfa diverzitetom, za mjerenje raznolikosti flore unutar same jedinke, te beta diverzitetom, za mjerenje razlika u raznolikosti između dvije različite jedinke ili grupa. Alfa diverzitet nam govori o ukupnom broju različitih vrsta bakterija unutar jedinke te zastupljenosti pojedine vrste i izražavamo ga različitim indeksima. *Chao1* indeks bazira se na broju različitih vrsta, *Simpson* i *Shannon* indeks uzimaju u obzir i broj vrsta i ravnomjernost zastupljenosti vrsta dok se *Faith* indeks temelji na zajedničkom evolucijskom podrijetlu.(17) U različitim kohortnim i slučaj-kontrola istraživanjima možemo uspoređivati ove indekse između skupine zdravih i oboljelih kako bismo pronašli korelaciju između disbioze i relativnog rizika za oboljenje od bolesti koja je predmet istraživanja. Upravo ovako se počela istraživati i korelacija između disbioze i akutnih leukemija.

### **1.5. Normalan razvoj mikrobiote djeteta**

Brojne studije dokazale su da se dječja mikrobiota razvija u određenim fazama, ovisno o faktorima okoliša (dojenje, infekcije, socijalni kontakt, carski rez)(18,19), ali i brojnim faktorima domaćina (lokalna sekretorna IgA protutijela)(20). Dojenčad hranjena majčinih mlijekom ima nešto manji alfa diverzitet, ali s druge strane značajno je bogatija florom koja može razgraditi oligosaharide ljudskog mlijeka. Ovdje pripadaju uglavnom bakterije podrijetlom iz *Bifidobacterium spp.*, poput *B.bifidum*, *B.longum* i *B.breve*. (21,22). Pokazalo se da svaka od ovih bakterija izražava specifični metabolički profil sposobnosti razgradnje pojedinih šećera te da njihova zastupljenost odgovara zastupljenosti pojedinih oligosaharida majčina mlijeka, što navodi na zaključak da bi određeni majčini geni mogli uvjetovati izražaj upravo onih sekretornih IgA djeteta koji će omogućiti razvoj flore prikladne za razgradnju

šećera majčinog mlijeka.(23) U dijelu genoma *Bifidobacterium spp.*, koji kodira enzime za razgradnju šećera, nalaze se i geni koji kodiraju za brojne ABC transportere te enzime uključene u signalne puteve (heksozaminidaza, sijalidaza) što dodatno naglašava njihovu važnost.(24) Za vrijeme dojenja probavni trakt djeteta može razgraditi HMO, laktate te škrob uz zanemarivo male promjene u sastavu crijevne flore, a uvođenjem krute hrane dolazi i do porasta broja, ali i značajnog porasta raznolikosti bakterija.(21) Upravo uvođenjem krute hrane dolazi do ekspanzije koljena *Firmicutes* i *Bacteroides* čiji predstavnici mogu razgrađivati kompleksne ugljikohidrate. S navršenom godinom dana koljeno *Firmicutes* postaje dominantno (>50%) te postaje glavni proizvođač SCFA, poglavito butirata, ali i propionata i acetata.(25–27) Kasnije tijekom pregleda, bit će spomenut izrazito velik značaj SCFA u regulaciji upale, ali i manjak SCFA, kao rizični faktor za crijevne infekcije, razvoj akutnih leukemija te GVHD. Govoreći o sintezi aminokiselina i vitamina, istraživanja su pokazala da je crijevna flora dojenčeta sposobna za sintezu aminokiselina već s 4 mjeseca te da je do treće godine povećana sposobnost sinteze folata, dok nakon treće godine ona opada uz istovremen rast kapaciteta za razgradnju folata iz hrane i lisnatog povrća, uz porast mogućnosti sinteze endogenog kobalamina. (22,24) Ovakav profil enzima, koji sudjeluju u sintezi vitamina, može se objasniti kao kompenzacijski mehanizam djeteta u slučaju manjka folata u ranoj fazi života. Možemo zaključiti da brojni faktori, poput prestanka dojenja, uvođenja krute hrane, socijalizacije i infekcija, potiču porast broja vrsta bakterija, promjene u njihovoj zastupljenosti i sveukupnu maturaciju mikrobiote djeteta prema odraslom tipu flore. Početni porast alfa diverziteta, koji ovi faktori uzrokuju, postupno usporava i završava oko pete godine života stabilizacijom i postupnim stjecanjem osobina flore odrasle osobe. (18,21) Također se počinje smanjivati i beta diverzitet između djeteta i odrasle osobe, poglavito zahvaljujući izloženosti sličnim uvjetima okoliša kojima su izložene i odrasle osobe.(28)

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Povezanost akutnih leukemija i čimbenika okoliša

Prva hipoteza o povezanosti čimbenika okoliša i akutnih leukemija, točnije ALL-a, bila je tzv. „hipoteza odgođene infekcije“ koja govori da je osim genskog poremećaja, koji može nastati već *in utero*, potreban i sekundarni okolišni čimbenik za razvoj malignog klona, najčešće infekcija.(29) Ova teorija se temeljila na dvije osnovne činjenice, prva je da je incidencija ALL-a najveća između 2. i 6. godine života što se podudara s incidencijom atopijskih bolesti, počevši s atopijskim dermatitisom, koji kasnije može prerasti u rinitis i astmu, te incidencijom DM1. Obje ove bolesti uklapaju se u tzv. „higijensku hipotezu“, odnosno za njih sumnjamo da su povezane s izloženošću određenim antigenima, što se podudara sa infektivnom hipotezom ALL-a. Početna pretpostavka infektivne hipoteze je da u pacijenata, koji posjeduju određenu genetsku predispoziciju za razvoj ALL-a, mora postojati neki drugi okolišni čimbenik, najčešće učestale infekcije respiratornog sustava i GI trakta, koje naposljetku dovedu do pojave ishodišnog malignog klona. Istraživanje Rodríguez-Hernández i sur. (2017.) bavilo se uspoređivanjem incidencije razvoja leukemije kod dvije skupine genetički predisponiranih miševa, točnije miševa s *ETV6-RUNX1* fuzijom. Miševi inficirani raznim virusima i bakterijama (murini norovirusi, hepatitisi i *Helicobacter spp.*) pokazali su značajno veću incidenciju razvoja ALL-a od drugih miševa koji su uzgajani u sterilnom okruženju. Bitno je reći i da miševi s navedenom mutacijom, a uzgojeni u sterilnom okruženju, nisu pokazali ništa veći rizik za razvoj ALL-a od miševa divljeg tipa bez mutacije, što dodatno naglašava da su infekcije važan sekundarni čimbenik rizika za razvoj ALL-a. Istraživači su usporedbom mutacija u genotipovima pedijatrijskih bolesnika oboljelih od ALL-a i mutacija u genotipovima miševa izloženih infekcijama pronašli određena poklapanja, specifično u mutacijama H3K4 demetilaza, što ih je navelo na zaključak da infekcije na genom miševa djeluju upravo takvim mehanizmom. Ovakav hipermetilirani oblik H3K4 proteina dovodi do pojačane ekspresije

RAG proteina pa posljedično i do pojačane *V(D)J* rekombinacije, izrazito značajne za razvoj ishodišnog malignog klon, a o kojoj će biti govora nešto kasnije. Istraživači su induciranjem mutacija H3K4 putem CRISPR/Cas9 tehnologije na linijama humanih malignih blasta dokazali pojačanu RAG aktivnost *in vitro*.(30) Nekoliko godina kasnije istraživanja su se sve više bavila usporedbom genetski predisponiranih miševa uzgojenih u sterilnom okruženju s predisponiranim miševima uzgojenim u zajednici, bez izlaganja nekih specifičnim infekcijama. Kako su istraživači i kod miševa uzgojenih u zajednici, bez izlaganja specifičnim patogenima, pronašli povećanu incidenciju ALL-a, možemo zaključiti da se ne radi o točno određenim patogenima, nego da postoji neki zajednički mehanizam kojim djeluju sve učestale infekcije.(31) Druga činjenica je da, unatoč određenim *in utero* promjenama, manje od 1% novorođenčadi naposljetku i razvije ALL. Naime, retrospektivnim analizama krvi uzete iz pete u svrhu novorođenačkog probira (Guthrijevi test) i krvi iz pupkovine otkriven je značajan broj *ETV6-RUNX1* fuzija u limfocitima (1-5% živorođenih)(29), a također i značajan udio visoke hiperploidije (do 5% živorođenih).(32,33) Već smo ranije napomenuli da se hiperploidija pojavljuje u oko 30% malignih blasta, *ETV6-RUNX1* fuzija u oko 25%, a ipak manje od 1% djece s ovim mutacijama naposljetku razvije leukemiju, što se utvrdilo na mišjim modelima, ali i retrospektivno iz uzoraka krvi pupkovine.(31,34,35) Stoga, možemo zaključiti da ove promjene stvaraju samo *preleukemijske* klonove s izrazito blagom sposobnošću maligne proliferacije te da su potrebni neki sekundarni okolišni čimbenici kako bi se bolest naposljetku i razvila u svom punom opsegu.(5,31)

Glavne genetske promjene koje limfociti naknadno prolaze odnose se uglavnom na *V(D)J* rekombinaciju imunoglobulina B-limfocita putem RAG proteina. Pokazalo se da kod učestalih ili kroničnih infekcija dolazi do stalno povišene razine proupalnih citokina koja dovodi do povećane aktivnosti AID proteina. AID protein potom pojačava aktivnost RAG-a te dovodi do pojačane *V(D)J* rekombinacije i pojačane genske nestabilnosti.(19,35,36) Pokazalo se da

upravo ovakva patološka reakcija na učestale infekcije, poglavito respiratornog trakta, dovodi do transformacije *preleukemijskih* klonova u klonove sposobne za malignu profeliraciju.(29,37)

Ipak, ovakva pretjerana reakcija na upalu s ekstenzivnim stvaranjem citokina vjerojatno je uvjetovana smanjenom izloženošću mikroorganizmima prilikom dojenačkog razdoblja i pogotovo smanjenom bioraznolikošću crijevne flore. Obzirom da su svi čimbenici koje vežemo uz smanjenu alfa raznolikost (rani prestanak dojenja, socijalna izolacija, carski rez) povezani i s ALL-om (38–41) i s drugim bolestima uz koje vežemo *two hit* hipoteze (alergije i DM1)(42), nameće se zaključak da je upravo crijevna disbioza ključni i podležeci imunosni i okolišni čimbenik u patogenezi akutnih leukemija.(29)

## **2.2. Uzroci crijevne disbioze u djece**

Prvi životni događaj koji značajno utječe na razvoj i sastav crijevne mikrobiote novorođenčeta je sama metoda poroda. Naime, pokazalo se da je novorođenačka crijevna flora podrijetlom izrazito slična crijevnoj flori majki, uz kratkotrajno prisustvo majčine vaginalne i kožne flore.(43) Međutim, pri porodu carskim rezom, kada čedo ne prolazi kroz porođajni kanal, možemo zamijetiti određene specifičnosti. Prvo, iako neposredno nakon rođenja novorođenče ima vrlo sličan profil *Bacteriodes spp.* kao i majka, ono ima smanjenu stabilnost i značajno smanjen broj pojedinih vrsta, a osim toga, povišen je i broj oportunističkih patogena poput *K1 E.colli*, *Enterococcus spp.* i *Klebsiella spp.* Carski rez ostavlja posljedice na flori i daleko nakon rođenja, pa tako ova djeca imaju smanjenu količinu SCFA u stolici i usporeno sazrijevanje crijevne flore i do druge godine života.(41,44)

Sljedeći ključan faktor je odabir između tvorničkog dojenačkog pripravka i dojenja majčinim mlijekom. Kao što je ranije napomenuto, dojenje je ključan faktor za razvoj uspješnog profila *Bifidobacterium spp.* prilagođenog HMO-ima iz majčina mlijeka. U slučaju ranog prestanka dojenja ili kada se uopće ne doji dolazi do prerane promjene crijevne flore prema onoj koja je

zadužena za razgradnju kompleksnijih ugljikohidrata, odnosno dolazi do smanjenja SCFA u stolici, smanjenja ekspresije *Bifidobacterium spp.* i *Lactobacillus spp.*, a ekspanzije rodova zaduženih upravo za razgradnju kompleksnijih ugljikohidrata. Stoga, može se zaključiti da, za razliku od poroda carskim rezom, prestanak dojenja ubrzava sazrijevanje crijevne flore, što jednako tako nije poželjno, a također rezultira smanjenim stvaranjem SCFA. (21,38,39,45)

Upotreba intraportalnih antibiotika djeluje na floru vrlo slično kao i porod carskim rezom; smanjuje količinu SCFA u stolici te podiže razinu oportunistički patogenih enterobakterija. (46–49) Istraživanja su pokazala da ovakav utjecaj na razvoj flore prestaje unutar par mjeseci od rođenja, međutim ne može se isključiti dugotrajan učinak u usporavanju razvoja crijevne flore, osobito kod dugotrajnih i višekratnih primjena antimikrobnih lijekova i drugih faktora rizika djeteta poput imunodeficijencija. (50) Dugotrajnost učinka antibiotika na crijevnu floru djeteta kontroverzna je tema, a o kojoj će biti govora u nastavku rada.

Naposljetku, i brojni drugi okolišni faktori, poput socijalnog kontakta, prehrane i mjesta života utječu na razvoj flore. Djeca koja nemaju starije srodnike, žive u kućanstvu s manje osoba i ona koja ne idu u odgojno-obrazovne ustanove, poput jaslica i vrtića, pokazuju smanjenu alfa raznolikost i usporeno sazrijevanje flore. (21,51) Zapadnjački način prehrane, koji karakterizira smanjen unos vlakana, prerađena hrana bogata ugljikohidratima niskog glikemijskog indeksa, povećana raznolikost hrane i povećan unos kalorija povezan je sa smanjenim udjelom SCFA u stolici. Također, djeca iz nerazvijenih afričkih zemalja imaju veću alfa raznolikost od djece iz zapadnog svijeta te je njihova flora mnogo sličnija europskoj djeci koja žive na selu i ruralnim područjima, u usporedbi sa florom djece iz urbanih područja. (52)

### 2.3. Mikrobiota djece pri dijagnozi ALL-a

U cilju analize sastava mikrobiote pri samoj dijagnozi ALL-a Peppas I i sur. (2023.) (19) su pretragom baza podataka (*PubMed* i *EMBASE*) nastojali pronaći slučaj-kontrola istraživanja koja uspoređuju sastav mikrobiote zdrave djece iz kontrolne skupine i djece kojima je neposredno prije studije postavljena dijagnoza ALL-a. Ključni kriterij kojim su se istraživači vodili bio je da su uzorci uzeti prije provođenja indukcijske kemoterapije, znajući da ona sama izuzetno jako modificira crijevnu mikrobiotu, o čemu će kasnije biti govora. Korištenje antibiotika također značajno utječe na mikrobiotu (50), a u pregled su bili uključeni radovi u kojima niti jedna skupina nije primala antibiotike (53,54), istraživanja u kojima su samo oboljeli primali antibiotike (55,56) te istraživanja u kojima nema podataka o korištenju antibiotika (57,58). U istraživanju Bai i sur. (2017.) postojale su dvije podskupine slučaja i dvije podskupine kontrola, ovisno o uzimanju antibiotika (59). Sva navedena istraživanja, kao i podaci o korištenju antibiotika te podaci o brojčanom i dobnom sastavu slučaja i kontrola, mogu se pronaći u Tablici 1. Iz Tablice 1. možemo vidjeti da je velika većina istraživanja koristila 16S rRNA sekvenciranje u svrhu analize sastava mikrobiote, osim istraživanja Liu i sur. (2020.) kada je korišten DNA *microarray*. U Tablicu 1. također je pridodano istraživanje Chen SM i sur. iz 2022. koje sam sám pridodao ovom sustavnom pregledu. Istraživanja su koristila različite statističke metode analize relativnih zastupljenosti kako bi odredili razlike u alfa raznolikosti putem *Shannon*, *Chao1* i *Simpson* indeksa, točnije korišteni su WMW test (53), DESeq2 (55,56) i LEfSE (54,59).

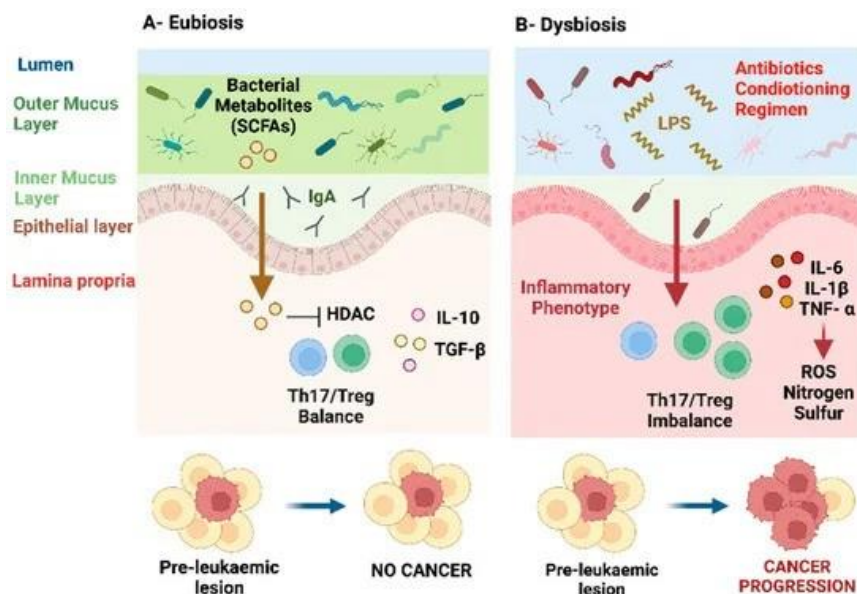
Zaključno, u čak pet odabranih istraživanja dokazana je manja alfa raznolikost u skupini oboljelih u odnosu na kontrolu upotrebom *Shannon* indeksa s razinom značajnosti  $p < 0,05$  (54,56–60), a slični rezultati dobiveni su upotrebom *Chao1* i *Simpson* indeksa, te u istraživanju Chua i sur. (2020.) te Liu i sur. (2020.), ali ipak s korelacijom nešto ispod razine statističke značajnosti (55). Navedena istraživanja pokazuju dakle značajno manju alfa raznolikost

crijevne flore djece kojima je neposredno prije uzimanja uzorka dijagnosticirana ALL. Pokazana je i značajna razlika između beta raznolikosti zdrave i oboljele djece u barem tri istraživanja.(54–56) Zanimljivo je da se ovakva razlika očigledno održava i neovisno o korištenju antibiotika, što pokazuje istraživanje Bai i sur. (2017.), a u ovom istraživanju razlika u alfa raznolikosti je čak i veća između skupina koje nisu koristile antibiotike, što ukazuje da je disbioza snažan predisponirajući faktor za razvoj bolesti, a ne samo rezultat korištenja antibiotika.(59) Ovaj pregled je izuzetno koristan jer dokazuje hipotezu o povećanom relativnom riziku za oboljenje od ALL-a u djece koja „kasne“ s prelaskom crijevne mikrobiote prema odraslom fenotipu, odnosno u djece čija flora pokazuje manju alfa raznolikost (niži *Shannon* indeks u odnosu na kontrolu) te različitu beta raznolikost u odnosu na kontrolu.(19) Ipak, prilikom ove analize važno je uzeti u obzir i dob, naime u istraživanju Liu i sur. (2020.) prosječna dob i slučaja i kontrola je veća od 7 godina, što bi moglo značiti da je mikrobiota u određenoj mjeri već trajno formirana, što bi, uz izostanak korištenja antibiotika u ovom istraživanju, moglo objasniti zašto je smanjenje raznolikosti ispod razine statističke značajnosti. Osim dobi i upotrebe antibiotika, svi čimbenici, koji utječu na crijevnju floru (porod carskim rezom, rani prestanak dojenja, prehrana, socijalna izolacija...), mogli bi biti potencijalni *confounderi* ovih istraživanja, što isto treba uzeti u obzir, iako ovakvi uniformni rezultati istraživanja ukazuju na jaku povezanost smanjene alfa raznolikosti i incidencije leukemija.

