

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK**

UPOTREBA BAKTERIJA KAO VEKTORA ZA LIJEČENJE TUMORA

THE USE OF BACTERIA AS VECTORS IN TUMOUR TREATMENT

SEMINARSKI RAD

Mateja Remenarić,
3. godina molekularne biologije
Mentorica: doc.dr.sc. Ivana Ivančić Baće

Zagreb, 2009.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
2. BAKTERIJE I TUMORI.....	4
2.1. <i>Bifidobacterium</i>	5
2.2. <i>Salmonella</i>	6
2.3. <i>Clostridium</i>	7
3. USPOREDBA BAKTERIJSKIH S VIRUSNIM VEKTORIMA – prednosti <i>Clostridia</i> ...	10
4. LITERATURA	12
5. SAŽETAK	14
6. SUMMARY.....	15

1. UVOD

Tumor, neoplazija ili novotvorina označava bilo koju abnormalnu proliferaciju stanica, koja može biti benigna (dobročudna) ili maligna (zloćudna). Benigni tumor, kao npr. kožna bradavica, ostaje lokaliziran na mjestu nastanka, tijekom rasta ne napada okolno tkivo nego ga potiskuje i ne širi se na udaljena mjesta u tijelu. S druge strane, maligni tumor se može infiltrirati u okolno normalno tkivo i širiti se po tijelu preko krvnog ili limfnog sustava žila (metastaziranje). Drugi naziv za maligni tumor je rak ili karcinom (Cooper, 2000).

Oko 90% ljudskih tumora čine čvrsti tumori. Početna neprokrvljena novotvorina nije opasna, no kada naraste i dosegne promjer od 2 mm, vaskulatura okolnog normalnog tkiva nije dovoljna da podrži daljnji rast (Wei i sur. 2007). Procesom angiogeneze dolazi do stvaranja novih krvnih žila. Tumor stvara opskrbu krvlju izlučivanjem angiogenih signala, poput normalnog tkiva. Ti se signali stvaraju kao odgovor na hipoksiju kod većih tumora, privlače endotelne stanice te stimuliraju rast novih krvnih žila. Osim što pomažu u opskrbi tumora hranjivim tvarima i kisikom, krvne žile omogućuju i da stanice tumora metastaziraju (Alberts i sur. 2008).

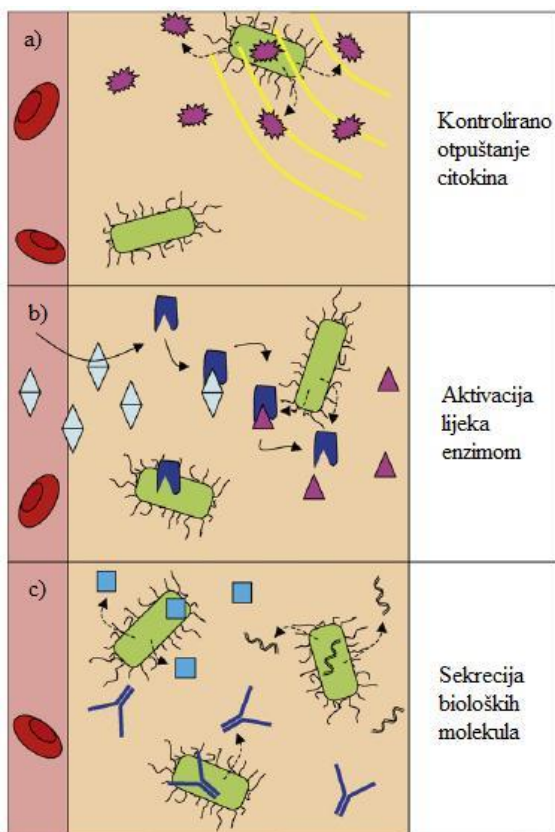
Ipak, inducirane žile su nepravilne, različite u promjeru, propusne i imaju mnoge slijepe krajeve. Navedene abnormalnosti vjerojatno nastaju zbog nenormalnih razina signalnih faktora te dovode do nepravilnog protoka krvi kroz tumor i doprinose stvaranju dodatnih regija hipoksije (Alberts i sur. 2008). Pošto liječenje tumora lijekovima uglavnom ovisi o transportu krvlju, neprokrvljene regije hipoksije zahtijevaju drugačiju terapiju.

