Współczesna Onkologia (2002) vol. 6: 5; 264–271

Bakterie onkolityczne w terapii nowotworów

Oncolytic bacteria in cancer therapy

Joanna Jazowiecka, Stanisław Szala

Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Niektóre fakultatywnie i obligatoryjnie beztlenowe bakterie swoiście lokalizują się i namnażają w niedotlenowanych regionach guzów nowotworowych. Bakterie te mogą niszczyć komórki nowotworowe (mechanizm niszczenia komórek nowotworowych nie jest dobrze poznany) lub mogą być swoistymi nośnikami terapeutycznych genów. Jednymi z lepiej poznanych bakterii onkolitycznych są obligatoryjnie beztlenowe laseczki z rodzaju Clostridium. Wiele danych wskazuje, że również bakterie fakultatywnie beztlenowe, np. Salmonella typhimurium wykazują swoistą akumulację w guzach nowotworowych w stosunku do innych tkanek (ok. 10^3 razy większa).
Oprócz badań przedklinicznych, w których wykazano możliwości wykorzystania bakterii onkolitycznych w leczeniu zwierząt doświadczalnych, prowadzone są obecnie badania kliniczne nad skutecznością terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem atenuowanego szczepu Salmonella typhimurium.
W artykule przedstawiono wyniki badań dotyczące wykorzystania bakterii onkolitycznych w terapii nowotworów. W przyszłości terapia bakteriolityczna skojarzona z chemioterapią lub radioterapią może okazać się skuteczną strategią terapeutyczną w leczeniu guzów oraz przerzutów.

Słowa kluczowe: niedotlenowanie komórek nowotworowych, bakterie beztlenowe, bakteriolityczna terapia nowotworów.

WSTĘP

Mimo znacznego rozwoju metod terapeutycznych, radioterapia jak i chemioterapia dalej są mało swoistymi metodami w terapii przeciwnowotworowej. Nadal poszukuje się skutecznej strategii terapeutycznej, która selektywnie eliminowałaby komórki nowotworowe, natomiast oszczędzała komórki prawidłowe. Wraz z rozwojem inżynierii genetycznej pojawiła się nowa możliwość leczenia nowotworów – terapia genowa. Podstawowym jej problemem jest jednak brak swoistego wprowadzania terapeutycznych genów *in vivo*. Zarówno nośniki wirusowe (np. adenowirusy), jak i nośniki niewirusowe (np. liposomy kationowe) lub szereg metod fizycznych (np. elektroporacja czy pistolet genowy) nie pozwalają na wysoce swoiste dostarczanie genów do komórek nowotworowych [1, 2]

Szereg badań wskazuje na znaczne różnice fizjologiczne między prawidłowymi tkankami a nowotworami, np. sieć okołonowotworowych naczyń krwionośnych wyraźnie różni się od sieci naczyń prawidłowych: jest nieregularna, kręta i o dużej przepuszczalności [3]. W miarę oddalania się od światła naczynia obserwuje się powstawanie niedotlenowanych i nekrotycznych obszarów w guzach. Od lat przypuszczano, że w regionach tych mogą rozwijać się bakterie beztlenowe. Toksyny wydzielane przez te mikroorganizmy mogłyby zabijać w swoisty sposób komórki nowotworowe. Jednak początkowe badania (lata 50.) z zastosowaniem bakterii z rodzaju *Clostridium* nie były zachęcające – nie zaobserwowano znacznych efektów terapeutycznych [4]. Nadal poszukuje się bakterii niepatogennych, które swoiście niszczyłyby wyłącznie komórki nowotworowe. Niektóre bakterie onkolityczne próbuje się wykorzystać także jako swoiste nośniki genów terapeutycznych. Przykładowo: enzymy kodowane przez geny samobójcze umożliwiają przekształcanie nieaktywnego proleku w lek, którego działanie prowadzi do śmierci komórek.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie wyników badań dotyczących wykorzystania bakterii onkolitycznych w terapii przeciwnowotworowej oraz stosowania niektórych z nich jako swoistych nośników genów terapeutycznych.