**Tablica 1.** Tablica prikazuje brojčani odnos te dobni sastav slučajeva i kontrola kao i podatke o korištenju antibiotika pojedinih skupina te promatrane regije bakterijske 16S rRNA/rDNA. Bitno je naglasiti da su u istraživanju Bai i sur. postojale dvije skupine slučajeva i kontrola, razdijeljene ovisno o uzimanju antibiotika, što je naznačeno u tablici. Metode analize relativnih zastupljenosti kao i odabrane razine statističkih značajnosti naznačene su u tekstu. Preuzeto i prilagođeno prema referenciji. (19)

Studija	Država	Uzorak (slučaj/kontrola) (N)	Prosječna dob (slučaj/kontrola) (godine)	Antibiotici (slučaj/kontrola)	Sekvencirane regije
Chen SM i sur., 2022. (58)	Kina	40/10	5,2/5,8	nema podataka/nema podataka	16S rRNA (V1-V3)
De Pietri i sur., 2020. (57)	SAD	51/18	3,7/6,8	nema podataka/nema podataka	16S rRNA (V3-V4)
Chua i sur., 2020. (55)	Malezija	7/7	4/4	da/ne	16S rRNA (V4)
Gao i sur., 2020. (53)	Kina	18/18	6,8/5,9	ne/ne	16S rRNA (V3-V4)
Liu i sur., 2020. (54)	Kina	58/23	7,2/7,6	ne/ne	16S rDNA <i>microarray</i> (V1-V9)
Bai i sur., 2017. (59)	Kina	20/16 i 10/17	5,5/4,3	da/da i ne/ne	16S rRNA (V3-V4)
Rajagopala i sur., 2020. (56)	SAD	29/23	5,0/6,0	da/ne	16S rRNA (V4)





**Slika 1.** Povezanost mikrobiote i progresije leukemije (A) Eubioza. Crijevna mikrobiota, putem svojih metabolita, poput SCFA, može spriječiti razvoj malignog kлона, čak i u slučaju postojanja određenih *in utero* mutacija, poput *ETV6-RUNX* fuzije. Već spomenute SCFA smanjuju lučenje proupalnih citokina, štite integritet crijevno-krvne barijere te potiču epigenetičke modifikacije u raznim stanicama, od upalnih, poput limfocita i neutrofila, pa sve do lokalnih stanica, poput enterocita i vrčastih stanica, a svim mehanizmima bavit ću se detaljnije u nastavku rada. Na prikazanoj shemi vidimo SCFA u ulozi moćnog epigenetičkog modifikatora kako putem HDAC potiču diferencijaciju Treg Foxp3<sup>+</sup> limfocita. Povećana razina Treg limfocita, i njihova ravnoteža s Th17 limfocitima, dovodi do povećanog lučenja protuupalnih citokina, poput IL-10 i TGF-β. (B) Disbioza. Smanjena alfa raznolikost, koja može biti uzrokovana događajima u ranom djetinjstvu (porod carskim rezom, izostanak dojenja), ali i samim liječenjem akutnih leukemija (antibiotici, kemoterapeutici), može dovesti do smanjenog stvaranja korisnih metabolita, poput SCFA. Uslijed smanjene koncentracije SCFA može doći do disbalansa između pro- i protuupalnih citokina, povećane propusnosti crijevne stijenke i učestale translokacije potencijalno patogenih bakterija iz crijevnog lumena. Svi ovi događaji praćeni su povećanim lučenjem IL-1, IL-6, TNF-α, NO te ROS-a, uz povećan oksidativni stres. Ovi događaji u ranom djetinjstvu se klinički manifestiraju kao razvoj pravog leukemijskog kлона, a prilikom liječenja same leukemije dovode do povećane incidencije infekcija, GVHD-a te povećanog mortaliteta povezanog s liječenjem. Preuzeto iz referencije. (61)

## 2.4. Metaboličke i imunosne posljedice promijenjene mikrobiote

Između zdrave i djece oboljele od ALL postoji značajna razlika i u alfa i u beta raznolikosti, a sva istraživanja prikazana u Tablici 1. pokazala su i značajne razlike u relativnoj zastupljenosti pojedinih rodova i vrsta bakterija između oboljelih i kontrola. Naime, oboljeli pokazuju značajno smanjenu relativnu zastupljenost koljena *Firmicutes*, koje bi trebalo proći kroz fazu ekspanzije unutar prvih 1,5 godina života djeteta (21), te smanjenu zastupljenost bakterija karakterističnih za kasnija razvojna razdoblja. Ranije je spomenuto da su bakterije ovog koljena glavni proizvođači SCFA. Metabolički govoreći, nalazimo značajan manjak bakterija koje proizvode SCFA, kako butirat (*Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia spp.*, *Anaerostipes spp.*), tako i acetat (*Prevotella spp.*, *Bacterioides spp.*). (19) SCFA, osobito butirat, su jedan od ključnih elemenata za održavanje uredne imunosne barijere crijeva(62,63), a njihov manjak se povezuje i s brojnim drugim bolestima, poput ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti(64) te rizikom od razvoja astme.(65) Prilikom ove analize važno je uzeti u obzir i *confoundere* poput dobi, spola, upotrebe antibiotika te upotrebe različitih metoda analize zastupljenosti pri obradi podataka.(19) Ipak, pokazalo se da korištenje antibiotika u velikoj većini slučajeva uzrokuje disbiozu i smanjenu proizvodnju SCFA kroz razdoblje od samo nekoliko tjedana ili čak i manje.(50)

Govoreći iz imunološke perspektive, crijevna mikrobiota ključna je za tzv. „imunosni trening dojenčeta“ u prvih par mjeseci života. Naime, poznato je da novorođenče ima određeni imunosni profil koji karakteriziraju visoke razine regulatornih T i B-limfocita te MDSC-a te visoke razine protuupalnih citokina, poput IL-10.(66) Ovakva slabašna imunosna kompozicija omogućava adekvatnu kolonizaciju crijeva bakterijama koji putem MAMP-ova pokreću razvoj imunosnog sustava svojim površinskim antigenima i metabolitima, poput SCFA.(67) Svi rizični čimbenici koji su povezani s rizikom od ALL-a djeluju i na imunosni sustav. Carski rez smanjuje zastupljenost *Bacterioides spp.* koji je ključan za razvoj tolerancije imunosnog sustava

kao ligand TLR2 receptora(68,69), izostanak dojenja smanjuje prijenos majčinih IgA protutijela koje dijete ne može samo proizvesti pri rođenju(70), a bitna su za homeostazu regulatornih T-limfocita, te smanjuje ekspresiju *Bifidobacterium spp.* koje su povezane sa pojačanim odgovorom T-limfocita, ali i indukcijom memorijskih B-limfocita(19), prehrana s manjkom vlakana putem smanjenja proizvodnje SCFA potiče *V(D)J* rekombinaciju putem AID proteina, što može dovesti do mutacija B-limfocita,(71) dok socijalna izolacija i pretjerana čistoća smanjuju *V(D)J* rekombinaciju putem RAG proteina, što je dokazano na mišjim modelima, gdje je pokazano smanjenje mišjih Peyerovih ploča.(72)

## **2.5. Crijevna mikrobiota i kemoterapija**

Kemoterapija, kao ključan dio onkološkog liječenja leukemija, značajno utječe na crijevnu floru; tijekom indukcije i reindukcije dolazi do značajnog pada raznolikosti, ali i promjena sastava crijevne flore, koju prati smanjenje anaeroba i bakterija koje proizvode SCFA, uz ekspanziju oportunistički patogenih enterokoka i aeroba. Ovakve promjene su blaže za vrijeme razdoblja između terapija, a nakon prestanka kemoterapije crijevna flora se gotovo potpuno oporavi, u smislu ukupnog broja bakterija, međutim poremećaj sastava crijevne flore katkad se može održati i godinama nakon kemoterapije(55,56,73,74). Poznato je da kemoterapija dovodi do povećane incidencije infekcija koje su značajan uzrok mortaliteta prilikom liječenja zloćudnih bolesti. Ovakva povećana incidencija infekcija može se objasniti kroz nekoliko mehanizama, prvo, kemoterapija dovodi do ekspanzije rodova mukolitičkih bakterija (*R. gnavus* i *R. torques*) koje razrjeđuju crijevnu sluz, ali i smanjuju glikolizaciju površinskih molekula na samim enterocitima, što dovodi do slabljenja crijevno-krvne barijere.(75) Osim toga, kemoterapija dovodi do ekspanzije klostridija i streptokoka, a do smanjenja komenzalne flore, što preko više imunoloških i metaboličkih mehanizama dovodi do „prerastanja crijeva“ patogenim bakterijama (engl. *bacterial overgrowth*). (73,76) Najvažniji metabolički produkt, koji prilikom kemoterapije manjka, su ponovno SCFA. SCFA su glavni izvor energije

enterocita, stoga se njihov manjak povezuje sa smanjenom proizvodnjom okcludina i kladina, proteina koji grade *tight junctions* između enterocita, što ponovno dovodi smanjene funkcije crijevno-krvne barijere, a to može dovesti do bakterijemije i sepse.(77) Međutim, nisu samo enterociti oštećeni tijekom kemoterapije, oštećene su i Panethove stanice, ključne antimikrobne stanice crijeva koje proizvode brojne obrambene proteine poput alfa defenzina. Smanjena sekrecija defenzina i smanjena funkcija Panethovih stanica je, osim s rizikom od infekcije, povezana i s rizikom od GVHD-a. Osim toga, relativna zastupljenost >30% porodica *Enterococcaceae*, do koje dovodi indukcijska kemoterapija, povezuje se s febrilnom neutropenijom, a i ostale potencijalno patogene bakterije, kao i ekspanzija aeroba, povezuju se s infekcijama. (73)

Česta komplikacija oštećenja crijevnog epitela, uslijed indukcijske kemoterapije, je i intestinalni mukozitis, klinički entitet karakteriziran proljevom, abdominalnom boli, ali i povećanim rizikom od prijenosa bakterija iz crijevnog lumena u krv, odnosno bakterijemije i sepse. Već spomenut porast relativne zastupljenosti porodice *Enterococcaceae*, osim s febrilnom neutropenijom, povezuje se i sa smanjenom razinom citrulina, poznatog markera integriteta enterocita, što pokazuje na čvrstu povezanost crijevne disbioze uzrokovane kemoterapijom i intestinalnog mukozitisa. (57) Uslijed intestinalnog mukozitisa dolazi do smanjenje sinteze crijevnih enzima, poput laktaze, a višak nerazgrađene laktoze može poslužiti kao izvor energije za enterokoke što dovodi do zatvaranja „začaranog“ kruga.(78) Prerastanje enterokoka je izrazito značajno i u patogenezi GVHD-a, o čemu će govora biti kasnije.

Na kraju, važno je napomenuti da i pojedini lijekovi iz kemoterapijskih protokola mogu direktno djelovati na crijevnu floru. Etopozid, inhibitor topoizomerase II, koji osobito učinkovito djeluje na stanice koje se brzo dijele, i daunorubicin povezani su sa smanjenim rastom i aerobne i anaerobne flore.(79) Metotreksat, koji utječe na mehanizam folata, također je povezan s promijenjenim sastavom crijevne flore. Na mišjim modelima dokazano je da

ovakva flora kasnije dovodi i do promijenjene aktivacije samog metotreksata.(80) Bitno je reći da se zapravo pri svim ovim interakcijama vjerojatno radi o efektu tipa *circulus vitiosus*; lijekovi prvo djeluju na enterocite mijenjajući crijevnu floru, a nakon toga ovakva oslabljena flora dovodi do promjena u aktivaciji i detoksifikaciji ovih lijekova i njihovih metabolita.(81)

## **2.6. Crijevna mikrobiota i antibiotici**

Problematika infekcija u onkološkom liječenju, radi njihovog potencijalnog mortaliteta, izrazito je važna. Incidencija infekcija ovisi o vrsti leukemije, češće su pri liječenju AML-a, i o fazi terapije, najveća incidencija je prilikom indukcije, a prema statistikama čak i do 50% djece u nekom dijelu liječenja leukemije razvije bakterijemiju, uz ukupni mortalitet od približno 3%.(82,83) Antibiotička rezistencija je također u porastu, iako se značajno razlikuje između različitih centara i država, ali najčešće se radi o enterokokima rezistentnim na beta laktame, gram negativnim enterobakterijama rezistentnim na aminoglikozide te *P.aeruginosa* koji može biti izrazito rezistentan.(82–84)

Može se reći da je utjecaj antibiotika na crijevnu disbiozu, kao i samo korištenje profilaktičkih antibiotika sinkrono s kemoterapijom, izrazito kontroverzna tema oko koje nema konsenzusa. Prema smjernicama osme ECIL iz 2020. korištenje antibiotika profilaktički se, u principu, ne preporuča. Pokušaji profilakse temeljili su se na dvije glavne strategije, ili na fluorokinolonima (levo-, ciprofloksacin) od samog početka indukcije, ili korištenje amoksicilin/klavulanata od trenutka nastupa neutropenije.(83) Iako su neka istraživanja pokazala smanjenu incidenciju bakterijemije prilikom profilakse fluorokinolonima, velika većina istraživanja nije pokazala statistički značajnu razliku u incidenciji infekcija između bolesnika koji su primali profilaksu i onih u kontrolnim skupinama. Unatoč ovim preporukama, u pojedinim centrima se profilaksa antibioticima i dalje koristi, suprotno zaključcima ECIL-a. (83,85)

Što se tiče donošenja smjernica za korištenje antibiotske profilakse u pedijatrijskoj populaciji, značajno je istraživanje T. Lehrnbechera i sur. iz 2020., u sklopu kojeg su istraživači učinili metaanalizu čak 114 različitih RCT-a u svrhu donošenja općih smjernica za korištenje antibiotika u djece. Kao kriterij uspješnosti profilakse korišten je izostanak vrućice, neutropenije, bakterijemije i sepse te smanjenje morbiditeta i mortaliteta uzrokovanih infekcijama uslijed kemoterapije. Došli su do zaključka da postoji slaba preporuka za korištenje profilakse u liječenju primarnog AML-a i relapsa ALL-a, dok također postoji slaba preporuka protiv korištenja profilakse pri indukcijskom liječenju ALL-a, alogenom i autolognom HSCT-u te jaka preporuka protiv korištenja profilakse, ako se uopće ne očekuje neutropenija. U slučaju da se profilaksa ipak koristi, preporučaju se fluorokinoloni kao prva linija, kao i u liječenju febrilne neutropenije.(86) Slično kao i u istraživanjima u odraslih, pri profilaksi fluorokinolonima nije primijećena povećana incidencija invazivnih gljivičnih bolesti, ali je primijećen porast rezistencije na fluorokinolone, iako su istraživanja i ovdje katkad proturječna.(86–88)

Febrilna neutropenija može se definirati kao povišenje aksilarne temperature iznad 38,5 °C u trajanju od jednog sata, uz manje od  $0,5 \times 10^9/L$  neutrofila, a katkad se može definirati i kao tri povišenja iznad 38 °C u 24h, uz manje od  $1 \times 10^9/L$  neutrofila. Procjenjuje se da čak 20% ovih bolesnika u trenutku mjerenja temperature već ima bakterijemiju, što čini prepoznavanje ovog stanja izrazito važnim.(1) Prema smjernicama osme ECIL iz 2020., liječenje febrilne neutropenije započinje antipseudomonasnim penicilinom i inhibitorom beta laktamaza (piperacilin/tazobaktam) ili cefalosporinima četvrte generacije (cefepim), kod pacijenata niskog rizika i stabilnog kliničkog statusa, te karbapenemima (meropenem) uz eventualni dodatak aminoglikozida i/ili glikopeptida (vankomicin, teikoplanin), kod nestabilnih pacijenata. Nisko rizičnim pacijentima se smatraju oni bez prethodnih infekcija rezistentnim bakterijama, pacijenti u ustanovama bez zabilježenih rezistentnih uzročnika te svi oni kod kojih se korist od

primjene karbapenema ne ističe ispred rizika za razvoj rezistencije. Ako se uzročnik uspije dokazati, odabir antibiotika postaje empirijski, uz obaveznu izradu antibiograma. Kod pacijenata kod kojih nije utvrđen uzročnik, odnosno pacijentima s FUO, pristupa se deeskalaciji terapije nakon 72-96h od prestanka vrućice. Ako su pacijenti bez prethodne infektivne anamneze i prezentirali su se klinički stabilno, može ih se otpustiti na kućnu njegu uz oralne antibiotike i kontrolu, međutim, ako ova dva uvjeta nisu zadovoljena, nastavlja se s intravenskim antibioticima užeg spektra bez aminoglikozida, kolistina i fluorokinolona. U liječenju se može koristiti i GM-CSF, a ako i nakon 96h nema rezultata postavlja se sumnja na gljivičnu infekciju. Tada se mogu koristiti antifungalni lijekovi (amfotericin B ili kaspofungin), koji se katkad primjenjuju i ranije, u svrhu predostrožnosti, kod pozitivnog PCR-a na gljivične uzročnike ili kod pozitivnih biljega gljivične infekcije, poput galaktomanana. (83)

Utjecaj antibiotika na crijevnu floru prilikom kemoterapije još je kontroverznija tema od same upotrebe antibiotika. U radu Rajagopala SV i sur. (2020.), sudjelovalo je 32 bolesnika i 25 zdravih kontrola, koji su u srodstvu s bolesnikom, što povećava vjerojatnost sličnosti crijevne flore. Značajno je da je svih 32 bolesnika bilo na profilaksi TMP-SMX, za razliku od kontrola. Već smo napomenuli da ovo istraživanje pokazuje značajno smanjenje alfa raznolikosti između bolesnika i kontrola u raznim fazama liječenja.(56) Međutim, vrlo teško ili čak nemoguće je reći da su upravo antibiotici uzrok ovakvih promjena flore, znajući da su bolesnici primali i kortikosteroide i snažne kemoterapeutike. Slično se može reći i za rad De Pietri S i sur. (2020.), dok određeni radovi, poput Hakim H i sur. (2018.), uopće nisu pronašli statistički značajnu povezanost između korištenja antibiotika i disbioze niti u jednoj fazi terapije.(57,73)

Tu je povezanost izrazito teško dokazati jer će bolesnici uvijek primati i kemoterapiju i glukokortikoide prilikom praćenja, ali znajući kako antibiotici djeluju na floru zdravih pojedinaca, može se reći da bi povezanost mogla postojati, iako su istraživanja zasad proturječna. Zna se da antibiotska profilaksa uzrokuje povećanu antibiotsku rezistenciju

prilikom kemoterapije. Prilikom profilakse ciprofloksacinom zabilježen je porast rezistentnih sojeva *E.colli* i *K.pneumoniae* koji može potrajati i više mjeseci nakon obustave antibiotika, a zabilježena je i „križna rezistencija“, odnosno porast MIK-ova i za neke druge antibiotike, poput ceftazidima. (83,89,90)