Najstarije opažanje spontane regresije i oporavka od tumora pacijenata s istovremenom bakterijskom infekcijom potječe još od prije 300 godina. Već 1813. Vautier je zabilježio regresiju tumora kod pacijenata koji su bolovali od plinske gangrene, za koju se danas zna da je uzrokuje infekcija klostridijom (Wei i sur. 2008a). W. Busch je vjerojatno prvi, još 1868. namjerno bakterijom zarazio pacijenta koji je bolovao od raka. Inducirao je bakterijsku infekciju u ženi koja je imala sarkom koji se nije mogao operirati tako što je tumor spalio i smjestio ženu u krevet u kojem je prije ležao pacijent koji je bolovao od erizipela (akutna infekcija uzrokovana streptokokom). U prvom tjednu je zabilježio smanjenje tumora za 50% te također smanjenje limfnih čvorova na vratu. Ipak, pacijentica je umrla 9 dana nakon početka infekcije (Pawelek i sur. 2003). To je ponovio i F. Fehleisen 1882. koji je i prvi otkrio da je uzročnik erizipela bakterijski soj *Streptococcus pyrogenes*. Liječnik iz New Yorka, William Coley, je 1890. uz znanje iz dotadašnjih radova započeo liječenje pacijenata oboljelih od raka zaražavanjem s bakterijom *S. pyrogenes*. Rezultati nisu bili dobri kao što je

očekivao pa je za pojačanje toksičnosti dodao i bakteriju *Serratia marcescens*. To se pokazalo kao krucijalan događaj za postizanje efekta u liječenju tumora kakav do tada nije bio poznat. Mješavina bakterija mrtvih Gram-pozitivnih *S. pyrogenes* i mrtvih Gram-negativnih *S. marcescens*, poznata kao Coley-evi toksini, bila je korištena u liječenju pacijenata sa sarkomom do 1963. Taj je rad imao glavnu ulogu u razvoju bakterijske terapije tumora i tumorske imunologije (Wei i sur. 2008).

2. BAKTERIJE I TUMORI

Za potpuno izlječenje tumora treba riješiti mnoge nedostatke suvremenih terapija. Mnoge standardne terapije nisu efikasne u ciljanom utjecaju na tumor u odnosu na normalno tkivo što ograničava maksimalnu dozu zbog moguće sistemske toksičnosti. Problem također predstavlja i loše prodiranje u tumorsko tkivo što smanjuje koncentraciju lijeka u samom tumoru tako da on više nema efekta. Genetski modificirane bakterije imaju jedinstvenu sposobnost prevladavanja ovih nedostataka (Forbes i sur. 2008). Anaerobne i fakultativno anaerobne bakterije se nakon sistemskog unosa preferentno razmnožavaju u hipoksičnim dijelovima tumora. U novije doba to nije jedina karakteristika bakterija koje se koriste u borbi protiv tumora (Anderson, 2006). Bakterije divljeg tipa imaju sposobnost stvaranja i izlučivanja proteina i ta je činjenica iskorištena u razvoju ciljane terapije tumora. U bakterije se ubaci gen za neki protein koji unutar tumora ima terapijsko djelovanje. Ovisno o načinu djelovanja tog proteina moguće je dobiti tri različita terapijska djelovanja: kontrolirana citotoksičnost, enzimatska aktivacija lijeka i sekrecija bioloških molekula (sl. 1). Te tri opcije, uz sposobnost ciljanog razvoja bakterija unutar tumora, omogućuju preciznu kontrolu vremena i lokacije terapijskog djelovanja što povećava efikasnost i smanjuje sistemska toksičnost (Forbes i sur. 2008).