BAKTERIE ONKOLITYCZNE

Jedno z pierwszych doświadczeń dotyczyło wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej ściśle beztlenowych laseczek z rodzaju *Clostridium*. Drobnoustroje te wybrano, ponieważ mogą rozwijać się przy nieobecności tlenu lub

The most significant problem for cancer gene therapy is how to selectively deliver a therapeutic gene to the tumour. To overcome this problem several vectors (replication-defective viruses, cationic liposomes as well as physical methods such as electroporation or gene gun) were tried, but their selectivity has been low.
Compared with normal tissue vasculature, blood vessels in tumours are often irregular, tortuous and leaky. With increasing distance from blood vessels, chronically and acutely hypoxic as well as necrotic regions within tumour become more prevalent. Hypoxia is a typical feature found in most solid tumours. The poorly vascularized regions of tumours represent a major obstacle to effective treatment.
It has been known for some time that certain facultative and obligatory anaerobic bacteria can selectively accumulate and replicate within hypoxic tumour regions. These bacteria can kill tumour cells (the oncolytic mechanism is not well known) or, alternatively, unarmed bacteria can be used as a vector suitable for delivering therapeutic genes to tumours. One of the better known oncolytic bacteria is an obligatory anaerobic genus Clostridium that has the ability to proliferate selectively in the hypoxic and necrotic regions as well as efficiently inhibit growth of solid tumours. The spores of Clostridium novyi with deleted gene encoding a lethal toxin can germinate within avascular regions of murine tumours and can kill viable tumour cells in a yet unknown way. Numerous data show that the facultative anaerobe attenuated Salmonella typhimurium, exhibits high specific accumulation in tumours (10^3 times greater than in other tissues). Several experiments have shown that

przy niskiej jego zawartości, a więc w warunkach, jakie istnieją w nowotworach. Wszystkie bakterie z rodzaju *Clostridium* mogą wytwarzać przetrwalniki (endospory) w odpowiedzi na niekorzystne warunki środowiskowe. Podczas podawania *Clostridium* sp. zwierzętom doświadczalnym lepiej jest użyć spor a nie komórek wegetatywnych, ze względu na wrażliwość bakterii beztlenowych na działanie tlenu. Powstawanie spor (sporulacja) zachodzi wieloetapowo i odbywa się wewnątrz komórek bakteryjnych. Dojrzała spora, dzięki specjalnej strukturze płaszcza, jest oporna na różne czynniki fizyczne i chemiczne, działające szkodliwie lub zabójczo na komórkę wegetatywną [5]. Po znalezieniu się w niedotlenowanych obszarach nowotworu przetrwalniki rozwijają się (tzw. germinacja spor) i czerpią składniki pokarmowe z obumierających komórek nowotworowych.

Po dożylnym podaniu spor patogennego szczepu *Clostridium histolyticum* myszom obarczonych mięsakiem, bakterie namnażały się w guzach, powodując lizę komórek nowotworowych i częściową regresję nowotworu [6] (tab.). Malmgren i Flanagan [7] zaobserwowali jednak, że po dożylnym wstrzyknięciu spor *Clostridium tetani*, następowała śmierć zwierząt po 48 godz. na skutek wytwarzania toksyny tężcowej przez bakterie rozwijające się w nowotworach. Möse i Möse (cyt. wg Carey i wsp. [8]) wyizolowali niepatogenny szczep *Clostridium butyricum* – M55, którego spory po podaniu myszom również rozwijały się w guzie, powodując lizę komórek nowotworowych. Wprawdzie obserwowano zwiększoną regresję nowotworu, niemniej zwierzęta ginęły, prawdopodobnie w wyniku toksemii. Eksperymenty te zapoczątkowały jednak pierwsze badania kliniczne na pacjentach chorych na raka. Mimo że bakterie lokalizowały się w nowotworze i powodowały lizę komórek nowotworowych doświadczenia zarzucono, gdyż terapia była mało efektywna [3].

MODYFIKACJE GENETYCZNE BAKTERII ONKOLITYCZNYCH

W ostatniej dekadzie znacznie rozwinęły się różne techniki inżynierii genetycznej. Możliwości te wykorzystano również przy modyfikowaniu bakterii onkolitycznych w terapii nowotworowej. Poprzez wklonowanie do plazmidu niepatogennej, bezwzględnie beztlenowej bakterii *Clostridium beijerinckii* (nazwę zmieniono na *Clostridium acetobutylicum*) genu *Escherichia coli* kodującego deaminazę cytozyny [9] czy nitroreduktazę [10], zaproponowano nową strategię terapeutyczną. Enzymy, takie jak deaminaza cytozyny czy nitroreduktaza kodowane przez geny samobójcze, syntetyzowane w cytoplazmie bądź w peryplazmie komórek bakteryjnych, metabolizują nieaktywny prolek do toksycznego leku (zarówno prolek, jak i aktywny lek przypuszczalnie dyfundują przez osłony bakteryjne). Lek dostaje się do komórek nowotworowych i indukuje w nich śmierć apoptotyczną [11].