## **2.7. Crijevna mikrobiota i HSCT**

HSCT, odnosno transplantacija matičnih krvotvornih stanica, u Hrvatskoj se kao terapijska metoda u liječenju malignih, ali i nemalignih bolesti, koristi od 1983. godine. HSCT se može podijeliti prema vrsti transplantata, na transplantat matičnih stanica iz koštane srži te na matične stanice iz pupkovine i periferne krvi, i prema davatelju, na autologne i alogene. Autologna transplantacija podrazumijeva da su davatelj i primatelj ista osoba, dok se alogene transplantacije dalje može podijeliti na transplantacije od HLA-identičnih osoba, bilo srodnih, bilo nesrodnih i transplantaciju od haploidentičnih srodnika (srodnici primatelja s kojima dijele samo neke HLA lokuse). Između dvije osnovne vrste transplantacije, autologne i alogene, postupak se značajno razlikuje. Kod autologne transplantacije, u bolesnika dobrog kliničkog statusa, koristimo razne citokine i GM-CSF kako bi potaknuli prijelaz matičnih stanica iz srži u perifernu krv. Nakon prikupljanja procesom leukaferoze i zamrzavanja slijedi intenzivna i multimodalna radiokemoterapija bolesnika pri čemu želimo uništiti preostale maligne, ali i zdrave stanice bolesnika. Tada slijedi reinfuzija matičnih stanica od kojih očekujemo da dovedu do uspostave fiziološke hematopoeze. Alogena transplantacija, s druge strane, nosi i svoje specifičnosti. Obzirom da su antigeni alogenog transplantata nepoznati organizmu primaoca, može doći do tzv. GVHR, ili u težim reakcijama do GVHD-a, ali isto tako i do pozitivne GVL, kada transplantat napadne preostale maligne stanice. Suprotno intuitivnom, alogena transplantacija se češće izvodi od stranih donora iz nacionalnih i globalnih registara, nego od braće i sestara, uzevši u obzir da se braća i sestre podudaraju u svim HLA lokusima relativno rijetko, a registri sadržavaju izrazito velik broj potencijalnih donora.(1) Osim o podudarnosti



HLA lokusa, uspješnost ovisi i o procijenjenom riziku bolesnika, količini transplantiranih stanica, tipu bolesti, vrsti kemoterapijskog protokola koji je ranije korišten, ali i o mjestu uzimanja matičnih stanica te dobi i podudarnosti spolova davaoca i primaoca.(91)Matične stanice izolirane iz pupkovine izazivaju manji imunski odgovor domaćina, zbog nezrelosti limfatičnih stanica i izostanka određenih površinskih antigena, pa zahtijeva i manju HLA podudarnost (zabilježena je tolerancija na *missmatch* 1-2 HLA lokusa). Očekivano je stoga, da se HSCT uz upotrebu matičnih stanica izoliranih iz pupkovine povezuje sa smanjenim rizikom od GVHD-a.(92,93)

Indikacije za HSCT su se napretkom drugih oblika terapije značajno mijenjale. CAR-T terapija, monoklonalna protutijela, inhibitori tirozinskih kinaza te upotreba sve intenzivnije i učinkovitije kemoterapije, poput liposomalnih antraciklina, ali i značajnog napretka u dijagnostici, prije svega u detekciji MRD-a i stratifikaciji bolesnika prema citogenetici i određenim translokacijama, postupno smanjuju potrebu za HSCT-om u zadnjim desetljećima. U cilju postizanja MRD-negativne remisije, nova terapijska sredstva mogu biti, ili prijelazno rješenje do konačnog HSCT-a, ili katkad čak i čimbenik konačnog izlječenja čime izbjegavamo sve rane i kasne komplikacije HSCT-a. Indikacije za HSCT u liječenju ALL-a su i dalje katkad kontroverzne, a na europskoj razini propisane su od strane *European Society for Blood and Marrow Transplantation*. Prema smjernicama HSCT je indiciran kod bolesti refraktornih na terapiju, relapsa bolesti, ali i u bolesnika vrlo visokog rizika nakon postizanja prve kompletne remisije (1KR).(94,95). HSCT nakon 2KR je manje uspješna ishoda. Stoga novije smjernice u slučaju relapsa nakon 2KR ili kod rezistentnih oblika bolesti daju prednost CAR-T terapiji.(96) Ove se preporuke odnose na B-imunofenotip ALL-a, dok se za T-ALL HSCT i dalje rutinski koristi nakon postizanja remisije.(95). Smjernice za liječenje AML-a također su slične, iako se u prošlosti HSCT rutinski koristio nakon postizanja remisije u slučaju dostupnosti HLA-identičnog donora, danas se uglavnom koristi kod bolesti refraktorne na terapiju, relapsa i nakon

postizanja remisije u bolesnika visokog rizika.(94,97) Može se zaključiti da će buduće smjernice za korištenje HSCT-a odrediti brzinu razvoja određenih grana terapije; odnosno hoće li se brže razvijati tehnike obrade presatka, imunosupresije bolesnika i imunosupresivne profilakse ili nove terapijske metode, poput CAR-T terapije, monoklonalnih protutijela i inhibitora tirozinskih kinaza. Naposljetku, bitno je napomenuti da se HSCT koristi i kod solidnih neoplazmi (neuroblastom, PNET), mijelodisplazija, ali i nemalighnih bolesti (sindromi zatajenja koštane srži - aplastična anemija, Fanconijeva anemija, Blackfan Diamondov sindrom...).(1)

GVHD možemo definirati kao nepovoljnu imunološku reakciju koja obuhvaća interakciju limfocita davaoca i antigena primaoca i koja se javlja najčešće nakon alogenog HSCT-a, a vrlo rijetko se može javiti i nakon autolognog HSCT-a ili transplantacije solidnog organa. Epidemiološke studije procjenjuju da čak 50% HSCT procedura dovede do nekog oblika GVHD-a s posljedičnim mortalitetom do 15%.(98–100) Rizični faktori uključuju HLA nepodudarnost, razliku u spolu davaoca i primaoca, HSC koje nisu porijeklom iz pupkovine, jaču terapiju kondicioniranja uz korištenje radioterapije, stariju životnu dob, CMV seronegativnost i korištenje neučinkovite profilakse.(101) Klinički i patofiziološki možemo razlikovati akutni i kronični GVHD. U patofiziologiji akutnog GVHD-a, sudjeluju 3 glavna mehanizma; povećana izloženost antigena domaćina limfocitima donora (uslijed kemoterapije, oslobađanja citokina, endotoksina iz flore bolesnika...), interakcija između APC-ova domaćina i samih limfocita te naposljetku ekspanzija Th1, Th17 i CD8+ citotoksičnih limfocita uslijed lučenja citokina koji vode u Th1 odgovor, primarno IL-2 i IFN $\gamma$ . Upravo ovi citotoksični limfociti su glavne efektorne stanice akutnog GVHD-a.(100,102) Prva faza cGVHD-a zapravo je istovjetna aGVHD-u, uslijed oštećenja tkiva također dolazi do otpuštanja citokina i endotoksina u cirkulaciju, što dovodi do promjena u reaktivnosti imunskog sustava, ali i promjena u fibroblastima i endotelnim stanicama. U ovih bolesnika primijećen je pojačan

izražaj Th1 odgovora, ali i Th2 i Th17 odgovora, porast razine IL-33, IL-1 i IL-1R uz pad udjela Treg stanica, što sve ponovno dovodi do napada CD8<sup>+</sup> limfocita na antigene domaćina koji su ogoljeni na MHC-I molekulama APC-ova domaćina. Treću fazu obilježava imunosupresija i rekurentne infekcije, ali i abnormalno cijeljenje uzrokovano prijašnjom aktivacijom endotelnih stanica i fibroblasta i povećanim lučenjem PDGF-a i TGF- $\beta$ . Upravo ovo dovodi do specifične, polimorfne kliničke slike cGVHD-a koja katkad može nalikovati na sustavne autoimunosne bolesti, kolagenoze i/ili pojedine vaskulitise. (100,103) Patofiziologija u pedijatrijskih pacijenata je slična, iako zahvaljujući preostaloj funkciji timusa dolazi do bolje destrukcije aloreaktivnih limfocita s posljedičnim manjim oštećenjem klasične trijade organa (koža, jetra, GI trakt), a ostale razlike su bolje cijeljenje oštećenja i razlike uslijed različitog sastava crijevnog mikrobioma i metabolizma imunosupresivnih lijekova. S druge strane, u pedijatrijskih pacijenata viđa se i oštećenje koštane srži i limfnih čvorova s posljedičnim smetnjama u imunskom sustavu i hematopoezi, što se sve pogoduje riziku od cGVHD-a. Bitno je napomenuti da je cGVHD i dalje učestaliji u odraslih. (104)

Kliničke manifestacije aGVHD najčešće i najranije su dermatološke; makulopapularni osip dlanova, stopala, ramena i vrata koji može biti praćen svrbežom i boli. (100) Nakon toga slijede simptomi od strane GI sustava, poput abdominalnih grčeva, boli i proljeva. Proljev je obilan i sekretoran, ne prestaje prestankom unosa hrana, a katkad može biti i krvav. Katkad se može razviti i intestinalni mukozitis i crijevna oštećenja koja se ne smiju zamijeniti sa posljedicama kemo- ili radioterapije. Jetreni simptomi se gotovo nikad ne pojavljuju sami, a uključuju povišenje ALP-a i bilirubina. Rijetko kada može nastati i akutno zatajenje jetre, karakterizirano koagulopatijom i hiperamonijemijom. (98–100,105) aGVHD se prezentira slično u pedijatrijskih pacijenata, iako se češće radi o izoliranom zahvaćanju kože, nego multiorganskom obliku bolesti, a značajno rjeđe je zahvaćena jetra. (106). Kronični GVHD se može prezentirati i stanjima koja podsjećaju na kolagenoze i autoimunosne bolesti (lichen

planus, kutana skleroderma, keratoconjunctivitis sicca/Sjögrenov sindrom, bronchiolitis obliterans te razni ulceri i strikture GI trakta). (98,100,105,107,108)(109)

Dijagnoza GVHD-a se postavlja na temelju kliničke slike i anamnestičkih podataka o prethodnom HSCT-u te se nakon toga pristupa stupnjevanju prema težini same kliničke slike i vremenu pojavljivanja. Prema zadnjim smjernicama NIH-a iz 2015. za postavljanje dijagnoze cGVHD-a dovoljno je samo jedno dijagnostičko obilježje (potvrđuje cGVHD bez potrebe za daljnjim pretragama) ili jedno distinktivno obilježje (ukazuje na cGVHD, ali može se pojaviti i kod aGVHD-a) uz potvrdu biopsijom ciljnog organa te isključenje ostalih potencijalnih uzroka ovih simptoma i znakova. U dijagnostička obilježja spadaju poikilodermija, promjene slične *lichen planusu* u usnoj šupljini i na genitalijama, zahvaćanje fascija s mogućom sklerozom kože i potkožnog tkiva uz kontrakture zglobova, ezofagealne strikture dokazane endoskopski ili radiološki i *bronchiolitis obliterans*. U slučaju da se javljaju samo kliničke manifestacije cGVHD-a, ovaj oblik nazivamo *klasični cGVHD*, a u slučaju pojave kliničkih obilježja i akutnog i kroničnog oblika, nazivamo ga *overlap GVHD*. U slučaju pojave simptoma samo aGVHD, prema vremenu pojavljivanja razlikujemo *klasični aGVHD* (javlja se unutar 100 dana od HSCT-a), *late onset aGVHD* (javlja se nakon perioda od 100 dana od HSCT-a) te *perzistentni* i *rekurentni aGVHD*. (110,111) Prema težini aGVHD dijelimo u 4 stupnja, iako postoje razne podjele, na temelju triju glavnih obilježja; kožnih manifestacija (makulopapularni osip, generalizirani eritem ili generalizirani eritem sa bulama), GI manifestacija (količina proljeva u mL/d) te jetrenih manifestacija (razina bilirubina u mg/dL). cGVHD se stupnjuje prema broju zahvaćenih organa, stupnju zahvaćenosti organa i funkcijskim ograničenjima bolesnika u 4 stupnja, iako također postoje razne podjele. (98–100)

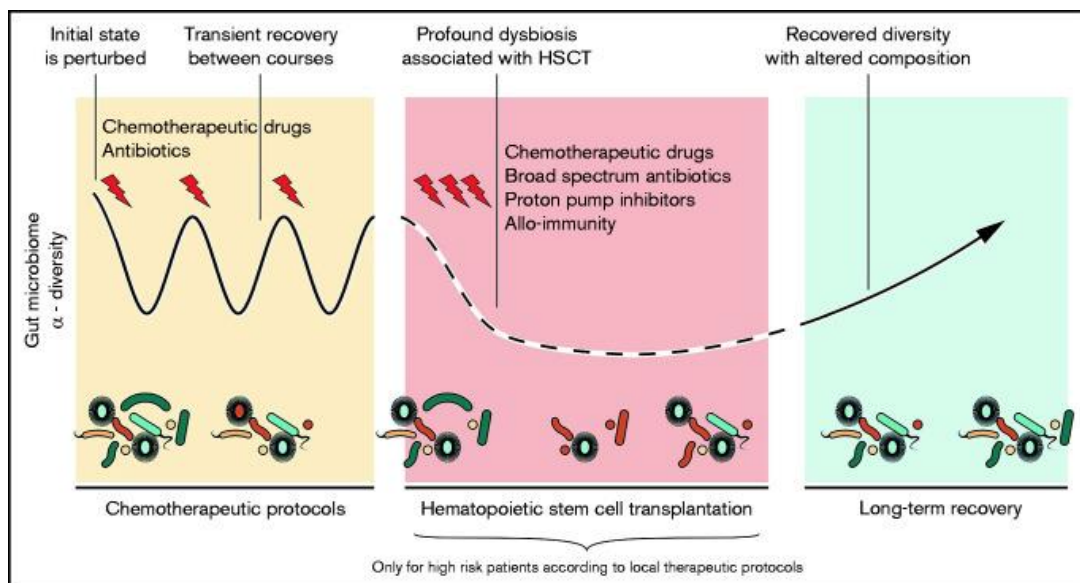
Prevenција GVHD-a dugo je bio središnji problem istraživanja u ovom području, što je i očekivano, uzevši u obzir nezanemariv mortalitet i terapijsku refrakciju aGVHD-a III. i IV. stupnja. Postoje različiti principi prevencije nakon HSCT-a; prvi preventivni standard postala

je kombinacija metotreksata i ciklosporina ili metotreksata i takrolimusa. Nisu pronađene razlike u djelotvornosti ove dvije kombinacije, ali su obje značajno djelotvornije od monoterapije metoteksatom. U svrhu prevencije toksičnosti metotreksata, koja uključuju mijelosupresiju, mukozitis, plućnu fibrozu, hepatotoksičnost, pa čak i neurološke deficite, uveden je terapijski režim u obliku kombinacije mikofenolat mofetila i takrolimusa, a kasnije i drugih inhibitora kalcineurina i mTOR inhibitora.(98–100,112–114) Sljedeća hipoteza istraživača bila je da bi uklanjanje citotoksičnih limfocita donora iz grafta moglo značajno smanjiti incidenciju GVHD-a. Postoje dva glavna pristupa, ili se limfociti pokušaju ukloniti prije transplantacije upotrebom pozitivne selekcije na temelju CD34+ matičnih krvotvornih stanica, ili se limfocite nastoji uništiti nakon transplantata upotrebom ATG-a. Obje ove tehnike bile su izrazito popularne krajem 20.st., međutim obje su povezane s povećanim rizikom od infekcija, a primjena ATG-a povezana je i s povećanom incidencijom relapsa bolesti, reaktivacijom latentnih infekcija poput VZV-a i EBV-a, kao i s njim povezanim limfoproliferativnim bolestima. Iz ovih ranije navedenih razloga, danas su ove metode prevencije rezervirane isključivo za primaoce matičnih stanica od manje srodnih, haploidentičnih donora.(98,99,115–117) Naposljedku, ove nuspojave dovele su do pokušaja pronalaženja novih tehnika prevencije GVHD-a, poput infuzije Treg stanica, parcijalnog uklanjanja samo aloreaktivnih limfocita donora i upotrebe posttransplantacijskog ciklofosfamida/PT-Cy.(118) Tzv. PT-Cy u kombinaciji s mikofenolatom i takrolimusom pokazao se značajno učinkovitiji od dvojne terapije bez ciklofosfamida. PT-Cy selektivno uništava aloreaktivne CD8+ limfocite, sprječavajući GVHR uz istovremeno očuvanje GVLR, a osim toga također sprječava i aktivaciju ovih limfocita, a vjerojatno pojačava i aktivnost Treg stanica uz smanjenje aktivnosti B-limfocita i APC-ova domaćina. Upravo zato PT-Cy je najrelevantniji *trend* u prevenciji aGVHD-a, a posebno jako suprimira GI manifestacije aGVHD-a uz istovremeno očuvanje GLVR-a, što je izrazito važno.(114,118–122) Prevencija

cGVHD-a, generalno govoreći, nije toliko učinkovita kao prevencija akutnog oblika bolesti, a koriste se uglavnom ATG i rituksimab. Ostale, modernije metode uključuju primjenu PT-Cy, razne kombinacije metotreksata i inhibitora kalcineurina, MSC-a i ekstrakorporalne fotofereze. Sve profilaktičke metode, koje se koriste u odraslih, koriste se i u djece, a prvu liniju također predstavlja primjena inhibitora kalcineurina, ciklosporina ili takrolimusa sa ili bez dodatka metotreksata ili mikofenolata. Važno je naglasiti da zasad ne postoje čvrsto definirane smjernice za profilaksu aGVHD-a u djece te da je trenutno u tijeku više studija koje ispituju učinkovitost protokola koji se provode u odraslih pacijenata. (99,100,104,123,124)

Liječenje akutnog GVHD-a temelji se na oralnim i/ili lokalnim kortikosteroidima, pri čemu se topički kortikosteroidi koriste kao monoterapija isključivo pri izoliranom kožnom obliku bolesti, odnosno pri aGVHD-u I.stupnja, kod kojeg se rano uvođenje sistemske terapije nije pokazalo osobito učinkovitim. Sistemska terapija temelji se na metilprednizolonu u dozi od 2 mg/kg dnevno kroz 1-2 tjedna uz postupnu deeskalaciju doze (98–100,125) (124) Višestruko više doze nisu dovele do boljeg ishoda liječenja, a povezuju se sa značajnom imunosupresijom, pa stoga možemo reći da je pri liječenju GVHD-a ključna ravnoteža između imunosupresije i rizika od rekurentnih infekcija, a upravo zato ovi bolesnici vrlo često trebaju profilaksu antibioticima, antivirusicima i antifungicima.(99,100) Alternativna terapija je kombinacija kortikosteroida i mikofenolata, ali ova terapija nije pokazala značajno bolje preživljenje uz jednak rizik od infekcije.(126) Istraživanja su pokazala da između 30-50% pedijatrijskih bolesnika reagira na inicijalno liječenje, a terapijsku rezistenciju definiramo kao progresiju bolesti unutar 3-5 dana od početka liječenja, izostanak odgovora nakon 2 tjedna i relaps bolesti pri deeskalaciji doze.(99,100) Drugi terapijski pristupi su izrazito brojni, a vrlo često se kombiniraju i s kortikosteroidima. U terapijske pristupe za rezistentne oblike bolesti ubrajamo ATG i razna monoklonalna protutijela; infliksimab koji cilja TNF- $\alpha$ , alemtuzumab za CD52 antigen T-limfocita i razna protutijela koja ciljaju IL-1, IL-1R i IL-2R.(127) Rezultati ovih

metoda su obično kratkotrajni i povezani sa znatnim nuspojavama, a refraktorni GVHD dovodi do smrti u čak do 80% slučajeva.(99) Ovakav mortalitet doveo je do potrage za novim terapijskim metodama poput primjene MSC-a (djeluju poticanjem imunoregulacije putem ekspanzije Treg stanica i lučenjem protuupalnih citokina poput IL-10, uz poticanje ispravnog cijeljenja tkiva i očuvanje učinkovite GVLR), ekstrakorpolarne fotofereze (UVA svjetlo djeluju na krv izloženu 8-metoksiporsoralenu tako da uzrokuje apoptozu limfocita uz povećano lučenje protuupalnih citokina iz APC-a domaćina), infuzije alfa-1-antitripsina, JAK1/JAK2 inhibitora JAK/STAT signalnog puta (ruxolitinib), MEK inhibitora te inhibitora integrina  $\alpha 4\beta 7$  koji se koriste i kod UC i Crohnove bolesti (vedolizumab).(98,99,128) Prvu liniju liječenja GVHD-a u djece također čine kortikosteroidi, iako je prikladna doza i dalje kontroverzna, a učinkovitost gotovo svih modaliteta liječenja, koji se koriste u odraslih, se trenutno ispituje.(104,124)