Slika 1. Mehanizmi ciljane dostave terapije.
a) bakterije pod utjecajem radijacije (žute crte) stvaraju i izlučuju citotoksične tvari (ljubičasti oblici)
b) enzimi (plavi oblici) koje stvara bakterija pretvaraju neaktivni oblik lijeka (svjetloplavi rombovi) u aktivni (ljubičasti trokutići)
c) bakterije stvaraju biološki aktivne tvari (plavi kvadratići) kao što su protutijela (plavi 'Y' oblici) i DNA (crne krivulje)

(Preuzeto iz: Forbes i sur. 2008)

Do sad upotrebljavane bakterije mogu se svrstati u tri glavne grupe: (1) Gram-pozitivne, obligatno anaerobne bakterije koje proizvode mliječnu kiselinu, predstavnik je bifidobakterija; (2) Gram-negativne, fakultativno anaerobne bakterije s unutarstaničnim razmnožavanjem, predstavnik je salmonela; (3) Gram-pozitivne, obligatno anaerobne, saharolitske/proteolitske bakterije koje stvaraju spore, predstavnik skupine je klostridija (Wei i sur. 2007).

2.1. *Bifidobacterium*

Bifidobacterium je Gram-pozitivna anaerobna bakterija za koju je ustanovljeno da kolonizira velike tumore, vjerojatno zbog njegovih anaerobnih dijelova. *Bifidobacteria* nisu patogene i ne stvaraju spore te se prirodno nalaze u probavnom sustavu ljudi i ostalih sisavaca. Prva studija bila je napravljena 1980-ih na mišu kojem je u bedreni mišić implantiran Ehrlich ascitesni tumor (engl. Ehrlic's ascites carcinoma, EAC). Sistemski unos suspenzije *Bifidobacteria* je doveo do kolonizacije tumora. Taj je efekt pojačan dnevnim unosom laktuloze, šećernog supstrata kojeg metabolizira bakterija, ali ne i stanice sisavaca. No nije bio dokazan antitumorski efekt ili produljeno preživljavanje (Vassaux i sur. 2006).

Jedan od problema kod korištenja bakterije *Bifidobacterium* je nedostatak adekvatnog sustava transformacije. *Bifidobacterium longum* se može specifično razmnožavati u B16-F10 melanomu i Lewis karcinomu pluća kod miša. U tu svrhu je napravljen prijenosni vektor (engl. shuttle vector) pBLES100 konstruiran spajanjem plazmida iz bakterije *B. longum* i gena za otpornost na spektinomycin iz *Enterococcus faecalis* u *E. coli* vektor pBR322. Na taj način je omogućeno da bakterije roda *Bifidobacterium* mogu služiti za unos efektorskih gena u tumor (Yazawa i sur. 2000).

Isti vektor korišten je u razvoju BEST-CD terapije (Bifidobacterial Selective Targeting - Cytosine Deaminase Therapy) na način da je u njega umetnut i gen za citozin deaminazu iz *E. coli*. Citozin deaminaza (CD) pretvara 5- fluorocitozin (5-FC) u 5- fluorouracil (5-FU) koji je toksičan lijek protiv raka. Lokalizacija bakterija preferentno unutar tumora omogućuje stvaranje toksičnog lijeka unutar samog tumora te na taj način smanjuje sistemsku toksičnost. Smatra se da bi BEST-CD terapija bila pogodna za liječenje pacijenata s metastaziranim rakom dojke (Fujimori 2006).

I dalje su u tijeku istraživanja na plazmidima iz roda *Bifidobacteria* koji bi omogućili jednostavniju gensku terapiju (Sangrador-Vegas i sur. 2007, Shkoporov i sur. 2008). Veliki nedostatak ovih bakterija je činjenica da ne stvaraju spore i pokazuju veliku osjetljivost u

nepermisivnim uvjetima. Danas se glavna istraživanja na bakteriji *Bifidobacterium* kao prijenosniku gena rade u Kini i Japanu (Wei i sur. 2008a).