Wstrzyknięte do krwiobiegu zwierząt obarczonych guzami, spory zmodyfikowanej bakterii *Clostridium beijerinckii* rozwijały się jedynie w niedotlenowanych obszarach nowotworu [10]. Bakterie produkowały nitroreduktazę, która z kolei aktywowała prolek 5-azyrydynylo-2,4-dinitrobenzamid (CB 1954) do jego toksycznej formy 5-azyrydynylo-4-hydroksyamino-2-nitrobenzamidu. Enzym ten wykryto tylko w lizatach komórek nowotworowych.

Natomiast bakterie *Clostridium beijerinckii*, będące nośnikami genu deaminazy cytozyny, wytwarzały enzym, który metabolizował nieaktywny prolek 5-fluorocytozynę (5-FC) do aktywnego leku, stosowanego powszechnie w terapii przeciwnowotworowej, 5-fluorouracylu [9]. Obserwowano wysokie stężenie leku w guzach oraz lizę komórek nowotworowych.

Salmonella typhimurium can inhibit growth of primary tumours and metastases. The investigated strain of Salmonella typhimurium, called VNP20009, carries deletions in the msbB and purI loci that result in loss of virulence. These bacteria, with additional gene encoding cytosine deaminase, can metabolise a non-toxic prodrug (5-fluorocytosine) to a highly toxic drug (5-fluorouracil).
Besides preclinical investigations that show potential application of oncolytic bacteria in experimental cancer therapy, one genetically modified strain of Salmonella typhimurium is currently in Phase I trials in cancer patients.
This article summarises the results of investigations using oncolytic bacteria for the therapy of tumours. Successful combination of bacteriolytic therapy with chemotherapy or radiotherapy may provide in the future a new strategy for treatment of solid tumours as well as metastases.

Key words: hypoxic tumour cells, anaerobic bacteria, bacteriolytic tumour therapy.

Szczep *Clostridium* acetobutylicum również był modyfikowany przez innych badaczy. Do bakterii wprowadzono dodatkowo gen deaminazy cytozyny z *Escherichia coli*, który znajdował się pod kontrolą promotora endoproteazy (ang. *clostripain*) z *Clostridium histolyticum*, poprzedzonego sekwencją sygnalną dla tego białka [12]. W lizatach i supernatantach komórek bakteryjnych zaobserwowano znaczne ilości wydzielanej deaminazy cytozyny. Spory *Clostridium acetobutylicum*, podawane doguzowo szczurom, rozwijały się w niedotlenowanych regionach nowotworu. Dodatkowo zwierzętom podano antyangiogenny lek – kombretastatynę A-4. Stwierdzono zwiększoną nekrozę nowotworów i dużo lepszy wzrost bakterii.

Trwały poszukiwania bakterii, która byłaby niepatogenna, namnażała się tylko w obrębie guza (włącznie z obszarami niedotlenowania i nekrozy) oraz odznaczała się znaczną zdolnością lizy komórek nowotworowych [4].

Grupa Vogelsteina [13] usiłowała wykorzystać w terapii nowotworowej silnie zjadliwy szczep *Clostridium novyi*. W celu zinaktywowania genu bakteryjnej toksyny spory tego drobnoustroju ogrzewano w 70°C przez 15 min. Spory następnie wstrzyknięto dożylnie myszom. Zaobserwowano, iż rozwijały się one w niedotlenowanych obszarach nowotworu, powodując lizę komórek nowotworowych i całkowitą regresję guza. Efekt terapeutyczny został dodatkowo wzmocniony przez podanie chemioterapeutyków (dolastatyny-10 i mitomycyny C). Niemniej jednak, ok. 15–45 proc. leczonych myszy zginęło, prawdopodobnie w wyniku zbyt dużego stężenia toksycznych metabolitów, powstających ze zniszczonych komórek.