**Slika 2.** Shematski prikaz svih uzroka disbioze prilikom HSCT-a. Kao što sam već napomenuo, i prilikom postavljanja dijagnoze akutne leukemije postoji početno stanje smanjene alfa raznolikosti, koje kemoterapijski protokoli i antibiotici, pogotovo ako se ne propisuju racionalno, dodatno pogoršavaju. Prilikom kemoterapije dolazi do prolaznog oporavka flore između ciklusa liječenja, što se vidi s lijeve strane dijagrama, međutim prilikom HSCT-a, uslijed *priming* terapije, korištenja antibiotika širokog spektra, IPP-ova te parenteralne prehrane dolazi do snažnog pada alfa raznolikosti koji može iznositi i

do 30%, a javlja se u do 70% svih pacijenata. S desne strane dijagrama, vidimo da flora može ostati i trajno promijenjena u svojim relativnim zastupljenostima, unatoč oporavka brojnosti bakterija, što se katkad manifestira kao *rizična konfiguracija* flore za GVHD, o kojoj će kasnije biti govora. Preuzeto iz referencije. (74)

Znajući da je GVHD zapravo bolest koja nastaje reakcijom donorovih limfocita na antigene primaoca možemo zaključiti da su i antigeni crijevne flore, odnosno bakterija, bitni u formiranju imunosne tolerancije. Osim ove pretpostavke, može se pretpostaviti i da promjene crijevne flore, koje se dogode uslijed primjene kemoterapije i antibiotika prilikom provedbe HSCT-a, a dovode do povećane sklonosti infekcijama i oštećenja crijevno-krvne barijere, jednako tako dovode i do povećanog izlaganja antigena iz GI trakta aloreaktivnim limfocitima. Ove dvije pretpostavke pobudile su interes za istraživanje povezanosti crijevne disbioze i aGVHD-a GI trakta, a kasnije i za povezanost s aGVHD-om svih oblika te cGVHD-om. Iz tog razloga, postavlja se pitanje postoje li određene predispozicije crijevne flore za GVHD i prije samog početka liječenja, a isto tako postoji li nakon kemoterapije i/ili upotrebe antibiotika određeni fenotip crijevne flore koji je izrazito sklon razvoju GVHD-a. Znajući da antibiotici i kemoterapija utječu na crijevnju floru, istraživači su počeli uspoređivati učestalost GVHD-a kod pacijenata koji su primali antibiotike i onih koji nisu te uspoređivati učestalost od GVHD-a kod različitih profila crijevne flore, a sve u cilju moguće profilakse GVHD-a. Glavni cilj ovih istraživanja je da se, osim današnje imunosupresivne profilakse, uvede i profilaksa crijevne flore, na bazi fekalnog transplantata i probiotika. Mora se reći i da sam proces HSCT-a izrazito jako utječe na crijevnju floru, ali isto tako da, unatoč upotrebi kemoterapeutika i antibiotika, crijevna flora neposredno prije provođenja HSCT-a pokazuje gotovo jednaka obilježja kao flora zdrave djece, odnosno odraslih. Iako su po pitanju ove tvrdnje istraživanja kontradiktorna, svakako možemo reći da je HSCT izrazito jak modulator crijevne flore.(129) Faktori uslijed HSCT-a koji modificiraju crijevnju mikrobiotu uključuju *priming* terapiju, profilaktične



antibiotike (prilikom neutropenije) i oblik prehrane uz IPP-ove.(129,130) Prosječno gubitak alfa raznolikosti iznosi 30%, a javlja se u do 70% pacijenata koji prođu HSCT, a manifestira se kao značajna invazija streptokoka i enterokoka uz gubitak roda *Faecalibacterium*, važnog proizvođača SCFA, i roda *Ruminococcus*, bitnog za ispravnu glikozilaciju molekula crijevne sluzi i površinskih molekula enterocita, bitnih za očuvanje crijevno-krvne barijere.(74,75,129,131,132). SCFA predstavljaju glavni izvor hrane za enterocite te su stoga bitni za proizvodnju proteina koji čine *tight junctions* spojeve između enterocita.(77) Međutim, SCFA (propionat i butirat) su i izravno povezani s rizikom od GVHD-a. Naime, pokazalo se da komenzali koji proizvode SCFA smanjuju rizik od cGVHD-a, povećavajući proizvodnju Treg stanica nauštrb Th17 stanica, a i putem brojnih mehanizama moduliraju razinu oštećenja GI trakta prilikom aGVHD-a.(133) Većina ovih mehanizama je nepoznata, međutim pokazalo se da pacijenti koji imaju odsutan G-proteinski metabolički senzor, GPR43, obolijevaju od težih oblika GI aGVHD-a. GPR43, u prisustvu povećanih razina SCFA, dovodi do aktivacije ERK signalnog puta i aktivacije NLRP3 inflamosoma.(134) Eksperimentima su dokazani brojni protuupalni efekti SCFA, koji mogu imati učinak na pojavu GVHD-a, a događaju se i u stanicama imunskog sustava, ali i u drugim stanicama. SCFA povećavaju brojnost i diferencijaciju te lučenje sluzi vrčastih stanica, a osim toga su i inhibitori HDAC te stoga moćni regulatori genske ekspresije. U neutrofilima dovode do pada ekspresije gena za TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B i smanjenu sintezu NO, djeluju na ekspresiju protuupalnih citokina u makrofazima i dendritičnim stanicama, povećavaju lučenje IL-18 u enterocitima te tako dovode do popravka crijevno-krvne barijere, a i povećavaju diferencijaciju Foxp3<sup>+</sup> Treg limfocita koji proizvode protuupalni citokin IL-10.(135)

Gubitak ovih bitnih komenzala je bio očekivan, zbog upotrebe antibiotika uslijed HSCT-a, no međutim predmet istraživanja dugo je bio uzrok prerastanja potencijalno patogene flore. Pretpostavlja se gubitak komenzala prethodi ovom prerastanju i dovodi do smanjene

proizvodnje antimikrobnih peptida, poput alfa defenzina, iz Panethovih stanica, što naposljetku dovodi do porasta relativne zastupljenosti enterokoka. Do ovoga efekta dolazi jer je lučenje AMP-ova, poput alfa defenzina, direktno ovisno o tome da Panethove stanice detektiraju prisustvo komenzalne flore.(132,136) Porast zastupljenosti enterokoka se povezuje i s incidencijom infekcija, porastom CRP-a i rizika od febrilne neutropenije, osobito porast iznad 30% relativne zastupljenosti.(73) Kod pacijenata, koji naposljetku i razviju GI oblik GVHD-a, može doći do zatvaranja začaranog kruga, odnosno aloreaktivni CD8+ limfociti napadaju Panethove stanice, što dovodi do daljnje ekspanzije enterokoka. (137)

Nakon što je otkriveno kako HSCT modificira crijevnu floru, središte zanimanja postalo je traganje za određenim prediktorima učinka HSCT-a na floru, odnosno, koje promjene u flori nakon HSCT-a možemo povezati sa povećanim rizikom za GVHD. Ovo je važno jer su brojna istraživanja, koja su podijelila skupine ispitanika po alfa raznolikosti, zaključila da postoji obrnuta proporcionalnost između alfa raznolikosti nakon izvedbe HSCT-a i razvoja GVHD-a, pa i mortaliteta od GVHD-a, kako u odraslih, tako i u pedijatrijskih pacijenata.(138–140) Osim toga, modifikacija crijevne flore HSCT-om značajno je povezana, ne samo s rizikom od GVHD-a, nego i s rizikom od infekcija, što pridonosi mortalitetu. Značajno je istraživanje Kelly M. S. i sur. iz 2019., koje je pokazalo da su uzročnici pedijatrijskih bakterijemija podrijetlom iz GI trakta upravo oni isti uzročnici kojima je značajno porasla zastupljenost nakon HSCT-a. Istraživači su do ove spoznaje došli uspoređivanjem hemokultura i koprokultura ispitanika, a također su dokazali i da su uzročnici vrlo često rezistentni upravo na antibiotik koji se koristio neposredno prije infekcije, dovodeći u pitanje agresivno korištenje antibiotika u djece nakon HSCT-a.(141) Zasad su pronađena tri prediktora razvoja GVHD-a, niska zastupljenost roda *Bacteroides* nakon HSCT, niska koncentracija 3-indoksil sulfata u urinu te niska relativna zastupljenost AIC.(132,142) Rod *Bacteroides* je bitan prediktor jer on čini glavninu od 10% izvorne crijevne flore koja preživi nakon HSCT-a te je stoga glavni temelj za ponovnu izgradnju

crijevne flore, što se prosječno zbiva u roku od 2 do 4 mjeseca nakon transplantacije, ako ne dođe do razvoja GVHD-a. Osim toga, rod *Bacteroides* je važan proizvođač SCFA, induktor proizvodnje Treg limfocita, a inhibitor aloreaktivnih citotoksičnih limfocita.(132,143,144) S druge strane, 3-indoksil sulfat je ekskretorni metabolit triptofana, čiji međuprodukti su bitni za unutarstaničnu regulaciju enterocita i pojačanu ekspresiju gena koji kodiraju za protuupalne citokine.(145,146) Osim toga, gubitak AIC (protuupalne klostridije) također se povezuje s rizikom od GVHD-a i prerastanjem enterokoka u pedijatrijskih pacijenata.(142) Gubitak ovih klostridija najčešće se javlja kod upotrebe klasičnih antibiotika koji djeluje na anaerobe, klindamicina i vankomicina. Nije točno utvrđeno na koji način AIC modificiraju rizik od GVHD-a, ali pokazalo se da je povećana relativna zastupljenost AIC-a u djece povezana s bržim oporavkom broja B-limfocita i NK- stanica, koje suprimiraju aloreaktivne T-limfocite, te tako dovode smanjenog rizika od GVHD-a.(147) Istraživanje Simms-Waldrup T R i sur. (2017.) provedeno na pedijatrijskoj populaciji od 8 oboljelih od GVHD-a i 8 kontrola pokazalo je izrazito smanjenje zastupljenosti AIC kod oboljelih i izrazito jaku korelaciju između upotrebe antibiotika učinkovitih protiv anaeroba i GVHD-a ( $p < 0,03$ ). Kasnije su ovu hipotezu potvrdili i na mišjim modela, tako da su miševi, koji su primali oralnu suplementaciju AIC-a, pokazali značajno smanjenu učestalost GVHD-a.(142) Postavlja se pitanje o mogućnosti sličnih intervencija probioticima i kod pedijatrijskih pacijenata za koje prethodno utvrdimo da posjeduju rizičnu konfiguraciju mikrobiote. Rizičnu konfiguraciju crijevne flore mogli bismo modificirati i fekalnom transplantatom. Naposljetku, treba ponoviti i da su parenteralna prehrana i neadekvatna *priming* terapija, bez imunosupresivne profilakse, rizični faktori za razvoj GVHD-a.(148)

Nakon detaljnog pregleda mikrobiote nakon HSCT-a i njene povezanosti s razvojem GVHD-a, treba se osvrnuti i na strukturu crijevne flore u slučaju razvoja GVHD-a. Pedijatrijski, mišji i odrasli modeli pokazali su da je crijevena flora u GVHD-u vrlo slična kompoziciji „rizične flore“

nakon HSCT-a. Ovakva kompozicija flore u GVHD-u samo potvrđuje da su, već prije raspravljani rizični faktori, zaista povezani s razvojem GVHD-a. U odraslih i u djece primijećena je ekspanzija redova *Enterobacteriales* (rodovi *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*), *Lactobacilles* (streptokoki i enterokoki) uz redukciju protuupalnog reda *Clostridiales* (rodovi *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* i *Blautia*). (149–151) Rodovi *Ruminococcus* i *Faecalibacterium* preko proizvodnje protuupalnih SCFA i održavanja krvno-crijevne barijere sprječavaju razvoj GVHD-a. S druge strane ekspanzija enterokoka, specifično *E. faecium* i *E. faecalis*, povezana je s povećanim stvaranjem IL-1 i IL-6 te indukcijom Th1 i Th17 odgovora. (152,153) Dosad nisam spomenuo značaj jedne bitne AIC, roda *Blautia*. *Blautia* je povezana sa smanjenim mortalitetom od GVHD-a, vjerojatno radi proizvodnje lantibiotika, koji smanjuju zastupljenost enterokoka, pa čak i VRE. Lantibiotici su posebna vrsta endogenih AMP-ova koji sadrže posebne aminokiseline nastale formiranjem tioeterske veze nakon posttranslacijskih modifikacija na serinskim i treoninskim ostacima. (154,155)

Zaključno, iako su, generalno govoreći, pedijatrijska istraživanja u području povezanosti crijevne disbioze i HSCT-a dobila na značaju tek u zadnjih 5-7 godina, već sada možemo vidjeti da se istraživanja u svojim zaključcima uvelike slažu s istraživanjima provedenim na odraslima. Već je spomenuto da crijevna flora djece nakon HSCT-a i u slučaju razvoja GVHD-a pokazuje promjene relativne zastupljenosti istih redova, rodova i vrsta kao i odraslih, što upućuje na značajnost crijevne disbioze u razvoju GVHD-a kod pedijatrijskih pacijenata. (129,151) Posebno je značajno kohortno istraživanje Masetti R. i sur. (2023.) koje je obuhvatilo 90 pacijenata iz više centara. Istraživanje je pokazalo smanjenu alfa raznolikost (*Shannon* indeks) u korelaciji s incidencijom i mortalitetom aGVHD-a, ekspanziju enterokoka i redukciju relativne zastupljenosti rodova *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* i *Blautia*, što se sve uklapa u zaključke istraživanja na odraslima. (74,132,140) Studija Ingham A. C. i sur. (2021.) bavila se uzimanjem uzoraka mikrobiote usta, nosa i crijeva djece u 3 različita razdoblja nakon

transplantacije. Pokazalo se da je crijevna flora, kao i u odraslih, mjesec dana nakon transplantacije pokazuje smanjenu raznolikost, a da se oporavi prosječno 2-4 mjeseca nakon alogene HSCT. Bitno je naglasiti da rezultati odgovaraju studijima u odraslih; primijećena je ekspanzija enterokoka uz redukciju *Blautia spp.* Ono što je izrazito značajno je da istraživači teoretiziraju da bi proučavanje ranih uzoraka flore nakon HSCT-a ili usporedba ranih uzoraka s uzorkom flore prije HSCT moglo, u budućnosti, postati značajna metoda u utvrđivanju rizika od razvoja pedijatrijskog GVHD-a, što bi moglo dovesti i do individualne prilagodbe profilakse imunosupresivima, a u budućnosti i do individualne profilakse probioticima i fekalnim transplantatom.(156)

## **2.8. Dugoročne posljedice crijevnne disbioze**

Bitno je napomenuti i određene dugoročne posljedice koje crijevna disbioza, uzrokovana kemoterapijom, antibioticima i HSCT-om, može imati na cjelokupni organizam i zdravlje djeteta. Teško je odrediti koliko točno antibiotici, a koliko kemoterapija i HSCT utječu na crijevnnu disbiozu, budući da se ovi čimbenici u praksi uvijek pojavljuju istovremeno, što značajno otežava moguća longitudinalna kohortna istraživanja. Osim toga, disbioza ovisi i o faktorima domaćina, faktorima antibiotika (vrsta, doza, višekratno i dugotrajno korištenje), faktorima kemoterapeutika (jačina i vrsta kemoterapijskog protokola) i o brojnim drugim čimbenicima koji se teško kvantificiraju i objektiviziraju. Iz svih ovih razloga, istraživanja po pitanju dugotrajnosti učinaka ovih čimbenika na crijevnnu floru su kontradiktorna. Općenito se kaže da se crijevna flora oporavi otprilike godinu dana nakon prestanka terapije, ali njena kompozicija može biti promijenjena značajno dulje, s tim i ovdje postoji kontradiktornost različitih studija.(74) Istraživanje Bhuta R. i sur. (2021.) provedeno je na 10 preživjelih pedijatrijskih pacijenata, koji su u remisiji ALL-a, i 10 zdravih kontrola. Bolesnici i kontrole su bili u srodstvu i stariji od 3 godine (dob kada bi crijevna mikrobiota već trebala biti fiziološki stabilna), kako bi se maksimalno smanjio učinak *confoundera*, a maksimalno naglasio učinak

antibiotika i kemoterapije. Istraživanje je pokazalo da, s razinom statističke značajnosti  $p < 0,1$ , postoji značajna razlika i smanjenje alfa raznolikosti kod preživjelih bolesnika u odnosu na kontrole. Ovakvo smanjenje alfa raznolikosti ostaje održano i do nekoliko godina nakon prestanka terapije. Mana ovog istraživanja je da istraživači nisu pronašli konkretne porodice, rodove i vrste bakterije koje izostaju kod većine preživjelih, a mana je i izuzetno mali uzorak.(157) S druge strane, istraživanje Thomas R. i sur. (2020.) pokazalo je da ne postoji značajna razlika između alfa i beta raznolikosti preživjelih i kontrola, s tim da su uzorci uzeti minimalno godinu dana nakon ulaska u remisiju. Važno je napomenuti da određene porodice ipak pokazuju smanjeni relativni udio, poput *Ruminococcaceae* (povezani su s rizikom od intestinalnog mukozitisa radi svog mukolitičkog djelovanja)(75), *Lachnospiraceae*, a rod *Faecalibacterium* također je značajno smanjen.(158) Rod *Faecalibacterium* značajan je iz dva razloga, također nedostaje i kod odraslih, a ne samo kod pedijatrijskih pacijenata, a osim toga njegov manjak povezuje se sa povišenim razinama proupalnih citokina poput IL-1 i IL-6 te povećanom aktivnošću citotoksičnih T-limfocita, kao i s porastom CRP-a i incidencije crijevnih infekcija.(55)

Rod *Faecalibacterium*, odnosno njegov relativni manjak, u odraslih koji su preživjeli ALL, povezan je s pretilošću.(159) Odrasle osobe nakon liječenja imaju povećan rizik od raznih metaboličkih, multifaktorijskih bolesti; razvoja metaboličkog sindroma, KVB i DM2.(160) Studija u pedijatrijskoj populaciji je značajno manje, ali također postoje raznovrsne toksičnosti koje povezujemo s određenim agensima iz kemoterapijskih protokola. Ovdje spadaju sekundarne maligne neoplazme (povećan rizik od sekundarnog raka dojke kod ženske djece liječene antraciklinom), dilatativna kardiomiopatija (antraciklini), plućna fibroza (bleomicin), neurotoksičnost, akutna neuropatija i kognitivne promjene (vinkristin) te pretilost, koštana degradacija i ijtrogeni Cushingov sindrom u sklopu korištenja glukokortikoida. Osim ovih prethodno navedenih učinaka, postoje i brojno metaboličke, razvojne i psihosocijalne

posljedice na pedijatrijske pacijente.(161–164) Al-Mahayri Z N i sur. (2021.) predlažu da bi ubuduće genetskim metodama trebalo testirati pedijatrijske pacijente na određene tumor-supresorske gene (*TP53*, *POT1*), kako bi se kod ovih pacijenata smanjio intenzitet kemoterapije i/ili zračenja u svrhu prevenciju sekundarnih neoplazmi.(164) Trebalo bi provesti još više dugotrajnih istraživanja (praćenje pedijatrijskih pacijenata s ALL-om kroz cijelo odrastanje i odraslu dob) pri čemu bi se pratili učinci raznih modaliteta liječenja akutnih leukemija, u svrhu utvrđivanja korelacije između rizičnih čimbenika i određenih bolesti. Prethodno navedeni, dugoročni učinci kemoterapijskih protokola na djecu su svi posljedica izravne toksičnosti lijekova, a ne potencijalno dugoročnih promjena mikrobiote. Moguće je i da dugoročni efekti promjena crijeva, poput povećane incidencije metaboličkog sindroma u odraslih, u djece izostaju, ali svakako je potrebno provesti dugoročna istraživanja u djece koja bi ovo utvrdila.