2.2. *Salmonella*

Salmonella su Gram-negativne, fakultativno anaerobne bakterije koje su uobičajeni uzročnik crijevnih infekcija. Bakterije roda *Salmonella* su također poznate po tome što naseljavaju ljudske tumore. No isto tako, zbog jake imunostimulacije njenim lipopolisaharidom i ostalim komponentama, sistemska infekcija salmonelom uzrokuje septični šok i veliku smrtnost u ljudi. Zato se za terapijske svrhe koriste genetski izmijenjeni sojevi. Pokazano je da je kod miša virulentnost smanjena primjenom nekih auktotrofnih mutanata. 1997. je zabilježeno da se *Salmonella* auktotrofi ubrizgani mišu s tumorom preferentno razmnožavaju u tumoru, te dosežu omjer veći od 1000:1 rasta u tumoru i normalnom tkivu. No taj omjer, iako velik, i dalje predstavlja opasnost od nuspojava. Također je pokazano da *Salmonella* inhibira metastaziranje melanoma što dovodi do značajnog smanjenja veličine i broja mikrometastaza (Pawelek i sur. 2003).

Da bi se smanjila opasnost od septičnog šoka uzokovanog lipopolisaharidom konstruirani su auktotrofni mutanti (*purI*⁻) *Salmonella* s modificiranim lipidom A (*msbB*⁻). Ti su mutanti pokazali promjenjenu toksičnost u mišu i svinji, uz koju se veže smanjena indukcija TNF α domaćina, no bez gubitka ciljnog napadanja tumora i terapijskog efekta u miša (Vassaux i sur. 2006).

Do sada su zabilježene dvije kliničke studije od nastanka modificirane salmonele kao sredstva za ciljanje tumora. Antitumorska aktivnost soja salmonele VNP20009 bila je testirana na psima sa spontanom neoplazijom. VNP20009 je genetski modificiran soj *S. typhimurium* koji sadrži smanjenu virulentnost (*purI*⁻) i potencijal za izazivanje septičkog šoka (*msbB*⁻) te osjetljivost na antibiotik. Intravenski unos VNP20009 u toksično prihvatljivim dozama pokazao je naseljavanje tumorskog tkiva i značajno antitumorsko djelovanje, uz potpun odgovor kod 4 od 41 tretirane životinje (Vassaux i sur. 2006). Isti je soj ubrizgan u 26 pacijenata koji su bolovali ili od metastaziranog melanoma ili od metastaziranog raka renalnih stanica. Pokazane su povećane razine proupalnih citokina u cirkulaciji ovisne o dozi bakterija no niti jedan pacijent nije pokazao regresiju tumora i samo su kod tri pacijenta tumori sadržavali vijabilne bakterije. Nesposobnost salmonele da potpuno kolonizira ljudske tumore bila je neočekivana, za razliku od opažanja kod mišjih modela gdje

je cijelo tumorsko tkivo bilo naseljeno. To ukazuje da se faktor odgovoran za naseljavanje tumora razlikuje od vrste do vrste i treba ga pažljivo odrediti (Wei i sur. 2008a).

Druga je studija koristila modificirani soj *Salmonella* koji je imao ekspresiju CD gena iz *E. coli*. Baterije su bile ubrizgane u tumore triju pacijenata s refraktornim rakom iza čega je slijedilo ubrizgavanje 5-FC. Nisu zabilježeni nikakvi nepovoljni događaji vezani uz terapiju. Kod dva je pacijenta bila dokazana kolonizacija tumora koja je trajala najmanje 15 dana od ubrizgavanja. U ta je dva pacijenta također dokazana konverzija 5-FC u 5-FU kao rezultat ekspresije CD. Ipak, niti jedna studija nije uspjela pokazati značajnu kliničku efikasnost, vjerojatno zbog slabog naseljavanja tumora (Wei i sur. 2008a). U novijem istraživanju konstruiran je novi derivat VNP20009 soja koji je nosio gen za fragment protutijela specifičan za antigen tumora CEA (carcinoembryonic antigen) kako bi se pojačalo specifično naseljavanje tumora. Pokazana je značajna ekspresija protutijela na površini bakterija te njihovo vezanje za CEA *in vivo* u modelu miša s tumorom probavnog trakta. CEA je jako izražen na stanicama mnogih ljudskih tumora kao što su onaj probavnog sustava, gušterače, pluća i dojke tako da predstavlja dobru metu liječenja (Bereta i sur. 2007).