Ostatnio podjęto próby wykorzystania w terapii zmodyfikowanych genetycznie beztlenowych bakterii *Clostridium sporogenes*, będących nośnikami genu deaminazy cytozyny z *Escherichia coli* [14]. Produkt ekspresji samobójczego genu metabolizuje nieaktywny prolek 5-fluorocytozynę (5-FC) do aktywnego leku 5-fluorouracylu. W badaniach wykazano, że w niedotlenowanych regionach nowotworu, liczba rozwijających się ze spor bakterii *Clostridium sporogenes* wynosiła 1-2 x 10^8 cfu/g tkanki (cfu, ang. *colony forming units*, jednostki koloniotwórcze), natomiast bakterii *Clostridium beijerinckii* jedynie 10^5-10^6 cfu/g tkanki. Liczba namnożonych bakterii *Clostridium sporogenes*, jak i stężenie powstającego w guzie nowotworowym leku (5-FU) były wystarczające, aby wywołać efekt terapeutyczny.

W terapii nowotworów próbuje się również wykorzystać bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* [15, 16]. Te Gram-dodatnie, obligatoryjnie beztlenowe i niepatogenne pałeczki, występują w jelicie cienkim i grubym u człowieka i innych ssaków oraz w stolcu niemowląt karmionych piersią. Bakterie *Bifidobacterium longum* swoiście lokalizują się tylko w obrębie niedotlenowanych obszarów guza i mogą być użyte jako nośniki terapeutycznych genów w terapii przeciwnowotworowej [16].

Oprócz badań nad *Clostridium sp. i Bifidobacterium sp.* wykonano szereg doświadczeń, wykorzystując fakultatywnie beztlenowe bakterie *Salmonella typhimurium*, które mogą rozwijać się zarówno w warunkach beztlenowych, jak i tlenowych.

Raporty donoszą, iż bakterie używane jako czynniki przeciwnowotworowe mogą być bezpiecznie podawane zwierzętom doświadczalnym, pod warunkiem że zjadliwość tych bakterii jest pod stałą kontrolą. Proces pozbawiania mikroorganizmu właściwości chorobotwórczych nosi nazwę atenuacji. Pawelek i wsp. [17] skonstruowali atenuowany szczep *Salmonella typhimurium* w ten sposób, że drobnoustrój stracił zjadliwość na skutek wad metabolizmu wywołanych mutacją auksotroficzną (niezdolny

Tab. Bakterie onkolityczne stosowane w terapii eksperymentalnej nowotworów

Gatunek bakterii	Model nowotworu	Modyfikacja genetyczna bakterii	Mechanizm działania, toksyczność bakterii i ich lokalizacja	Obserwowane rezultaty terapeutyczne oraz efekty uboczne	Literatura
1	2	3	4	5	6
			Bakterie obligatoryjnie beztlenowe		
Clostridium histolyticum	mysi mięsak	bakterie niemodyfikowane genetycznie	zmniejszanie toksyczności *Clostridium histolyticum* poprzez podawanie antytoksyny i penicyliny	częściowa regresja mięsaka i przedłużone życie zwierząt w porównaniu z myszami z grup kontrolnych – nieleczonych	[6]
Clostridium tetani	mysi rak sutka, włókniakomięsak i wątrobiak	bakterie niemodyfikowane genetycznie	lokalizacja *Clostridium tetani* w niedotlenowanych regionach guzów	śmierć myszy spowodowana toksyną tężcową po 48 godz. od podania spor *Clostridium tetani*	[7]
Clostridium butyricum (M-55)	mysi rak Ehrlicha	bakterie niemodyfikowane genetycznie	identyfikacja najbardziej skutecznych bakterii z rodzaju *Clostridium*	regresja guzów, szybka śmierć zwierząt w wyniku toksemii	cyt. wg Carey [8]
Clostridium acetobutylicum (Clostridium beijerinckii), Clostridium butyricum, Clostridium pectinovorum, Clostridium tyrobutyricum	mysi mięsak i czerniak, chomiczy gruczolakorak nerki	bakterie niemodyfikowane genetycznie	terapia z wykorzystaniem bakterii *Clostridium sp.* i chemioterapeutyków (5-FU, tetraminy)	wszystkie użyte kombinacje zwiększały regresję dużych guzów, brak efektów terapeutycznych dla przerzutów i małych guzów, śmierć zwierząt po 3 mies.	cyt. wg Jain i Forbes [6]
Clostridium beijerinckii	mysi rak sutka	bakterie z dodatkowym genem deaminazy cytozyny z *Escherichia coli*	modyfikacja 5-FC do 5-FU	liza komórek nowotworowych, wysokie stężenie 5-FU w obszarach niedotlenowanych guzów	[9]
Clostridium beijerinckii	mysi rak sutka	bakterie z dodatkowym genem nitroreduktazy z *Escherichia coli*	modyfikacja proleku CB 1954 poprzez nitroreduktazę do toksycznego leku (5-azyrydyny l-4-hydroksyamino -2-nitrobenzamidu)	nitroreduktaza wykryta w lizatach komórek nowotworowych	[10]
Clostridium acetobutylicum	szczurzy mięśniakomięsak prążkowany	bakterie z dodatkowym genem deaminazy cytozyny z *Escherichia coli*	modyfikacja 5-FC do 5-FU	deaminaza cytozyny wykryta w lizatach komórek nowotworowych	[12]