### **3. Rasprava**

#### **3.1. Istraživanja povezanosti disbioze i akutnih leukemija**

Nakon što sam se bavio crijevnom mikrobiotom kao rizičnim faktorom, kako za samu pojavu akutnih leukemija u djece, tako i za povećan mortalitet povezan s liječenjem te pojavu GVHD-a, postavlja se pitanje kako se u svakodnevnoj kliničkoj praksi može pratiti i modificirati crijevnu mikrobiotu, kako bi se postigao povoljniji ishod za pedijatrijske pacijente. Bitno je spomenuti da niska incidencija akutnih leukemija, u usporedbi s drugim bolestima, koje povezujemo sa smanjenom raznolikosti mikrobiote, poput alergija i DM1, značajno otežava velike studije. Osim toga, već sam na samom početku rada napomenuo da brojni okolišni čimbenici, poput metode poroda, dojenja, geografskog područja, prehrane i socijalne izloženosti djeteta, značajno utječu na crijevnu floru. Naposljetku, bitno je napomenuti da, u slučaju da želimo uspoređivati kompoziciju crijevne mikrobiote u djece s akutnim leukemijama i u djece s alergijama i autoimunim bolestima, u cilju pronalaska zajedničkih profilaktičkih metoda, postoji potreba za standardiziranim načinom prijavljivanja podataka o crijevnoj

mikrobioti. Sve što sam prethodno naveo dovodi do zaključka da će u daljnjem proučavanju povezanosti crijevne mikrobiote i akutnih leukemija biti ključna velika presječna istraživanja koja će obuhvatiti širok raspon djece različitih karakteristika, različite dobi, geografskih područja, rizika iz djetinjstva (socijalna izolacija, carski rez, izostanak dojenja), terapijskih postupaka prilikom liječenja (korištenje antibiotika uslijed kemoterapije) te različitih citogenetičkih poremećaja. U budućnosti bit će potrebno povezati crijevnu disbiozu i s drugim leukemijama, poput AML-a i/ili ALL-om T-imunofenotipa, i s drugim bolestima, poput alergija, DM1 ili multiple skleroze, u svrhu unaprjeđenja znanja o interakcijama između crijevne mikrobiote i imunskog sustava pedijatrijskih pacijenata te potencijalnog pronalaska zajedničkih profilaktičkih metoda.(74) Upravo radi ovakvih velikih analiza, ključno je uspostaviti standardizirani način prikupljanja i objavljivanja podataka, što se može postići tako da istraživači prate određene *checkliste* prilikom izrade istraživanja, poput *STORMS (Strengthening The Organizing and Reporting of Microbiome Studies)* smjernica, što će olakšati usporedbu podataka.(165) Zadnja bitna činjenica, koju je potrebno uzeti u obzir prilikom ovakvih istraživanja, je specifičnost dječje mikrobiote. Već sam spomenuo kako dječja mikrobiota u prvih par godina života pokazuje značajne promjene alfa raznolikosti ovisno o vanjskim faktorima te smanjenje beta raznolikosti prilikom starenja.(19) Upravo stoga, što djeca između sebe pokazuju i značajno veću beta raznolikost, nego odrasli, a i značajno veće razlike u kompoziciji same flore (alfa raznolikost), dizajniranje istraživanja na djeci mnogo je kompleksnije nego na odraslima. Odnosno, mnogo je lakše izvlačiti zaključke iz istraživanja flore odraslih, čije su flore međusobno sličnije na početku liječenja, u usporedbi s pedijatrijskim pacijentima.

### **3.2. Tradicionalne metode modifikacije crijevne mikrobiote**

Bez obzira na sve izazove u provedbi ovakvih istraživanja, već se naziru određene profilaktičke metode koje bi mogle značajno modificirati ishod liječenja pedijatrijskih pacijenata u



svakodnevnoj kliničkoj praksi. Metode primarne profilakse su ograničene, iako postoje dokazi da suplementacija bakterijama *Lactobacillus* i *Bifidobacterium spp.* nakon poroda može smanjiti rizik od razvoja astme, neonatalne sepse, pa čak i ispraviti disbiozu kod djece rođene carskim rezom ili prije termina, ne zna se mnogo o dugoročnoj učinkovitosti ovih mjera te su potrebna daljnja istraživanja, a postoji i rizik od razvoja sepse kod primjene probiotika u nedonoščadi.(166–168) Osim toga, barem u bliskoj budućnosti, teško je za očekivati da će se svoj novorođenih djeci iz uzoraka krvi utvrđivati citogenetika, u svrhu pronalaska određenih mutacija koje predisponiraju za razvoj ALL-a, te se potom toj djeci pokušati utjecati na imunosni sustav određenim profilaktičkim metodama. Naravno, treba se poticati pravilna prehrana uz adekvatno dojenje, prikladno socijalno izlaganje djeteta te korištenje poroda carskim rezom samo kada postoji ispravna indikacija, ali to je otprilike sve što se danas može učiniti na razini primarne prevencije. U trenutnoj kliničkoj praksi, po mom mišljenju, fokus bi trebao biti na sekundarnoj prevenciji, odnosno modificiranju crijevne flore, kako bismo smanjili komplikacije vezane uz liječenje leukemija. Najjednostavnije mjere, poput individualne prilagodbe terapije i racionalnog korištenja antibiotika, već se sada provode u kliničkoj praksi. Već sam se prije bavio smjernicama za korištenje antibiotika i svim potencijalnim štetnim posljedicama njihove prekomjerne upotrebe na floru, a što se individualizacije terapije tiče već sam spomenuo da određeni znanstvenici predlažu testiranje na mutacije određenih protoonkogenih i tumor-supresorskih gena, u svrhu smanjenja intenziteta terapije kod ovih pacijenata, radi prevencije razvoja sekundarnih neoplazmi.(164)

### **3.3. Suvremene metode modifikacije crijevne mikrobiote**

S druge strane, nove profilaktičke metode poput praćenja promjena crijevne flore prilikom liječenja radi otkrivanja rizičnih obrazaca, modifikacije prehrane prilikom liječenja, korištenja prebiotika, probiotika i postbiotika te fekalnog transplantata, još su u povojima kod pedijatrijskih pacijenata. Već sam napomenuo prednosti enteralne prehrane nad parenteralnom,

posebno smanjen rizik od pojave GVHD-a, a trenutno su u tijeku i klinička istraživanja u kojima se pedijatrijski pacijenti s ALL-om podvrgavaju prehrani na bazi organske hrane bogate vlaknima koja bi mogla dovesti do povoljnijeg profila mikrobiote u ovih bolesnika.(74)

Prebiotike možemo definirati kao „tvari koje mikroorganizmi domaćina selektivno koriste, a dovode do poboljšanja zdravlja“, a karakterizira ih otpornost na razgradnju i apsorpciju u GI traktu, mogućnost ulaska u reakcije fermentacije s komenzalima, poticanje rasta komenzala i, kao što sam već spomenuo, poboljšanje zdravlja domaćina. U ovu skupinu spadaju galaktooligosaharidi (GOS), fruktooligosaharidi (FOS), već spomenuti oligosaharidi ljudskog mlijeka (HMO), inulin, pektin i mnoge druge molekule. U teoriji, upravo poticanjem rasta komenzala, a smanjenjem zastupljenosti potencijalno patogenih bakterija, mogli bi smanjiti rizik od pojave akutnih leukemija i dovesti do smanjenja komplikacija uslijed liječenja, a također utječu i na metabolizam lijekova, imunosni odgovor te pojačavaju proizvodnju postbiotika, poput SCFA.(169–172)

S druge strane, probiotici su živi mikroorganizmi koji mogu dovesti do povećanog stvaranja sekretornog lokalnog IgA, povećanog stvaranja AMP-ova i degradacije mutagena te se također mogu kompetitivno natjecati s potencijalno patogenim bakterijama za adheziju na enterocite, a za neke probiotike se vjeruje da imaju i protuupalna svojstva. Povezuje ih se sa smanjenim nuspojavama prilikom kemo- i radioterapije, smanjenim rizikom od infekcije prilikom liječenja te bržim oporavkom crijevno-krvne barijere.(170,171)

Postbiotike se definira kao „umrtvljene mikroorganizme i/ili njihove dijelove, koji dovode do poboljšanja zdravlja domaćina“, iako ovdje spadaju i metabolički produkti bakterija te određene signalne molekule. U postbiotike ubrajamo vitamine, određene organske kiseline, SCFA i triptofan, a mogu djelovati direktno na stanice domaćina ili posredno, primjerice mijenjanjem pH crijeva. Postbiotici djeluju na kompoziciju crijevne flore domaćina, a djeluju i imunomodulacijski, utječući na interakcije između flore i domaćina.(135,171,173,174)

Mislim da je važno ponoviti da i prilikom dijagnoze, a i prilikom liječenja akutnih leukemija, postoji

značajno smanjena relativna zastupljenost bakterija koje proizvode SCFA, što se povezuje s rizikom od razvoja bakterijemije i sepse, GVHD-a i smanjenim integritetom crijevno-krvne barijere, a to se objašnjava utjecajem SCFA na gotovo sve stanice imunskog sustava, kada prilikom manjka SCFA dolazi do produkcije proupalnih citokina, ali i utjecajem na enterocite, kada manjak SCFA dovodi do smanjenja proizvodnje proteina koji grade *tight junctions* između enterocita, a svime ovime sam se naširoko bavio ranije u radu.(133,135) Osim toga, triptofan je također izrazito važan, njegovi metaboliti sudjeluju kao signalne molekule unutar enterocita prilikom pojačavanja ekspresije gena za protupalne citokine, a manjak njegovog ekstremnog metabolita 3-indoksil sulfata u urinu može poslužiti kao marker rizika za razvoj GVHD-a.(146)

Iako su istraživanja na pedijatrijskim pacijentima tek u svojim počecima, gotovo svi prethodno nabrojani potencijalno korisni učinci pre-, pro- i postbiotika pokazali su se točnima i u praksi, na mišjim i odraslim modelima, pa i na drugim malignim bolestima, poput kolorektalnog karcinoma. Prebiotik inulin u kombinaciji s antraciklinima dovodi do pojačane citotoksičnosti što omogućava smanjenje doze citostatika, a osim toga korištenje inulina na mišjim modelima povezano je s povećanom proizvodnjom SCFA i smanjenim rizikom od metastatske bolesti, dok se korištenje pektina na mišjim modelima povezuje s boljim oporavkom crijevne flore nakon korištenja metotreksata i smanjenim rizikom od tumorske kaheksije.(175,176) Što se probiotika tiče, već postoji par obećavajućih istraživanja na pedijatrijskim pacijentima. Oralna suplementacija *Lactobacillus spp.* povezuje sa smanjenjem nuspojava liječenja, poput mučnine i povraćanja, a suplementacija *Bifidobacterium spp.*, osim do smanjenja nuspojava liječenja, dovodi do značajnog smanjenog rizika od infekcija i smanjenja potrebe za korištenjem antibiotika prilikom liječenja.(171,177) Što se postbiotika tiče, već sam spomenuo značaj SCFA i triptofana, dok su istraživanja povezana s drugim postbioticima tek u svojim počecima. Neka istraživanja na kulturama leukemijskih stanica pokazuju da bi bakterije koje proizvode laktat, odnosno njihovi postbiotici poput ornitina, SCFA i drugih baktericidnih tvari, mogli

djelovati selektivno toksično na stanice leukemije putem raznih mehanizama poput inhibicije angiogeneze, inhibicije staničnog ciklusa i protuupalnog djelovanja. Od postbiotika svakako vrijedi spomenuti i folat čije se prenatalno korištenje od strane majke u više studija dovodi u vezu sa smanjenim rizikom od ALL-a.(171,178,179)

Posljednja metoda sekundarne profilakse kojom ću se baviti je korištenje fekalnog transplantata. Fekalni transplantat mikrobiote predstavlja noviji način modifikacije crijevne flore domaćina s disbiozom putem direktnog unosa fekalnog materijala donora. Transplantat može biti autologni, kada se koristi feces domaćina prikupljen prije nastupa disbioze, ili alogeni, kada se koristi feces srodnog ili nesrodnog donora, a fekalni materijal može biti svjež ili može biti prethodno zamrznut, u banci fecesa. Budući da srodni donor dijeli određene genetske karakteristike, kao i način prehrane i okoliš, s primateljem, to može biti otegotna okolnost, znajući da je cilj transplantacije izmijeniti floru domaćina, a s druge strane autologni transplantat može biti izrazito koristan jer omogućava uspostavu crijevne flore koja je sličnija izvornoj flori prije početka liječenja, a bez uvođenja novih, potencijalno patogenih mikroorganizama. Transplantat se može izvršiti putem oralne kapsule, endoskopski, putem nazointestinalnog tubusa ili putem klizme. Prva indikacija za koju se koristio ovaj vid liječenja bila je infekcija bakterijom *C.difficile* koja se pokazala rezistentna na antibiotike. Kasnije su indikacije proširene pa se, znajući da fekalni transplantat može dovesti do poboljšanja raznolikosti crijevne flore i do uspostave crijevne homeostaze, danas koristi i za upalne bolesti crijeva.(180–182) Već sam naveo da *priming* terapija, antibiotici, antacidi, način prehrane i brojni drugi čimbenici prilikom provedbe HSCT-a dovode do značajne modifikacije crijevne flore i smanjenja raznolikosti crijevne flore te povećanog rizika od razvoja GVHD-a. Upravo ove činjenice dovele su do hipoteze da bi fekalni transplantat mogao naći svoje mjesto kao terapijska ili profilaktička metoda u liječenju GVHD-a.(132) Danas se fekalni transplantat, u odraslih i pedijatrijskih pacijenata, može koristiti terapijski, kao metoda liječenja rekurentnog

ili rezistentnog GI aGVHD-a, te profilaktički; u svrhu prevencije i smanjenja crijevne disbioze nakon HSCT-a ili u svrhu dekolonizacije crijeva od ABR bakterija kako bi se spriječile infekcije u fazi neutropenije.(181) Postoje eksperimentalni dokazi za učinkovitost sve tri indikacije za FMT u liječenju GVHD-a, a ja ću se fokusirati na profilaktičke primjene. Kod pacijenata koji su primili FMT u svrhu dekolonizacije pokazana je značajno smanjenja prisutnost ARB-ova, iako podaci variraju ovisno o istraživanju, metodi unosa i vrsti transplantata, a važno je napomenuti i da je, čak i kod pacijenata kod kojih nije postignuta dekolonizacija, došlo do smanjenja učestalosti razvoja infekcija, smanjenja potrebe za korištenjem antibiotika i smanjenjem duljine trajanja hospitalizacije.(183–185) Kod pacijenata kod kojih je FMT korišten u svrhu prevencije disbioze 16S rRNA sekvenciranje pokazalo je povećanu zastupljenost rodova *Ruminococcus* i *Bacteriodes*, povećanu zastupljenost AIC te povećanu razinu 3-indoksil sulfata u urinu, a svi ovi markeri upućuju na pojačan integritet crijevno-krvne barijere, smanjen rizik od bakterijemije te smanjen rizik od razvoja GVHD-a.(186,187) Nisu poznati svi mehanizmi putem kojih FMT dovodi do ovakvih promjena u crijevnoj flori, ali vjerojatno se radi o kombinaciji kompeticije s potencijalno patogenim bakterijama, imunomodulatornog djelovanja, metaboličkih promjena, poput povećane proizvodnje SCFA, te poboljšanja integriteta crijevno-krvne barijere.(188) Bitno je napomenuti da tek treba provesti veća istraživanja koja uspoređuju učinkovitost različitog broja doza, metoda unosa, vrste transplantata (svježi, zamrznuti, autologni ili alogeni), korištenje antibiotika te podudarnost davaoca i donora u dobi i spolu. Neka istraživanja pokazala su da korištenje antibiotika prerano nakon FMT-a može dovesti do smanjenog trajanja učinka na crijevnu floru, a podudarnost u dobi mogla bi biti ključna upravo kod pedijatrijskih pacijenata, čija flora se značajno razlikuje ovisno o dobi.(181,182,189) Nuspojave prilikom provedbe FMT-a su uglavnom blage probavne smetnje, poput proljeva i mučnine, no međutim zabilježene su epizode unosa patogenih bakterija koje su rezultirale razvojem sepse i smrću. Također izrazito rijetko, zabilježeni su

slučajevi gdje je neki manje patogeni organizam, npr. *Norovirus*, blaže oštetio crijevnu stijenku te doveo do povećane izloženosti antigena enterocita i posljedično do razvoja GI aGVHD-a.(181,190,191) Potrebna su veća kohortna istraživanja na pedijatrijskim pacijentima kako bi se utvrdila učinkovitost i sigurnost FMT-a u ovoj populaciji, ali i dosadašnja istraživanja su obećavajuća i ukazuju da je sigurnosni profil FMT-a u djece sličan, ako ne i bolji od sigurnosnog profila u odraslih.(182)

Naposljetku, kao što sam već spomenuo, bitno je naglasiti da će u budućnosti veliki značaj imati nadzor crijevne flore djece prilikom liječenja od akutnih leukemija te prije i neposredno nakon HSCT-a. Već sam spomenuo studiju Ingham A. C. i sur. iz 2021. prilikom koje su znanstvenici u više navrata i s više mjesta uzimali uzorke flore pedijatrijskih pacijenata, čime su mogli pratiti oporavak flore nakon HSCT-a, ali i uočiti potencijalan razvoj rizične konfiguracije flore za razvoj GVHD-a. Smatram da je ovakav način traganja za rizičnim obrascima izrazito važan, jer iako je rizik od razvoja iatrogenih bakterijemija prilikom korištenja probiotika i FMT-a u imunosuprimiranih pedijatrijskih pacijenata malen, on svakako nije zanemariv, pa stoga smatram da svakako ove profilaktičke mjere ne bi trebalo koristiti olako i bespotrebno.

#### 4. Zaključak

Sagledavši sva dosadašnja istraživanja na pedijatrijskoj populaciji koja su povezala čimbenike, koji utječu na razvoj crijevne flore i smanjenje alfa raznolikosti u ranom djetinjstvu (carski rez, prehrana, primjena antibiotika), s povećanom incidencijom akutnih leukemija može se reći da je crijevna disbioza ključni sekundarni imunosni i metabolički faktor koji dovodi do razvoja ishodišnog malignog klona, uz prisustvo prenatalnih mutacija poput *ETV6-RUNX* fuzije.