Rađeni su i ekperimenti upotrebom bakterija *Salmonella* kao vektorom za izlučivanje citokina što je i isprobano u borbi protiv tumora. *Sallmonela* koja izlučuje IL-2 (soj GIDIL2) ispitivana je za antitumorsko djelovanje u modelnom mišu s melanomom B16. Pokazano je da je GIDIL2 zaustavio rast tumora i produljio vrijeme preživljavanja u odnosu na soj koji ne izlučuje IL-2. Pokazalo se da višekratno ubrizgavanje manjih doza daje bolji odgovor nego jednokratno ubrizgavanje velike doze. Antitumorski odgovor se povezuje sa sprječavanjem angiogeneze i povećanom nekrozom tumorskog tkiva (al-Ramadi i sur. 2009).

2.3. Clostridium

Treći tip bakterija proučavanih kao vektor za liječenje tumora su strogo anaerobne, sporogene, Gram-pozitivne bakterije roda *Clostridia*. Ovaj rod je jedan od većih, s oko 80 vrsta, od kojih je oko 10 proučavano. Kao strogo anaerobne bakterije sve su vrste za rast trebale anaerobno okruženje, ali su njihova osjetljivost na kisik i biokemijske karakteristike bile dosta različite od vrste do vrste. Spore klostridije su intravenoznim unosom korištene za induciranje lize tumora i pokazale su izrazite prednosti nad vrstama iz roda *Bifidobacterium* i *Salmonella* u vidu lagane proizvodnje, dobro podnošenje pohrane i zapanjujućeg onkolitičkog efekta. Za terapiju tumora testirane su i saharolitske i proteolitske vrste roda *Clostridia* (Wei i sur. 2008a).

Malmgren i Flanagan su pokazali da je miš s tumorom umro unutar 48h nakon intravenoznog unosa spora *C. tetani*, dok miševi bez tumora nisu imali nikakvih posljedica, što ukazuje na činjenicu da su spore proklijale samo u tumorima uz proizvodnju i otpuštanje toksina pogubnih za životinje. Möse and Möse su kasnije izvjestili da se nepatogeni soj *C. butyricum* M-55 lokalizira i klija u Ehrlich ascitesnim tumorima, uzrokujući jaku lizu bez popratnog utjecaja na normalno tkivo. Ta opažanja su potvrdili i proširili mnogi istraživači na modelnim tumorima u miševima, štakorima, hrčcima i zečevima nakon čega su uslijedile i kliničke studije na pacijentima oboljelim od raka kod kojih se kao posljedica pojavila samo slaba vrućica (Brown i sur. 2002). U jednom od tih pokušaja su spore *C. butyricum* M-55 nakon intrakarotidnog unosa uzrokovale da su se glioblastomi pretvorili u tekućinu. Onkoliza je bila očita i kod 49 ostalih pacijenata tretiranih na sličan način. No na stupanj ponovnog povratka tumora nije bilo utjecaja i kod niti jednog pacijenta nije opaženo produljenje života. To se opažanje pripisuje činjenici da iako rast bakterija uzrokuje uništenje velikog dijela tumora, rubni viabilni dijelovi tumora ostaju netaknuti i iz njih tumor ponovno izraste (Wei i sur. 2008a).