Clostridium novyi	mysi czerniak i rak okrężnicy	inaktywacja genu toksyny poprzez 15-minutowe ogrzewanie w 70°C	użycie kombinacji chemioterapii (dolastatyna-10, mitomycyna C) i bakteriolitycznej terapii	wyleczenie ~50 proc. zwierząt, śmierć poniosło ~15–45 proc. myszy	[13]
Clostridium sporogenes	mysi rak płaskonabłonkowy (SCCVII)	bakterie z dodatkowym genem deaminazy cytozyny z *Escherichia coli*	modyfikacja 5-FC do 5-FU	efekt terapeutyczny w wyniku wysokiego stężenia leku 5-FU w guzie	[14]
Bifidobacterium longum	szczurzy rak sutka indukowany DMBA	bakterie z dodatkowym genem oporności na specinomycynę	lokalizacja bakterii tylko w niedotlenowanych obszarach nowotworu	brak toksyczności produktu wprowadzonego genu	[15, 16]
Bakterie fakultatywnie beztlenowe					
Salmonella typhimurium	mysi czerniak	pozbawienie zjadliwości bakterii (atenuacja) w wyniku mutacji auksotroficznej – delecja genów *pur, ilv, ura, arg*	pozbawienie zjadliwości bakterii *Salmonella* i utrzymanie ich tropizmu doguzowego	akumulacja bakterii w nowotworze w stosunku do prawidłowych tkanek od 250:1 do 9 000:1, zahamowanie wzrostu guza	[17]
Salmonella typhimurium	mysi czerniak	pozbawienie zjadliwości bakterii przez delecję genów *msbB* i *purI*, wprowadzenie genu deaminazy cytozyny	Pozbawienie zjadliwości bakterii *Salmonella* i utrzymanie ich tropizmu doguzowego	trwała akumulacja bakterii i ekspresja deaminazy cytozyny w guzie nowotworowym	[19]
Salmonella typhimurium	mysi czerniak	pozbawienie zjadliwości bakterii przez delecję genów *msbB* i *purI*, wprowadzenie genu deaminazy cytozyny	preferencyjny tropizm atenuowanych bakterii *Salmonella*, modyfikacja 5-FC do 5-FU, zastosowanie radioterapii	1 000-krotna akumulacja w nowotworze w stosunku do normalnych tkanek, wysoka przeciwnowotworowa aktywność w kombinacji z 5-FC i z radioterapią	[11, 22]

do syntezy niektórych aminokwasów, puryn i pirymidyn). Za właściwości chorobotwórcze bakterii Gram-ujemnych odpowiedzialny jest immunologicznie czynny element strukturalny ściany komórkowej, tj. lipopolisacharyd (LPS) – silna endotoksyna. W celu wyeliminowania powstawania u zwierząt wstrząsu septycznego skonstruowano, w wyniku delecji genów *msbB i purI*, znacznie bardziej atenuowany szczep *Salmonella typhimurium* (VNP20009) [20]. Gen *msbB* koduje enzym, biorący udział w przyłączanie kwasu mirystynowego do lipidu A w lipopolisacharydzie [19]. Wykazano, że bakterie *Salmonella typhimurium* z zaburzoną syntezą lipidu A mają ograniczoną zdolność do indukowania czynnika martwicy nowotworów-α (TNF-α), zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* [18, 19, 20]. Stąd atenuowany szczep VNP20009 nie wywołuje stanów zapalnych. Dodatkowo bakterie zmodyfikowano genetycznie genem samobójczym deaminazy cytozyny z *Escherichia coli*.