Crijevna disbioza dovodi do smanjenja zastupljenosti bakterija proizvođača SCFA značajnih za „imunosni trening dojenčeta“ putem aktivacije imunosnog sustava MAMP-ovima, ali i putem inhibicije HDAC te regulacijom genske ekspresije. U neutrofilima SCFA dovode do pada ekspresije gena za TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B i smanjenu sintezu NO, a također djeluju i na povećano stvaranje protuupalnih citokina u makrofazima i enterocitima te stvaranje Treg Foxp3+ limfocita. Ovim mehanizmima manjak SCFA dovodi do trajno povišenih razina proupalnih citokina, što se očituje poremećajem *V(D)J* rekombinacije i stvaranjem ishodišnog klona.

Crijevna mikrobiota nije važna samo u etiopatogenezi leukemija, nego je također iznimno važan čimbenik prilikom liječenja, pri čemu biva modificirana i narušena uslijed korištenja antibiotika i kemoterapeutika, a pojava disbioze može se koristiti i kao prediktivni faktor brojnih kliničkih entiteta koji se mogu pojaviti prilikom liječenja poput bakterijemije uslijed oštećenja crijevno-krvne barijere, intestinalnog mukozitisa te pojave GVHD-a uslijed HSCT-a.

Praćenje smanjenja alfa raznolikosti prilikom liječenja te uočavanje obrazaca koji ukazuju na loš integritet crijevno-krvne barijere (niska razina 3-indoksil sulfata u urinu, smanjena razina AIC, manjkav profil *Bacteriodes spp.*) može ukazati na prijeteći rizik od ranije navedenih komplikacija liječenja dok modifikacija ovih faktora putem pre-, pro- i postbiotika te FMT-a ima već dokazani potencijal u prevenciji ovih komplikacija te će u budućnosti zasigurno predstavljati značajan segment u algoritmu liječenja i praćenja dječjih leukemija.

## 5. Zahvale

*Zahvaljujem svome mentoru, prof.dr.sc. Ernestu Biliću na trudu koji je uložio kao profesor tijekom kolegija Pedijatrija, kada je naša suradnja započela i gdje je prepoznao moj interes, a kasnije i na trudu i strpljivosti koju je pokazao prilikom izrade ovog rada, što je za mene bilo pravo osvježanje na fakultetu.*

*Zahvaljujem svojim roditeljima Karolini i Ivanu na beskrajnom strpljenju prilikom studiranja, svoj podršci i ljubavi koju su mi pružili kroz život i na vrijednostima koje su mi usadili. Bez njih cijelo moje studiranje ne bi bilo moguće te su oni najviše zaslužni za formiranje mene kao čovjeka kakav sam danas i na tome sam im beskrajno zahvalan.*

*Zahvaljujem se svojim prijateljima, Adrianu, Bruni, Ivanu, Lovri i Luki, kao i svojim najbližim kolegama, na strpljenju, razumijevanju, razonodi, zabavi te međusobnoj pomoći i učenju. Uz njih sam se uvijek osjećao kao da se imam nekome obratiti i kada mi je najljepše i kada mi je najteže.*



## 6. Literatura

1. Bilić E. Bolesti krvi, krvotvornih organa i solidni tumori dječje dobi: Maligne bolesti u djece. In: Mardešić D, Barić I, editors. *Pedijatrija*. 9th ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2016. p.974-980
2. Kaplan JA. Leukemia in Children. *Pediatr Rev*. 2019 Jul;40(7):319-331. doi:10.1542/pir.2018-0192
3. Bonaventure A, Harewood R, Stiller CA, et al. Worldwide comparison of survival from childhood leukaemia for 1995-2009, by subtype, age, and sex (CONCORD-2): a population-based study of individual data for 89 828 children from 198 registries in 53 countries. *Lancet Haematol*. 2017 May;4(5):e202-e217. doi:10.1016/S2352-3026(17)30052-2
4. Pulte D, Gondos A, Brenner H. Improvement in survival in younger patients with acute lymphoblastic leukemia from the 1980s to the early 21st century. *Blood*. 2009 Feb;113(7):1408-1411. doi:10.1182/blood-2008-06-164863
5. Ford AM, Colman S, Greaves M. Covert pre-leukaemic clones in healthy co-twins of patients with childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*. 2022 Dec 20;37(1):47–52. doi: 10.1038/s41375-022-01756-1
6. Malard F, Mohty M. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*. 2020 Apr 4;395(10230):1146–62. doi: 10.1016/S0140-6736(19)33018-1.
7. Clarke RT, Van Den Bruel A, Bankhead C, Mitchell CD, Phillips B, Thompson MJ. Clinical presentation of childhood leukaemia: A systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child*. 2016 Oct 1;101(10):894–901. doi:10.1136/archdischild-2016-311251
8. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544
9. Calvo C, Fenneteau O, Leverger G, Petit A, Baruchel A, Méchinaud F. Infant Acute Myeloid Leukemia: A Unique Clinical and Biological Entity. *Cancers* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2023 Nov 23];13(4):777. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/4/777/htm>
10. Egan G, Chopra Y, Mourad S, Chiang K, Hitzler J. Treatment of acute myeloid leukemia in children: A practical perspective. *Pediatric Blood & Cancer* [Internet]. 2021 Apr 12 [cited 2023 Nov 23];68(7). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pbc.28979>
11. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. [Internet] 2015 Dec [cited 2023 Nov 23];3(1). doi: 10.1186/s40168-015-0094-5. Available from: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-015-0094-5>
12. Sarangi AN, Goel A, Aggarwal R. Methods for Studying Gut Microbiota: A Primer for Physicians. *J Clin Exp Hepatol*. 2019 Jan;9(1):62-73. doi:10.1016/j.jceh.2018.04.016 Epub 2018 May 4.
13. Tong M, Jacobs JP, McHardy IH, Braun J. Sampling of Intestinal Microbiota and Targeted Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes for Microbial Ecologic Analysis. *Current Protocols in Immunology*. 2014 Nov;107(1). doi:10.1002/0471142735.im0741s107

14. Trivedi DK, Hollywood KA, Goodacre R. Metabolomics for the masses: The future of metabolomics in a personalized world. *New Horizons in Translational Medicine* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2023 Nov 23];3(6):294–305. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29094062>
15. Kolmeder CA, de Vos WM. Metaproteomics of our microbiome — Developing insight in function and activity in man and model systems. *J Proteomics*. 2014 Jan 31;97:3–16. doi: 10.1016/j.jprot.2013.05.018. Epub 2013 May 24.
16. Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health Dis* [Internet]. 2015 Feb 2 [cited 2023 Nov 23];26(0). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25651997/>
17. Gotelli NJ, Chao A. Measuring and Estimating Species Richness, Species Diversity, and Biotic Similarity from Sampling Data. U: Levin S A. *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition* [Internet]. Newark (NJ): Academic Press. 2013 Jan 1 [cited 2023 Nov 23];195–211. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/279971521\\_Measuring\\_and\\_Estimating\\_Species\\_Richness\\_Species\\_Diversity\\_and\\_Biotic\\_Similarity\\_from\\_Sampling\\_Data](https://www.researchgate.net/publication/279971521_Measuring_and_Estimating_Species_Richness_Species_Diversity_and_Biotic_Similarity_from_Sampling_Data)
18. Derrien M, Alvarez AS, de Vos WM. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends Microbiol*. 2019 Dec;27(12):997–1010. doi:10.1016/j.tim.2019.08.001 Epub 2019 Aug 29.
19. Peppas I, Ford AM, Furness CL, Greaves MF. Gut microbiome immaturity and childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2023 Aug 1;23(8):565–76. <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00584-4>
20. Pabst O, Cerovic V, Hornef M. Secretory IgA in the Coordination of Establishment and Maintenance of the Microbiota. *Trends Immunol*. 2016 May 1;37(5):287–96. doi: 10.1016/j.it.2016.03.002. Epub 2016 Apr 5.
21. Stewart CJ, Ajami NJ, O’Brien JL, Hutchinson DS, Smith DP, Wong MC, et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature*. 2018 Oct 25;562(7728):583–8. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0617-x>
22. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe*. 2015 May 13;17(5):690–703. doi: 10.1016/j.chom.2015.04.004.
23. Vatanen T, Plichta DR, Somani J, Münch PC, Arthur TD, Hall AB, et al. Genomic variation and strain-specific functional adaptation in the human gut microbiome during early life. *Nat Microbiol*. 2019 Mar 1;4(3):470–9. doi: 10.1038/s41564-018-0321-5. Epub 2018 Dec 17.
24. Andryuschenko S V., Ivanova E V., Perunova NB, Bukharin O V., Zdvizhkova IA. Genome sequence data and properties of *Bifidobacterium bifidum* strain ICIS-504 isolated from multispecies bifidobacterial community. *Data Brief* [Internet]. 2022 Dec [cited 2023 Nov 23]; 1;45:108672. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9679660/>
25. Matsuyama M, Gomez-Arango LF, Fukuma NM, Morrison M, Davies PSW, Hill RJ. Breastfeeding: a key modulator of gut microbiota characteristics in late infancy. *J Dev Orig Health Dis* [Internet]. 2019 Apr 19 [cited 2023 Nov 23];10(02):206–13. Available from: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S2040174418000624/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S2040174418000624/type/journal_article)

26. Tsukuda N, Yahagi K, Hara T, Watanabe Y, Matsumoto H, Mori H, et al. Key bacterial taxa and metabolic pathways affecting gut short-chain fatty acid profiles in early life. *ISME Journal*. 2021 Sep 1;15(9):2574–90. doi: 10.1038/s41396-021-00937-7. Epub 2021 Mar 15.
27. Laursen MF, Andersen LBB, Michaelsen KF, Mølgaard C, Trolle E, Bahl MI, et al. Infant Gut Microbiota Development Is Driven by Transition to Family Foods Independent of Maternal Obesity. *mSphere* [Internet]. 2016 Feb 25 [cited 2023 Nov 23];1(1). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/msphere.00069-15>
28. Roswall J, Olsson LM, Kovatcheva-Datchary P, Nilsson S, Tremaroli V, Simon MC, et al. Developmental trajectory of the healthy human gut microbiota during the first 5 years of life. *Cell Host Microbe*. 2021 May 12;29(5):765-776.e3. doi: 10.1016/j.chom.2021.02.021. Epub 2021 Mar 31.
29. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2018 Aug 8 [cited 2023 Nov 23];18(8):471. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29784935/>
30. Rodríguez-Hernández G, Hauer J, Martín-Lorenzo A, Schäfer D, Bartenhagen C, García-Ramírez I, et al. Infection exposure promotes ETV6-RUNX1 precursor B-cell leukemia via impaired H3K4 demethylases. *Cancer Res*. 2017 Aug 15;77(16):4365–77. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0701. Epub 2017 Jun 19.
31. Vicente-Dueñas C, Janssen S, Oldenburg M, et al. An intact gut microbiome protects genetically predisposed mice against leukemia. *Blood*. 2020;136(18):2003-2017. doi:10.1182/blood.2019004381
32. Rüchel N, Jepsen VH, Hein D, Fischer U, Borkhardt A, Gössling KL. In Utero Development and Immunosurveillance of B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr Treat Options Oncol*. 2022;23(4):543-561. doi:10.1007/s11864-022-00963-3
33. Schäfer D, Olsen M, Lähnemann D, Stanulla M, Slany R, Schmiegelow K, et al. Five percent of healthy newborns have an ETV6-RUNX1 fusion as revealed by DNA-based GIPFEL screening. *Blood*. 2018 Feb 15;131(7):821–6. doi:10.1182/blood-2017-09-808402
34. Sun C, Chang L, Zhu X. Pathogenesis of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia and mechanisms underlying its relapse. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Mar 18 [cited 2023 Nov 23];8(21):35445–59. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5471068/>
35. Swaminathan S, Klemm L, Park E, Papaemmanuil E, Ford A, Kweon SM, et al. Mechanisms of clonal evolution in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Immunol* [Internet]. 2015 Jul 20 [cited 2023 Nov 23];16(7):766. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25985233/>
36. Yu X, Zhou W, Chen X, He S, Qin M, Yuan M, et al. RAG1 and RAG2 Non-core Regions Are Implicated in Leukemogenesis and Off-target V(D)J Recombination in BCR-ABL1-driven B-cell Lineage Lymphoblastic Leukemia. *eLife* [Internet]. 2024 May 9 [cited 2023 Nov 23];12. Available from: <https://elifesciences.org/reviewed-preprints/91030v2>
37. Cazzaniga G, Bisanti L, Randi G, et al. Possible role of pandemic AH1N1 swine flu virus in a childhood leukemia cluster. *Leukemia*. 2017;31(8):1819-1821. doi:10.1038/leu.2017.127. Epub 2017 Apr 27.
38. Su Q, Sun X, Zhu L, Yan Q, Zheng P, Mao Y, et al. Breastfeeding and the risk of childhood cancer: a systematic review and dose-response meta-analysis. *BMC Med* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Nov 23];19(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33845843/>

39. Gong QQ, Quan DD, Guo C, Zhang C, Zhang ZJ. Association between maternal breastfeeding and risk of systemic neoplasms of offspring. *Ital J Pediatr* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Nov 23];48(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35710389/>
40. Sjøgaard SH, Rostgaard K, Kamper-Jørgensen M, Schmiegelow K, Hjalgrim H. Childcare attendance and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: A register study based on the Danish childcare database. *Int J Cancer* [Internet]. 2023 May 1 [cited 2023 Nov 23];152(9):1817–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36545888/>
41. Marcotte EL, Thomopoulos T, Infante-Rivard C, Clavel J, Petridou E, Joachim Schüz, et al. Caesarean delivery and risk of childhood leukaemia: a pooled analysis from the Childhood Leukemia International Consortium (CLIC). *The Lancet Haematology*. 2016 Apr 1;3(4):e176–85. doi: 10.1016/S2352-3026(16)00002-8. Epub 2016 Feb 27.
42. Li WZ, Stirling K, Yang JJ, Zhang ORCID number L, Zhang L. World Journal of Diabetes Gut microbiota and diabetes: From correlation to causality and mechanism Conflict-of-interest statement. *World J Diabetes* [Internet]. 2020 [cited 2023 Nov 23];11(7):293–308. Available from: <https://www.wjgnet.com/1948-9358/full/v11/i7/293.htm>
43. Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. The infant microbiome development: mom matters HHS Public Access. *Trends Mol Med*. 2015;21(2):109–17. doi: 10.1016/j.molmed.2014.12.002. Epub 2014 Dec 11.
44. Shao Y, Forster SC, Tsaliki E, et al. Stunted microbiota and opportunistic pathogen colonization in caesarean-section birth. *Nature*. 2019;574(7776):117–121. doi:10.1038/s41586-019-1560-1
45. Ho NT, Li F, Lee-Sarwar KA, Tun HM, Brown BP, Pannaraj PS, et al. Meta-analysis of effects of exclusive breastfeeding on infant gut microbiota across populations. *Nature Communications* [Internet]. 2018 Oct 9 [cited 2023 Nov 23];9(1):1–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-06473-x>
46. Turta O, Selma-Royo M, Kumar H, Collado MC, Isolauri E, Salminen S, et al. Maternal Intrapartum Antibiotic Treatment and Gut Microbiota Development in Healthy Term Infants. *Neonatology*. 2022 Feb 1;119(1):93–102. doi: 10.1159/000519574. Epub 2021 Nov 22.
47. Prescott S, Dreisbach C, Baumgartel K, Koerner R, Gyamfi A, Canellas M, et al. Impact of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis on Offspring Microbiota. *Front Pediatr* [Internet]. 2021 Dec 10 [cited 2023 Nov 25];9:754013. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34956974>
48. Ainonen S, Tejesvi M V., Mahmud MR, Paalanne N, Pokka T, Li W, et al. Antibiotics at birth and later antibiotic courses: effects on gut microbiota. *Pediatr Res*. 2022 Jan 1;91(1):154–62. doi: 10.1038/s41390-021-01494-7. Epub 2021 Apr 6.
49. Dierikx TH, Visser DH, Benninga MA, van Kaam AHL, de Boer NKH, de Vries R, et al. The influence of prenatal and intrapartum antibiotics on intestinal microbiota colonisation in infants: A systematic review. *Journal of Infection*. 2020 Aug 1;81(2):190–204. doi: 10.1016/j.jinf.2020.05.002. Epub 2020 May 7.
50. McDonnell L, Gilkes A, Ashworth M, et al. Association between antibiotics and gut microbiome dysbiosis in children: systematic review and meta-analysis. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1–18. doi:10.1080/19490976.2020.1870402

51. Amir A, Erez-Granat O, Braun T, Sosnovski K, Hadar R, BenShoshan M, et al. Gut microbiome development in early childhood is affected by day care attendance. *npj Biofilms and Microbiomes* [Internet]. 2022 Jan 11 [cited 2023 Nov 23];8(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41522-021-00265-w>
52. De Filippo C, Di Paola M, Ramazzotti M, Albanese D, Pieraccini G, Banci E, et al. Diet, Environments, and Gut Microbiota. A Preliminary Investigation in Children Living in Rural and Urban Burkina Faso and Italy. *Frontiers in Microbiology* [Internet] 2017 Oct 13 [cited 2023 Nov 23];8:1979. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01979>.
53. Gao X, Miao R, Zhu Y, Lin C, Yang X, Jia R, et al. A new insight into acute lymphoblastic leukemia in children: influences of changed intestinal microfloras. *BMC Pediatrics* [Internet]. 2020 Dec [cited 2023 Nov 23];20(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s12887-020-02192-9>
54. Liu X, Zou Y, Ruan M, et al. Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Exhibit Distinctive Alterations in the Gut Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2020 [cited 2023 Nov 26];10:558799. Available from: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.558799>
55. Chua LL, Rajasuriar R, Lim YAL, Woo YL, Loke P, Ariffin H. Temporal changes in gut microbiota profile in children with acute lymphoblastic leukemia prior to commencement-, during-, and post-cessation of chemotherapy. *BMC Cancer* [Internet]. 2020 Feb 24 [cited 2023 Nov 26];20(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s12885-020-6654-5>
56. Rajagopala S V., Singh H, Yu Y, Zabokrtsky KB, Torralba MG, Moncera KJ, et al. Persistent Gut Microbial Dysbiosis in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) During Chemotherapy. *Microb Ecol*. 2020 May 1;79(4):1034–43. doi: <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01448-x>. Epub 2019 Nov 21.
57. De Pietri S, Ingham AC, Frandsen TL, Rathe M, Krych L, Castro-Mejía JL, et al. Gastrointestinal toxicity during induction treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia: The impact of the gut microbiota. *Int J Cancer* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2023 Nov 26];147(7):1953–62. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.32942>
58. Chen SM, Liu SX, Chen F, Wang CY, Mai HR, Yuan XL, et al. [Changes of intestinal flora in children with acute lymphoblastic leukemia before and after chemotherapy]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2023 Nov 26];24(5):550–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35644196/>
59. Bai L, Zhou P, Li D, Ju X. Changes in the gastrointestinal microbiota of children with acute lymphoblastic leukaemia and its association with antibiotics in the short term. *J Med Microbiol*. 2017 Sep 1;66(9):1297–307. doi: 10.1099/jmm.0.000568.
60. Xu Y, Gao H, Li H. The gut microbiome: an important factor influencing therapy for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Annals of Hematology* [internet]. 2023 Sep 29 [cited 2023 Nov 25]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37775598/>
61. Pagani IS, Poudel G, Wardill HR. A Gut Instinct on Leukaemia: A New Mechanistic Hypothesis for Microbiota-Immune Crosstalk in Disease Progression and Relapse. *Microorganisms*. 2022 Mar 25;10(4):713. doi: 10.3390/microorganisms10040713.
62. Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*. 2016 Jun;165(6):1332–45. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.041.