Po dożylnym podaniu szczepu VNP20009 w ilości 1 x 10^4–2 x 10^6 cfu/mysz obserwowano skuteczne zahamowanie wzrostu guzów pierwotnych, np. czerniaka mysiego. Liczba bakterii w nowotworze była 10^3 razy większa niż w wątrobie [21]. Podanie szczepu VNP20009 w dawce 2 x 10^6 cfu/mysz również spowodowało znaczne zahamowanie liczby przerzutów czerniaka do płuc w porównaniu z próbami kontrolnymi [20].

Najskuteczniejsze efekty terapeutyczne obserwowano przy bakteriolitycznej terapii skojarzonej z systemowym podawaniem proleku (5-FC), jak również z radioterapią [11].

Badania wykazały, że kombinacja zmodyfikowanych genetycznie bakterii *Salmonella typhimurium* (z delecją genów *msbB* i *purI*) z radioterapią znacznie zwiększa efektywność terapii [11, 22]. Aktyw-

ność przeciwnowotworową oceniano poprzez oznaczanie liczby dni (od zaszczepienia myszy komórkami nowotworowymi) potrzebnych do wytworzenia się 1 g guza. Skuteczne zahamowanie procesu nowotworowego i najdłuższy czas przeżywania zwierząt doświadczalnych zaobserwowano po podawaniu myszom bakterii *Salmonella typhimurium* oraz przy największej zakumulowanej dawce promieniowania (50 Gy). Dla tej kombinacji mysie czerniaki osiągnęły wielkości 1 g przeciętnie w ciągu 100 dni. Tę samą masę po podaniu do guza wyłącznie bakterii *Salmonella* lub po napromieniowaniu promieniami X uzyskano kolejno po czasie 5 razy i ok. 50 proc. krótszym.

SWOISTOŚĆ I MECHANIZM DZIAŁANIA BAKTERII ONKOLITYCZNYCH W NOWOTWORZE

Jak już wspomniano, bakterie onkolityczne wykazują swoistą lokalizację w nowotworze w stosunku do prawidłowych tkanek. Bogate w składniki odżywcze środowisko nowotworu, zwiększony metabolizm komórek nieprawidłowych oraz hipoksja czy nekroza w guzach nowotworowych mogą powodować selektywny wzrost bakterii beztlenowych. Charakterystyczny sposób poruszania się niektórych drobnoustrojów onkolitycznych (posiadających rzęski) może ułatwiać ich rozprzestrzenianie się w obrębie nowotworu.

W odróżnieniu od obligatoryjnie beztlenowych bakterii *Clostridium sp.*, które mogą się rozwijać tylko w niedotlenowanych i nekrotycznych regionach dużych guzów, fakultatywnie beztlenowe bakterie *Salmonella typhimurium* rozwijają się już w małych guzach o masie 0,1 g (cyt. wg Luo [20]).

Aby móc rozwijać się w tkankach, bakterie muszą znaleźć nie tylko odpowiednie środowisko odżywcze ale także ominąć szereg reakcji obronnych organizmu.

Mimo iż modyfikowane genetycznie bakterie *Salmonella typhimurium* są pozbawione zjadliwości, nie wyklucza się, że dzięki cytotoksycznym składnikom ich ściany komórkowej mogą indukować apoptozę makrofagów i granulocytów (cyt. wg Luo [20]). Inni sugerują, że niedotlenowane obszary nowotworów powodują nieprawidłowe funkcjonowanie makrofagów, a tym samym umożliwiają rozwój bakteriom beztlenowym [18]. Natomiast przeciwciała i komplement surowicy, mogłyby wspólnie niszczyć bakterie, ale ich przedostawanie się do środowiska nowotworowego jest silnie ograniczone poprzez nieregularną sieć naczyń oraz dodatnie ciśnienie wewnątrznowotworowe [18, 23]. W guzach nowotworowych nie wykryto granulocytów odpowiedzialnych za eliminowanie drobnoustrojów z organizmu gospodarza. Brak infiltracji granulocytów w nowotworach może być spowodowane, np. wydzielaniem transformującego czynnika wzrostu (TGF-β) przez komórki nowotworowe albo komórki zrębu [11, 18, 23]. Może to tłumaczyć, dlaczego usuwanie z nowotworu przez układ immunologiczny bakterii zmodyfikowanych genetycznie odbywa się wolniej i mniej efektywniej niż w prawidłowych tkankach [23]. Mimo wszystko, u myszy leczonych szczepem VNP20009 zaobserwowano, że neutrofile towarzyszyły jednak nekrozie guzów [20].

Przetrwalniki bakterii *Clostridium sp.* nie wywołują odpowiedzi immunologicznej [14]. Brak różnic w liczbie rozwijających się bakterii pomiędzy 7. a 14. dniem od podania spor sugeruje, że bakterie te rzeczywiście nie wywołują odpowiedzi immunologicznej.

Mechanizm przeciwnowotworowej aktywności atenuowanej bakterii *Salmonella typhimurium* w kombinacji z radioterapią również nie jest do końca wyjaśniony. Prawdopodobnie bakterie *Salmonella typhimurium* wydzielają związki, które zwiększają wrażliwość komórek na radioterapię, np. poprzez zahamowanie systemu naprawczego w komórkach nowotworowych. Promieniowanie zmienia środowisko nowotworu na bardziej dostępne dla bakterii i ich toksyn. Platt i wsp. [22] przypuszczają, iż bakterie te jednak rekrutują komponenty systemu immunologicznego (np. limfocyty, makrofagi, neutrofile) do guza i w ten sposób komórki nowotworowe stają się bardziej wrażliwe na atak układu immunologicznego.

PRÓBY KLINICZNE

Niepatogenny szczep *Salmonella typhimurium* (VNP20009) został wykorzystany w badaniach klinicznych. W fazie pierwszej próbowano określić bezpieczną dawkę i kolonizację drobnoustrojów u 9 osób, chorych m.in. na czerniaka, raka nerki, prostaty oraz neuroendokrynnego raka skóry (rak Merkla). Po doguzowym podaniu bakterii zaobserwowano u pacjentów gorączkę, ból w miejscu wstrzyknięcia oraz osłabienie organizmu. U większości chorych badania mikroskopowe wykazały ostre stany zapalne, obszary nekrozy oraz zwłóknienia w obrębie nowotworów. Jedynie u dwóch osób zaobserwowano widoczny wzrost guza nowotworowego, natomiast u pozostałych chorych guzy nie zmieniły się od momentu podania szczepu VNP20009. W fazie pierwszej znajdują się także próby wykorzystania bakterii onkolitycznych jako nośników terapeutycznych (samobójczych) genów [24].

ZAKOŃCZENIE/WNIOSKI

W artykule starano się przedstawić możliwości wykorzystania bakterii beztlenowych w terapii nowotworów.

Bakterie onkolityczne zdolne są do selektywnego namnażania się w niedotlenowanym środowisku nowotworowym oraz do niszczenia komórek nowotworowych. Mikroor-

ganizmy te mogą być też swoistymi nośnikami terapeutycznych (samobójczych) genów, np. deaminazy cytozyny. Enzym kodowany przez samobójczy gen umożliwia przekształcanie nieaktywnego proleku w substancje, której działanie prowadzi do śmierci komórek.

Wykorzystanie bakterii onkolitycznych może przyczynić się do stworzenia nowej strategii terapeutycznej, polegającej na bezpośredniej, niezwykle selektywnej eliminacji komórek nowotworowych.

Bakteriolityczna terapia skojarzona jednocześnie z chemioterapią lub radioterapią może okazać się skutecznym rozwiązaniem w leczeniu guzów litych oraz przerzutów.