63. Kim M, Kim CH. Regulation of humoral immunity by gut microbial products. *Gut Microbes*. 2017 Jul 4;8(4):392–9. doi: 10.1080/19490976.2017.1299311. Epub 2017 Feb 28.
64. Parada Venegas D, De la Fuente MK, Landskron G, González MJ, Quera R, Dijkstra G, et al. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2019 Mar 11 [cited 2023 Nov 26];10(277). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6421268/>
65. Stokholm J, Blaser MJ, Thorsen J, Rasmussen MA, Waage J, Vinding RK, et al. Maturation of the gut microbiome and risk of asthma in childhood. *Nature communications* [Internet]. 2018 [cited 2023 Nov 26];9(1):141. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29321519>
66. Olin A, Henckel E, Chen Y, Lakshmikanth T, Pou C, Mikes J, et al. Stereotypic Immune System Development in Newborn Children. *Cell*. 2018 Aug 23;174(5):1277-1292.e14. doi: 10.1016/j.cell.2018.06.045
67. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nature Reviews Immunology* [Internet]. 2016 Jun [cited 2023 Nov 26];16(6):341–52. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5541232/>
68. Busi SB, de Nies L, Habier J, Wampach L, Fritz JV, Heintz-Buschart A, et al. Persistence of birth mode-dependent effects on gut microbiome composition, immune system stimulation and antimicrobial resistance during the first year of life. *ISME Communications* [Internet]. 2021 Mar 26 [cited 2023 Nov 26];1(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s43705-021-00003-5>
69. Zachariassen LF, Krych L, Rasmussen SH, Nielsen DS, Kot W, Holm TL, et al. Cesarean Section Induces Microbiota-Regulated Immune Disturbances in C57BL/6 Mice. *The Journal of Immunology*. 2019 Jan 1;202(1):142–50. doi: 10.4049/jimmunol.1800666. Epub 2018 Nov 28.
70. Ramanan D, Sefik E, Galván-Peña S, Wu M, Yang L, Yang Z, et al. An Immunologic Mode of Multigenerational Transmission Governs a Gut Treg Setpoint. *Cell*. 2020 Jun 11;181(6):1276-1290.e13. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.030.
71. Sanchez HN, Moroney JB, Gan H, Shen T, Im JL, Li T, et al. B cell-intrinsic epigenetic modulation of antibody responses by dietary fiber-derived short-chain fatty acids. *Nat Commun*. 2020 Dec 1;11(1). doi: 10.1038/s41467-019-13603-6.
72. Borbet TC, Pawline MB, Li J, Ho ML, Yue Sandra Yin, Zhang X, et al. Disruption of the early-life microbiota alters Peyer’s patch development and germinal center formation in gastrointestinal-associated lymphoid tissue. *iScience* [Internet]. 2023 Jun 1 [cited 2023 Nov 26];26(6):106810–0. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106810>
73. Hakim H, Dallas R, Wolf J, Tang L, Schultz-Cherry S, Darling V, et al. Gut microbiome composition predicts infection risk during chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Infectious Diseases*. 2018 Aug 1;67(4):541–8. doi: 10.1093/cid/ciy153.
74. Riccardo Masetti, Muratore E, Davide Leardini, Zama D, Turrone S, Patrizia Brigidi, et al. Gut microbiome in pediatric acute leukemia: from predisposition to cure. *Blood Advances* [Internet]. 2021 Nov 16 [cited 2023 Nov 26];5(22):4619–29. Available from: <https://ashpublications.org/bloodadvances/article/5/22/4619/477172/Gut-microbiome-in-pediatric-acute-leukemia-from>

75. Coletto E, Latousakis D, Pontifex MG, Crost EH, Vaux L, Perez Santamarina E, et al. The role of the mucin-glycan foraging *Ruminococcus gnavus* in the communication between the gut and the brain. *Gut Microbes*. 2022 May 17;14(1). doi: 10.1080/19490976.2022.2073784.
76. Rajagopala SV, Yooseph S, Harkins DM, Moncera KJ, Zabokrtsky KB, Torralba MG, et al. Gastrointestinal microbial populations can distinguish pediatric and adolescent Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) at the time of disease diagnosis. *BMC Genomics* [Internet]. 2016 Aug 15 [cited 2023 Nov 26];17(1). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4986186/>
77. Ma J, Piao X, Mahfuz S, Long S, Wang J. The interaction among gut microbes, the intestinal barrier and short chain fatty acids. *Animal Nutrition* [Internet]. 2022 Jun [cited 2023 Nov 23];9:159–74. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9079705/> [Accessed 23 Nov 2023]
78. Stein-Thoeringer CK, Nichols KB, Lazrak A, Docampo MD, Slingerland AE, Slingerland JB, et al. Lactose drives *Enterococcus* expansion to promote graft-versus-host disease. *Science* (1979). 2019 Nov 29;366(6469):1143–9. doi: 10.1126/science.aax3760.
79. Van Vliet MJ, Tissing WJE, Dun CAJ, Meessen NEL, Kamps WA, De Bont ESJM, et al. 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. *Clinical Infectious Diseases*. 2009 Jul 15;49(2):262–70. doi: 10.1086/599346.
80. Letertre MPM, Munjoma N, Wolfer K, Pechlivanis A, McDonald JAK, Hardwick RN, et al. A Two-Way Interaction between Methotrexate and the Gut Microbiota of Male Sprague-Dawley Rats. *J Proteome Res*. 2020 Aug 7;19(8):3326–39. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00230. Epub 2020 Jul 6.
81. Panebianco C, Andriulli A, Pazienza V. Pharmacomicrobiomics: exploiting the drug-microbiota interactions in anticancer therapies. *Microbiome* [Internet]. 2018 May 22 [cited 2023 Nov 26];6(1):92. Available from: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-018-0483-7>
82. Garrido MM, Garrido RQ, Cunha TN, Ehrlich S, Martins IS. Comparison of epidemiological, clinical and microbiological characteristics of bloodstream infection in children with solid tumours and haematological malignancies. *Epidemiology and Infection*. 2019 Nov 6;147:e298. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/comparison-of-epidemiological-clinical-and-microbiological-characteristics-of-bloodstream-infection-in-children-with-solid-tumours-and-haematological-malignancies/DF72C9994665BF703B5E18F0443A1AAE>
83. Lehrnbecher T, Averbuch D, Castagnola E, Cesaro S, Ammann RA, Garcia-Vidal C, et al. 8th European Conference on Infections in Leukaemia: 2020 guidelines for the use of antibiotics in paediatric patients with cancer or post-haematopoietic cell transplantation. *The Lancet Oncology*. 2021 Jun;22(6):e270–80. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30725-7. Epub 2021 Mar 31.
84. Mikulska M, Viscoli C, Orasch C, Livermore DM, Averbuch D, Cordonnier C, et al. Aetiology and resistance in bacteraemias among adult and paediatric haematology and cancer patients. *Journal of Infection* [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2023 Dec 4];68(4):321–31. Available from: <http://www.journalofinfection.com/article/S0163445313003824/fulltext>
85. Laoprasopwattana K, Khwanna T, Suwankeeree P, Sujjanunt T, Tunyapanit W, Chelae S. Ciprofloxacin Reduces Occurrence of Fever in Children With Acute Leukemia who Develop Neutropenia During Chemotherapy. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2013 Mar;32(3):94–8. doi: 10.1097/INF.0b013e3182793610.

86. Lehrnbecher T, Fisher BT, Phillips B, Alexander S, Ammann RA, Beauchemin M, et al. Guideline for Antibacterial Prophylaxis Administration in Pediatric Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clinical Infectious Diseases*. 2019 Nov 2;71(1):226–36. doi: 10.1093/cid/ciz1082.
87. Gafter-Gvili A, Fraser A, Paul M, et al. Antibiotic prophylaxis for bacterial infections in afebrile neutropenic patients following chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Jan 18;1(1):CD004386. doi:10.1002/14651858.CD004386.pub3
88. Egan G, Robinson PD, Martinez JPD, et al. Efficacy of antibiotic prophylaxis in patients with cancer and hematopoietic stem cell transplantation recipients: A systematic review of randomized trials. *Cancer Med*. 2019;8(10):4536-4546. doi:10.1002/cam4.2395
89. Tunyapanit W, Chelae S, Laoprasopwattana K. Does ciprofloxacin prophylaxis during chemotherapy induce intestinal microflora resistance to ceftazidime in children with cancer? *Journal of Infection and Chemotherapy* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2023 Dec 4];24(5):358–62. Available from: <http://www.jiac-j.com/article/S1341321X17303136/fulltext>
90. Caro J, Madero-Marroquin R, Zubizarreta N, Moshier E, Tremblay D, Coltoff A, et al. Impact of Fluoroquinolone Prophylaxis on Neutropenic Fever, Infections, and Antimicrobial Resistance in Newly Diagnosed AML Patients. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Dec 4];22(12):903–11. Available from: <http://www.clinical-lymphoma-myeloma-leukemia.com/article/S2152265022002385/fulltext>
91. Rafiee M, Abbasi M, Rafieemehr H, Mirzaeian A, Barzegar M, Amiri V, et al. A concise review on factors influencing the hematopoietic stem cell transplantation main outcomes. *Health Science Reports*. 2021 May 7;4(2):e282. doi: 10.1002/hsr2.282.
92. Cao K, Zou J, Fernández-Viña MA. Role of the Human Leukocyte Antigen System in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Manual of Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. 2024 Jan 1;17–25. 10.1016/B978-0-323-79833-4.00002-4
93. Zhu X, Tang B, Sun Z. Umbilical Cord Blood Transplantation: Still Growing and Improving. *Stem Cells Translational Medicine*. 2021 Nov 1;10(S2):S62–74. doi: 10.1002/sctm.20-0495
94. Algeri M, Merli P, Locatelli F, Pagliara D. The Role of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Pediatric Leukemia. *Journal of Clinical Medicine* [Internet]. 2021 Aug 25 [cited 2023 Dec 6];10(17):3790–0. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8432223/>
95. Truong TH, Jinca C, Mann G, Arghirescu S, Buechner J, Merli P, et al. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Children With Acute Lymphoblastic Leukemia: Shifting Indications in the Era of Immunotherapy. *Frontiers in Pediatrics* [Internet]. 2021 Dec 23 [2023 Dec 6];9:782785. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8733383/>
96. Diorio C, Maude SL. CAR T cells vs allogeneic HSCT for poor-risk ALL. *Hematology*. 2020 Dec 4;2020(1):501–7. doi:10.1182/hematology.2020000172
97. Gibson BES, Sauer MG, Amrolia P. Acute Myeloid Leukemia in Children. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, et al., editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* [Internet]. 7th edition. Cham (CH): Springer; 2019. [cited 2023 Dec 6];Chapter 70. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554022/> doi: 10.1007/978-3-030-02278-5\_70



98. Malard F, Holler E, Sandmaier BM, Huang H, Mohty M. Acute graft-versus-host disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2023 Dec 1;9(1). doi: 10.1038/s41572-023-00438-1.
99. Enric Carreras, Jan Styczynski and Per Ljungman. HCT Complications and Management. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, et al., editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* [Internet]. 7th edition. Cham (CH): Springer; 2019. [cited 2023 Dec 6] Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553942/> doi: 10.1007/978-3-030-02278-5
100. Ramachandran V, Kolli SS, Strowd LC. Review of Graft-Versus-Host Disease. *Dermatol Clin*. 2019;37(4):569-582. doi:10.1016/j.det.2019.05.014
101. Lazaryan A, Weisdorf DJ, DeFor T, Brunstein CG, MacMillan ML, Bejanyan N, et al. Risk Factors for Acute and Chronic Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation with Umbilical Cord Blood and Matched Sibling Donors. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2016 Jan 1;22(1):134–40. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.09.008. Epub 2015 Sep 11.
102. Socie G, Michonneau D. Milestones in acute GVHD pathophysiology. *Frontiers in Immunology*. [Internet] 2022 Dec 5 [cited 2023 Dec 6] ;13: 1079708. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.1079708/full>
103. Zeiser R, Blazar BR. Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets. *New England Journal of Medicine*. 2017 Dec 28;377(26):2565–79. doi: 10.1056/NEJMra1703472.
104. Matthias Wöfl, Muna Qayed, María Isabel Benítez-Carabante, Sykora T, Halvard Bonig, Lawitschka A, et al. Current Prophylaxis and Treatment Approaches for Acute Graft-Versus-Host Disease in Haematopoietic Stem Cell Transplantation for Children With Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Frontiers in Pediatrics* [Internet] 2022 Jan 6 [cited 2023 Dec 6];9:784377. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2021.784377/full>
105. Mehta RS, Alousi AM. Graft-Versus-Host Disease. *Manual of Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies* [Internet]. 2022 Oct 10 [cited 2023 Dec 6];453–79. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538235/>
106. Yuksel M, Yaman Y, Elli M. Evaluation of the demographic and clinical findings of pediatric patients that developed acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell. *Annals of medical research*. 2020 Jan 1;27(9):2335–5. doi:10.5455/annalsmedres.2020.06.557
107. Yu J, Hamilton BK, Turnbull J, Stewart SK, Vernaya A, Bhatt V, et al. Patient-reported symptom burden and impact on daily activities in chronic graft-versus-host disease. *Cancer Med*. 2023 Feb 1;12(3):3623–33. doi: 10.1002/cam4.5209. Epub 2022 Nov 16.
108. Justiz Vaillant AA, Modi P, Mohammadi O. Graft-Versus-Host Disease. [Updated 2022 Oct 10]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan [cited 2023 Dec 6]-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538235/>
109. Haroun E, Agrawal K, Leibovitch J, Kassab J, Zoghbi M, Dutta D, et al. Chronic graft-versus-host disease in pediatric patients: Differences and challenges. *Blood Rev*. 2023 Jul 1;60:101054-4. doi: 10.1016/j.blre.2023.101054.
110. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2015 Mar 1;21(3):389-401.e1. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.12.001.

111. Kröger N, Solano C, Wolschke C, Bandini G, Patriarca F, Pini M, et al. Antilymphocyte Globulin for Prevention of Chronic Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med*. 2016 Jan 7;374(1):43–53. doi: 10.1056/NEJMoa1506002.
112. Hamed KM, Dighriri IM, Baomar AF, Alharthy BT, Alenazi FE, Alali GH, et al. Overview of Methotrexate Toxicity: A Comprehensive Literature Review. *Cureus* [Internet]. 2022 Sep 23 [cited 2023 Dec 6];14(9). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9595261/>
113. Hamilton BK, Rybicki LA, Li H, Lucas T, Corrigan D, Kalaycio M, et al. Tacrolimus/methotrexate vs tacrolimus/reduced-dose methotrexate/ mycophenolate for graft-versus-host disease prevention. *Blood Adv*. 2023 Aug 16;7(16):4505–13. doi: 10.1182/bloodadvances.2023010310.
114. Jamy O, Zeiser R, Chen YB. Novel developments in the prophylaxis and treatment of acute GVHD. *Blood*. 2023 Sep 21;142(12):1037–46. doi: 10.1182/blood.2023020073.
115. Baron F, Mohty M, Blaise D, Socié G, Labopin M, Esteve J, et al. Anti-thymocyte globulin as graft-versus-host disease prevention in the setting of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: a review from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica*. 2017 Feb;102(2):224–34. doi: 10.3324/haematol.2016.148510. Epub 2016 Dec 7.
116. Walker I, Panzarella T, Couban S, Couture F, Devins G, Elemetry M, et al. Pretreatment with anti-thymocyte globulin versus no anti-thymocyte globulin in patients with haematological malignancies undergoing haemopoietic cell transplantation from unrelated donors: a randomised, controlled, open-label, phase 3, multicentre trial. *Lancet Oncol*. 2016 Feb;17(2):164–73. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00462-3. Epub 2015 Dec 24.
117. Gagelmann N, Ayuk F, Wolschke C, Kröger N. Comparison of Different Rabbit Anti-Thymocyte Globulin Formulations in Allogeneic Stem Cell Transplantation: Systematic Literature Review and Network Meta-Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017 Dec;23(12):2184–91. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.08.027. Epub 2017 Aug 30.
118. Kanakry CG, Fuchs EJ, Luznik L. Modern approaches to HLA-haploidentical blood or marrow transplantation. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016 Feb;13(2):132. doi: 10.1038/nrclinonc.2015.128. Epub 2015 Aug 25.
119. Rotz SJ, Collier P, Hamilton BK. Post-Transplantation Cyclophosphamide. *JACC: CardioOncology* [Internet]. 2021 Jun 15 [cited 2023 Dec 10];3(2):260–2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8352273/>
120. Broers AEC, de Jong CN, Bakunina K, Hazenberg MD, van Marwijk Kooy M, de Groot MR, et al. Posttransplant cyclophosphamide for prevention of graft-versus-host disease: results of the prospective randomized HOVON-96 trial. *Blood Adv*. 2022 Jun 14;6(11):3378–85. doi: 10.1182/bloodadvances.2021005847.
121. Bolaños-Meade J, Hamadani M, Wu J, Al Malki MM, Martens MJ, Runaas L, et al. Post-Transplantation Cyclophosphamide-Based Graft-versus-Host Disease Prophylaxis. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2023 Jun 21 [cited 2023 Dec 6];388(25):2338–48. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2215943>
122. Leick M, Chen YB. A glimpse into what happens after PTCy. *Blood*. 2022 Jan 27;139(4):479–81. doi: 10.1182/blood.2021014264.

123. Goptu M, Antin JH. GVHD Prophylaxis 2020. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2021 Apr 7 [cited 2023 Dec 12];12:605726. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2021.605726/full>
124. Gatza E, Reddy P, Choi SW. Prevention and Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease in Children, Adolescents, and Young Adults. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020;26(5):e101-e112. doi:10.1016/j.bbmt.2020.01.004 Epub 2020 Jan 11.
125. Ruutu T, Gratwohl A, De Witte T, Afanasyev B, Apperley J, Bacigalupo A, et al. Prophylaxis and treatment of GVHD: EBMT–ELN working group recommendations for a standardized practice. *Bone Marrow Transplantation* 2014 49:2 [Internet]. 2013 Jul 29 [cited 2023 Dec 6];49(2):168–73. Available from: <https://www.nature.com/articles/bmt2013107>
126. Rashidi A, DiPersio JF, Sandmaier BM, Colditz GA, Weisdorf DJ. Steroids Versus Steroids Plus Additional Agent in Frontline Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2016 Jun 1;22(6):1133–7. doi: doi.org/10.1016/j.bbmt.2016.02.021.
127. Zhang L, Yu J, Wei W. Advance in Targeted Immunotherapy for Graft-Versus-Host Disease. *Frontiers in Immunology*. [Internet] 2018 May 16 [cited 2023 Dec 10];9:1087. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2018.01087/full>
128. Hill L, Alousi A, Kebriaei P, Mehta R, Rezvani K, Shpall E. New and emerging therapies for acute and chronic graft versus host disease. *Ther Adv Hematol*. 2018 Jan;9(1):21–46. doi: 10.1177/2040620717741860. Epub 2017 Nov 28.
129. Biagi E, Zama D, Nastasi C, Consolandi C, Fiori J, Rampelli S, et al. Gut microbiota trajectory in pediatric patients undergoing hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2015 Jul 3 [cited 2023 Dec 10];50(7):992–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25893458/>
130. Yan J, Liao C, Taylor BP, Fontana E, Amoretti LA, Wright RJ, et al. A compilation of fecal microbiome shotgun metagenomics from hematopoietic cell transplantation patients. *Sci Data*. 2022 Dec 1;9(1). doi: 10.1038/s41597-022-01302-9.
131. Balletto E, Mikulska M. Bacterial Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases* [Internet]. 2015 [cited 2023 Dec 13];7(1):e2015045. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26185610>
132. Zama D, Biagi E, Masetti R, Gasperini P, Prete A, Candela M, et al. Gut microbiota and hematopoietic stem cell transplantation: where do we stand? *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2017 Jan 27 [cited 2023 Dec 12];52(1):7–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/bmt2016173>
133. Markey KA, Schluter J, Gomes ALC, et al. The microbe-derived short-chain fatty acids butyrate and propionate are associated with protection from chronic GVHD. *Blood*. 2020;136(1):130-136. doi:10.1182/blood.2019003369
134. Fujiwara H, Docampo MD, Riwes M, Peltier D, Toubai T, Henig I, et al. Microbial metabolite sensor GPR43 controls severity of experimental GVHD. *Nat Commun*. 2018 Dec 1;9(1). doi: 10.1038/s41467-018-06048-w.
135. Riwes M, Reddy P. Short chain fatty acids: Postbiotics/metabolites and graft versus host disease colitis. *Semin Hematol*. 2020;57(1):1-6. doi:10.1053/j.seminhematol.2020.06.001

136. Cui C, Wang F, Zheng Y, Wei H, Peng J. From birth to death: The hardworking life of Paneth cell in the small intestine. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2023 Mar 10 [cited 2023 Dec 12];14:1122258. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1122258/full>
137. Ferrara JLM, Chaudhry MS. GVHD: biology matters. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2018 Nov 30;2018(1):221–7. doi: 10.1182/bloodadvances.2018020214
138. Song A, Shen N, Gan C, Luo C, Luo C, Wang J, et al. Exploration of the relationship between intestinal flora changes and gut acute graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Transl Pediatr*. 2021 Feb 1;10(2):283–95. doi: 10.21037/tp-20-208
139. Peled JU, Gomes ALC, Devlin SM, Littmann ER, Taur Y, Sung AD, et al. Microbiota as Predictor of Mortality in Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine*. 2020 Feb 27;382(9):822–34. doi: 10.1056/NEJMoa1900623.
140. Masetti R, Leardini D, Muratore E, et al. Gut microbiota diversity before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as a predictor of mortality in children. *Blood*. 2023;142(16):1387-1398. doi:10.1182/blood.2023020026
141. Kelly MS, Ward D V., Severyn CJ, Arshad M, Heston SM, Jenkins K, et al. Gut Colonization Preceding Mucosal Barrier Injury Bloodstream Infection in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2019 Nov 1;25(11):2274–80. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.07.019. Epub 2019 Jul 18.
142. Simms-Waldrip TR, Sunkersett G, Coughlin LA, Savani MR, Arana C, Kim J, et al. Antibiotic-Induced Depletion of Anti-inflammatory Clostridia Is Associated with the Development of Graft-versus-Host Disease in Pediatric Stem Cell Transplantation Patients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2017 May 1;23(5):820–9. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.02.004. Epub 2017 Feb 9.
143. Yu J, Sun H, Cao W, Han L, Song Y, Wan D, et al. Applications of gut microbiota in patients with hematopoietic stem-cell transplantation. *Experimental Hematology & Oncology* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 17 Dec 2023];9(1):35. Available from: <https://ehonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40164-020-00194-y#citeas>
144. Lin D, Hu B, Li P, Zhao Y, Xu Y, Wu D. Roles of the intestinal microbiota and microbial metabolites in acute GVHD. *Experimental Hematology & Oncology* [Internet] 2021 Oct 27 [cited 2023 Dec 17];10(1):1-19. Available from: <https://ehonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40164-021-00240-3>
145. Weber D, Frauenschläger K, Ghimire S, Peter K, Panzer I, Hiergeist A, et al. The association between acute graft-versus-host disease and antimicrobial peptide expression in the gastrointestinal tract after allogeneic stem cell transplantation. *PLoS One* [Internet] 2017 Sep 1 [cited 2023 Dec 18];12(9):e0185265. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0185265>
146. Farowski F, Els G, Tsakmaklis A, Higgins PG, Kahlert CR, Stein-Thoeringer CK, et al. Assessment of urinary 3-indoxyl sulfate as a marker for gut microbiota diversity and abundance of Clostridiales. *Gut Microbes*. 2019 Mar 4;10(2):133–41. doi: 10.1080/19490976.2018.1502536. Epub 2018 Aug 17.
147. Ingham AC, Pamp SJ. Mucosal microbiotas and their role in stem cell transplantation. *APMIS*. 2022 Dec 9;130(12):741–50. doi: 10.1111/apm.13208

148. Zama D, Gori D, Muratore E, Leardini D, Rallo F, Turrone S, et al. Enteral versus Parenteral Nutrition as Nutritional Support after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Transplant Cell Ther.* 2021 Feb 1;27(2):180.e1-180.e8. doi: 10.1016/j.jtct.2020.11.006. Epub 2020 Dec 13.
149. Bekker V, Zwitter RD, Knetsch CW, Sanders IMJG, Berghuis D, Heidt PJ, et al. Dynamics of the Gut Microbiota in Children Receiving Selective or Total Gut Decontamination Treatment during Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2019 Jun 1;25(6):1164–71. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.01.037. Epub 2019 Feb 5.
150. Fredricks DN. The gut microbiota and graft-versus-host disease. *Journal of Clinical Investigation.* 2019 May 1;129(5):1808–17. doi: 10.1172/JCI125797. Epub 2019 May 1.
151. Lähteenmäki K, Wacklin P, Taskinen M, Tuovinen E, Lohi O, Partanen J, et al. Haematopoietic stem cell transplantation induces severe dysbiosis in intestinal microbiota of paediatric ALL patients. *Bone Marrow Transplantation.* 2017 Aug 7;52(10):1479–82. doi: 10.1038/bmt.2017.168. Epub 2017 Aug 7.
152. Kim YH. Gut Microbiota in Graft-versus-Host Disease. *Journal of Bacteriology and Virology.* 2016;46(4):307-11. 4 p.307 – 11. doi: 10.4167/jbv.2016.46.4.307
153. Stein-Thoeringer CK, Peled JU, Gomes ALC, Lazrak A, Docampo MD, Slingerland AE, et al. Intestinal Enterococcus Is a Major Risk Factor for the Development of Acute Gvhd. *Blood [Internet].* 2018 Nov 29 [cited 2024 Jan 11];132(Supplement 1):358. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-119887>
154. Jenq RR, Taur Y, Devlin SM, Ponce DM, Goldberg JD, Ahr KF, et al. Intestinal *Blautia* Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2015 Aug 1;21(8):1373–83. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.04.016. Epub 2015 May 11.
155. Kim SG, Becattini S, Moody TU, Shliaha P V., Littmann ER, Seok R, et al. Microbiota-derived lantibiotic restores resistance against vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Nature.* 2019 Aug 29;572(7771):665–9. doi: 10.1038/s41586-019-1501-z. Epub 2019 Aug 21.
156. Ingham AC, Kielsen K, Mordhorst H, Ifversen M, Aarestrup FM, Müller KG, et al. Microbiota long-term dynamics and prediction of acute graft-versus-host disease in pediatric allogeneic stem cell transplantation. *Microbiome.* [Internet] 2021 Dec 1 [cited 2024 Jan 13];9(1):148. Available from: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-021-01100-2>
157. Bhuta R, DeNardo B, Wang J, Atoyian J, Zhang Y, Nelson D, et al. Durable changes in the gut microbiome in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer [Internet].* 2021 Dec 1 [cited 2024 Jan 16];68(12):e29308. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pbc.29308>
158. Thomas R, Wong WSW, Saadon R, Vilboux T, Deeken J, Niederhuber J, et al. Gut microbial composition difference between pediatric ALL survivors and siblings. *Pediatr Hematol Oncol.* 2020 Aug 17;37(6):475–88. doi: 10.1080/08880018.2020.1759740. Epub 2020 May 19.
159. Maioli TU, Borrás-Nogues E, Torres L, Barbosa SC, Martins VD, Langella P, et al. Possible Benefits of *Faecalibacterium prausnitzii* for Obesity-Associated Gut Disorders. *Frontiers in Pharmacology [Internet]* 2021 Dec 2;12:740636 Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2021.740636/full>

160. Robison LL, Hudson MM. Survivors of childhood and adolescent cancer: life-long risks and responsibilities. *Nature Reviews Cancer*. 2013 Dec 5;14(1):61–70. doi: 10.1038/nrc3634. Epub 2013 Dec 5.
161. Schilstra CE, McCleary K, Fardell JE, Donoghoe MW, McCormack E, Kotecha RS, et al. Prospective longitudinal evaluation of treatment-related toxicity and health-related quality of life during the first year of treatment for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *BMC Cancer* [Internet]. 2022 Sep 15 [cited 2024 Jan 22];22:985. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9479356/>
162. Silverman LB. Balancing cure and long-term risks in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*. 2014 Dec 5;2014(1):190–7. doi:10.1182/asheducation-2014.1.190
163. Kızılcak H, Okcu F. Late Effects of Therapy in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Survivors. *Turkish Journal of Hematology*. 2019 Feb 6;36(1):1–11. doi: 10.4274/tjh.galenos.2018.2018.0150
164. Al-Mahayri ZN, AlAhmad MM, Ali BR. Long-Term Effects of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Chemotherapy: Can Recent Findings Inform Old Strategies? *Frontiers in Oncology* [Internet] 2021 Oct 15 [cited 2024 Jan 23];11:710163. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2021.710163/full>
165. Mirzayi C, Renson A, Furlanello C, Sansone SA, Zohra F, Elsafoury S, et al. Reporting guidelines for human microbiome research: the STORMS checklist. *Nature Medicine*. 2021 Nov;27(11):1885–92. doi: <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01552-x>
166. Sadrifar S, Abbasi-Dokht T, Forouzandeh S, Malek F, Yousefi B, Salek Farrokhi A, et al. Immunomodulatory effects of probiotic supplementation in patients with asthma: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* [Internet]. 2023 Jan 2 [cited 2024 Jan 23];19(1). Available from: <https://aacijournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13223-022-00753-4#citeas>
167. Kulkarni T, Majarikar S, Deshmukh M, Ananthan A, Balasubramanian H, Keil A, et al. Probiotic sepsis in preterm neonates—a systematic review. *European Journal of Pediatrics*. 2022 Mar 29;181(6):2249–62. doi: 10.1007/s00431-022-04452-5. Epub 2022 Mar 29.
168. Korpela K, Salonen A, Vepsäläinen O, Suomalainen M, Kolmeder C, Varjosalo M, et al. Probiotic supplementation restores normal microbiota composition and function in antibiotic-treated and in caesarean-born infants. *Microbiome*. [Internet] 2018 Oct 16 [cited 2024 Jan 23];6(1):182. Available from: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-018-0567-4>
169. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* [Internet]. 2017 Jun 14 [cited 2024 Jan 23];14(8):491-502. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2017.75>
170. Raman M, Ambalam P, Kondepudi KK, Pithva S, Kothari C, Patel AT, et al. Potential of probiotics, prebiotics and synbiotics for management of colorectal cancer. *Gut Microbes*. 2013 May;4(3):181–92. doi: 10.4161/gmic.23919
171. Martyniak A, Zakrzewska Z, Schab M, Zawartka A, Wędrychowicz A, Skoczeń S, et al. Prevention and Health Benefits of Prebiotics, Probiotics and Postbiotics in Acute Lymphoblastic Leukemia.

- Microorganisms [Internet]. 2023 Jul 1 [cited 2024 Jan 24];11(7):1775. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/7/1775>
172. Davani-Davari D, Negahdaripour M, Karimzadeh I, Seifan M, Mohkam M, Masoumi S, et al. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods* [Internet]. 2019 Mar 9 [cited 2024 Jan 24];8(3):92. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6463098/>
  173. Żółkiewicz J, Marzec A, Ruszczyński M, Feleszko W. Postbiotics—A Step Beyond Pre- and Probiotics. *Nutrients* [Internet]. 2020 Jul 23 [cited 2024 Jan 24];12(8):1-17. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7468815/?fbclid=IwAR1NGs0y0AIK5NBnytnB33wUMXruA0H4XhgMQBxr83Mm9\\_8pIKkug6cfyXs](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7468815/?fbclid=IwAR1NGs0y0AIK5NBnytnB33wUMXruA0H4XhgMQBxr83Mm9_8pIKkug6cfyXs)
  174. Song D, Wang X, Ma Y, Liu NN, Wang H. Beneficial insights into postbiotics against colorectal cancer. *Frontiers in Nutrition*. [Internet] 2023 Mar 10 [cited 2024 Jan 24];10:1111872. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2023.1111872/full>
  175. Wang L, Song Y, Parikh A, Joyce P, Chung R, Liu L, et al. Doxorubicin-Loaded Delta Inulin Conjugates for Controlled and Targeted Drug Delivery: Development, Characterization, and In Vitro Evaluation. *Pharmaceutics* [Internet]. 2019 Nov 6 [cited 2024 Jan 24];11(11):581. Available from: <https://doi.org/10.3390%2Fpharmaceutics11110581>
  176. Bindels LB, Delzenne NM, Loumaye A, Catry E, Walgrave H, Cherbuy C, et al. Increased gut permeability in cancer cachexia: mechanisms and clinical relevance. 2018 Apr 6;9(26):18224–38. doi: 10.18632/oncotarget.24804.
  177. Reyna-Figueroa J, Barrón-Calvillo E, García-Parra C, Galindo-Delgado P, Contreras-Ochoa C, Lagunas-Martínez A, et al. Probiotic Supplementation Decreases Chemotherapy-induced Gastrointestinal Side Effects in Patients With Acute Leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2019 Aug;41(6):468–72. doi: 10.1097/MPH.0000000000001497.
  178. Wan Ismail WR, Abdul Rahman R, Rahman NAA, Atil A, Nawi AM. The Protective Effect of Maternal Folic Acid Supplementation on Childhood Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis of Case-control Studies. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*. 2019 Jul 31;52(4):205–13. doi: 10.3961/jpmph.19.020. Epub 2019 Jul 2.
  179. Garbacz K. Anticancer activity of lactic acid bacteria. *Semin Cancer Biol*. 2022 Nov;86(Pt 3):356–66. doi: 10.1016/j.semcancer.2021.12.013. Epub 2022 Jan 4.
  180. Soo WT, Bryant R V., Costello SP. Faecal microbiota transplantation: Indications, evidence and safety. *Aust Prescr*. 2020 Apr 1;43(2):36–8. doi: 10.18773/austprescr.2020.014
  181. Pession A, Zama D, Muratore E, Leardini D, Gori D, Guaraldi F, et al. Fecal Microbiota Transplantation in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients: A Systematic Review. *Journal of Personalized Medicine*. 2021 Feb 4;11(2):100:1-14. doi: 10.3390/jpm11020100.
  182. Gray AN, DeFilipp Z. Fecal Microbiota Transplantation for Acute Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Expanding the Horizon into Pediatrics. *Transplant Cell Ther*. 2023 Aug 1;29(8):484–91. doi: 10.1016/j.jtct.2023.05.007. Epub 2023 May 10.
  183. Merli P, Putignani L, Ruggeri A, et al. Decolonization of multi-drug resistant bacteria by fecal microbiota transplantation in five pediatric patients before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: gut microbiota profiling, infectious and clinical outcomes. *Haematologica*. 2020 Nov 1;105(11):2686-2690. doi:10.3324/haematol.2019.244210

184. Innes AJ, Mullish BH, Ghani R, Szydlo RM, Apperley JF, Olavarria E, et al. Fecal Microbiota Transplant Mitigates Adverse Outcomes Seen in Patients Colonized With Multidrug-Resistant Organisms Undergoing Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Front Cell Infect Microbiol*. [Internet] 2021 Aug 27 [cited 2024 Feb 16];11:684659. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.684659/full>
185. Bilinski J, Grzesiowski P, Sorensen N, Madry K, Muszynski J, Robak K, et al. Fecal Microbiota Transplantation in Patients With Blood Disorders Inhibits Gut Colonization With Antibiotic-Resistant Bacteria: Results of a Prospective, Single-Center Study. *Clin Infect Dis*. 2017 Aug 1;65(3):364–70. doi: 10.1093/cid/cix252.
186. DeFilipp Z, Peled JU, Li S, Mahabamunuge J, Dagher Z, Slingerland AE, et al. Third-party fecal microbiota transplantation following allo-HCT reconstitutes microbiome diversity. *Blood Adv*. 2018 Apr 10;2(7):745–53. doi: 10.1182/bloodadvances.2018017731.
187. Taur Y, Coyte K, Schluter J, et al. Reconstitution of the gut microbiota of antibiotic-treated patients by autologous fecal microbiota transplant. *Sci Transl Med*. [Internet] 2018 [cited 2024 Feb 18];10(460):eaap9489. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.aap9489>
188. DeFilipp Z, Hohmann E, Jenq RR, Chen YB. Fecal Microbiota Transplantation: Restoring the Injured Microbiome after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(1):e17-e22. doi:10.1016/j.bbmt.2018.10.022
189. Allegretti JR, Kao D, Sitko J, Fischer M, Kassam Z. Early Antibiotic Use after Fecal Microbiota Transplantation Increases Risk of Treatment Failure. *Clinical Infectious Diseases*. 2018 Jan 1;66(1):134–5. doi: 10.1093/cid/cix684.
190. Bilinski J, Lis K, Tomaszewska A, Pechcinska A, Grzesiowski P, Dzieciatkowski T, et al. Eosinophilic gastroenteritis and graft-versus-host disease induced by transmission of Norovirus with fecal microbiota transplant. *Transpl Infect Dis*. [Internet] 2021 Feb [cited 2024 Mar 2];23(1):e13386. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tid.13386>
191. DeFilipp Z, Bloom PP, Torres Soto M, Mansour MK, Sater MRA, Huntley MH, et al. Drug-Resistant *E. coli* Bacteremia Transmitted by Fecal Microbiota Transplant . *New England Journal of Medicine*. 2019 Nov 21;381(21):2043–50 doi: 10.1056/NEJMoa1910437. Epub 2019 Oct 30.



## 7. Životopis

Rođen sam 10.5.1999. godine u Zagrebu.

Osnovnu školu Jurja Habdelića u Velikoj Gorici završio sam 2014. godine s odličnim uspjehom i priznanjem za učenika generacije.

Upisao sam V. gimnaziju u Zagrebu koju sam završio s odličnim uspjehom 2018. godine. Sva četiri razreda ove prirodoslovne gimnazije sam završio s odličnim uspjehom.

Tijekom školovanja u gimnaziji sudjelovao sam na Državnom natjecanju iz Latinskog jezika i osvojio 4. mjesto.

Za vrijeme gimnazijskog obrazovanja stekao sam, osim C1 razine iz engleskog, i Deutsches Sprachdiplom der Kulturministerkonferenz – Zweite Stufe (C1 razina).

Maturirao sam s odličnim uspjehom te položio prijemni i upisao Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Redovni sam student s visokim prosjekom ocjena, a za prosjek na 4. godini također sam i nagrađen Dekanovom nagradom.

Na fakultetu demonstriram i radim na više katedri, kao što su Katedra iz medicinske biofizike i Katedra iz patofiziologije. Osim toga, u vodstvu sam Studentske sekcije za psihijatriju.

Od prošle akademske godine započeo sam i suradnju s prof.dr.sc. Ernestom Bilićem na više projekata na Zavodu za pedijatrijsku hematologiju i onkologiju.

Ove i prošle godine sam sudjelovao i radio u pilot projektu "Student administrator" za rasterećivanje ambulanti obiteljske medicine u Domu zdravlja Centar.

Od 2018. godine do danas sam dobrovoljni davatelj krvi.