PIŚMIENNICTWO

1. Mountain A. *Gene therapy: the first decade.* Trends Biotechnol 2001; 18: 119-28.
2. Somia N, Verma IM. *Gene therapy: trials and tribulations.* Nat Rev Genet 2000; 1: 91-9.
3. Brown JM, Giaccia AJ. *The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. Cancer Res 1998; 58: 1408-16.*
4. Jain RK, Forbes NS. *Can engineered bacteria help control cancer?* Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 14748-50.
5. Schlegel HG. *Mikrobiologia ogólna.* PWN Warszawa 1996.
6. Parker RC, Plummer HC, Siebenmann CO, Chapman M. *Effect of histolyticus infection and toxin on transplantable mouse tumors.* Proc Soc Exp Med 1947; 66: 461-7.
7. Malmgren RA, Flaningan CC. *Localization of the vegetative form of Clostridium tetani in mouse tumors following intravenous spore administration.* Cancer Res 1955; 15: 473-8.
8. Carey RW, Holland JF, Whang HY, Neter E, Bryant B. *Clostridial oncolysis in man.* Eur J Cancer 1967; 3: 37-46.
9. Fox ME, Lemmon MJ, Mauchline ML, Davis TO, Giaccia AJ, Minton NP, Brown JM. *Anaerobic bacteria as a deliver system for cancer gene therapy: in vitro activation of 5- fluorocytosine by genetically engineered clostridia.* Gene Ther 1996; 3: 173-78.
10. Lemmon MJ, Zij P, Fox ME, Mauchline ML, Giaccia AJ, Minton NP, Brown JM. *Anaerobic bacteria as a gene delivery system that is controlled by the tumor microenvironment.* Gene Ther 1997; 4: 791-6.
11. Bermudes D, Low KB, Pawelek J, Feng M, Belcourt M, Zheng LM, King I. *Tumor-selective Salmonella-based cancer therapy.* Biotechnol Genet Engineering Rev 2001; 18: 219-33.
12. Theys J, Landuyt W, Nuyts S, Van Mellaert L, van Oosterom A, Lambin P, Anne J. *Specific targeting of cytosine deaminase to solid tumors by engineered Clostridium acetobutylicum.* Cancer Gene Ther 2001; 8: 294-7.
13. Dang LH, Bettegowda C, Huso DL, Kinzler KW, Vogelstein B. *Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors.* Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 15155-60.
14. Liu SC, Minton N, Giaccia A, Brown J. *Anticancer efficacy of systemically delivered anaerobic bacteria as gene therapy vectors targeting tumur hypoxia/necrosis.* Gene Ther 2002; 9: 291-6.
15. Yazawa K, Fujimori M, Amano J, Kano Y, Taniguchi S. *Bifidobacterium longum as a delivery system for cancer gene therapy: selective localization and growth in hypoxic tumors.* Cancer Gene Ther 2000; 7: 269-74.
16. Yazawa K, Fujimori M, Nakamura T, Sasaki T, Amano J, Kano Y, Taniguchi S. *Bifidobacterium longum as a delivery system for gene therapy of chemically induced rat mammary tumors.* Breast Cancer Res Treat 2001; 66: 165-70.
17. Pawelek JM, Low KB, Bermudes D. *Tumor-targeted Salmonella as a novel anticancer vector.* Cancer Res 1997; 57: 4537-44.
18. King I, Luo X, Feng M, et al. *Tumour therapy using Salmonella.* Emerging Drugs 2000; 5: 211-9.
19. Zheng LM, Luo X, Feng M, et al. *Tumor amplified protein expression therapy: Salmonella as a tumor- selective protein delivery vector.* Oncol Res 2000; 12: 127-35.
20. Luo X, Li Z, Lin S, et al. *Antitumor effect of VNP20009, an attenuated Salmonella, in murine tumor models.* Oncol Res 2001; 12; 501-8.
21. Tjuvajev J, Blasberg R, Luo X, Zheng LM, King I, Bermudes D. *Salmonella--based tumor-targeted cancer therapy: tumor amplified protein expression therapy (TAPET) for diagnostic imaging.* J Control Release 2001; 74: 313-5.
22. Platt J, Sodi S, Kelley M, Rockwell S, Bermudes D, Low KB, Pawelek J. *Antitumour effects of genetically engineered Salmonella in combination with radiation.* Eur J Cancer 2000; 36: 2397-402.
23. Sznol M, Lin SL, Bermudes D, Zheng LM, King I. *Use of prefentially replicating bacteria for the treatment of cancer.* J Clinic Invest 2000; 105: 1027-30.
24. Mier J, Olencki T, Atkins M, et al. *Phase I trial of a live, attenuated Salmonella typhimurium (VNP20009) administered by direct intra-tumoral (IT) injection.* Proc Am Soc Clin Oncol 2001; 20 (część 1): Abstr 1043.

ADRES DO KORESPONDENCJI

mgr Joanna Jazowiecka
Zakład Biologii Molekularnej
Centrum Onkologii – Instytut
im. M. Skłodowskiej-Curie
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15
44-101 Gliwice
tel. (032) 278 97 27
fax (032) 231 35 12
e-mail: jjazowiecka@io.gliwice.pl

Praca została sfinansowana z grantu KBN Nr 3 PO5A O44 22.