Grupa pod vodstvom Vogelstein-a je 2001. usporedila 26 najčešće upotrebljivanih vrsta anaerobnih bakterija iz rodova *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* i *Clostridium* na ksenograftima kolorektalnog karcinoma i došli su do zaključka da dva soja divljeg tipa *C. novyi* i *C. sordellii* – imaju bolje djelovanje od ostalih zato što su vrlo pokretni unutar tumora i jako osjetljivi na kisik. No, unatoč odličnom naseljavanju i širenju unutar tumora, ovi sojevi su pokazali i veliku toksičnost, tako što je umrlo 40% životinja kojima su ubrizgane spore. Pošto se gen za letalan toksin (α) *C. novyi* nalazi na fagu, on je zagrijavanjem uklonjen iz bakterije i tako je dobiven genetski modificiran i nepatogen soj *C. novyi-NT*. Spore *C. novyi-NT* kod intravenoznog ili intratumoralnog unosa nisu pokazale dovoljnu kontrolu nad razaranjem tumora, ostavljajući netaknutim vijabilni vanjski dio tumorskih stanica kao i *C. butyricum* M-55 (Wei i sur. 2007).

Tako je za efektivnu borbu protiv unutanjeg i vanjskog dijela tumora predložena kombinirana bakteriolička terapija COBALT (engl. combination bacteriolytic therapy) u kojoj se tretman bakterijama *C. novyi* kombinirao s uobičajenim kemoterapeutcima. Drastičan antitumorski efekt bio je nažalost popraćen jakom sistemskom toksičnošću u pokusnim životinjama, utoliko da je toksičnost bila veća što je bio veći tumor. To se objašnjava izlaženjem toksičnih produkta iz tumora ili kao posljedicom „sindroma lize tumora“. Također je opaženo da nisu svi oblici tumora jednako osjetljivi na COBALT (Van Mellaert i sur. 2006). U nastojanju da se smanji opažena toksičnost počela se kombinirati

bakterijska terapija s kemoterapeuticima koji utječu na mikrotubule, kao što su vinorelbin i docetaxel, te su dobiveni vrlo obećavajući rezultati. U tijeku je prva faza testiranja kombinirane terapije na pacijentima (Wei i sur. 2008a).

Napredak tehnologije rekombinantne DNA pobudio je ponovno zanimanje za ovo područje stvaranjem mogućnosti za genetičko poboljšanje onkolitičkih sposobnosti klostridije. Krenulo se s nekoliko strategija: genetsko modificiranje sojeva za ekspresiju enzima koji bi aktivirali spojeve u toksične lijekove, neke druge terapijske proteine ili citokine (Wei i sur. 2008). Pošto nisu postojali protokoli za transformaciju bakterije *C. sporogenes* (drugi naziv za *C. butyricum* M-55 ili *C. oncolyticum*), za prijenos proteina kao vektori prve su upotrebene saharolitske bakterije koje su se mogle efikasno transformirati nakon što je pokazano da mogu naseljavati tumore. Kod svih saharolitskih sojeva zapažena je aktivnost umetnutog enzima u tumoru nakon intravenoznog unosa spora no nakon sistemskog unosa neaktivnog lijeka nije opažena očekivana antitumorska aktivnost. Pretpostavlja se da je razlog tome nedovoljno naseljavanje tumora te stoga premale količine aktivnog lijeka. Doista, pokazano je da je stupanj naseljavanja saharolitskih *Clostridia* 1000 puta manji u odnosu na proteolitske *C. sporogenes* (Wei i sur. 2008a).

Veća sposobnost *C. sporogenes* da naseljava tumore navela je znanstvenike da pronađu učinkovit način transformacije tih bakterija. Zabilježena je uspješna transformacija *C. sporogenes* plazmidom koji je na sebi nosio gen za CD, metodom izmjenjene elektroporacije (u pufer dodani inhibitori DNAaza) no dobivena frekvencija transformacije je bila jako mala (Liu i sur. 2002). Do veće frekvencije transformacije došlo se korištenjem konjugacije uz *E. coli* kao donora. Transformacija konjugacijom je bila učinkovita no nije se nastavila pomno istraživati i tek je nedavno prvi puta opisan standardiziran način konstrukcije prijenosnog plazmida za konjugaciju *E. coli* – *Clostridium* (Minton i sur. 2009).

3. USPOREDBA BAKTERIJSKIH S VIRUSNIM VEKTORIMA – prednosti *Clostridia*

U istraživanjima vektora za ciljan prijenos gena direktno u tumor uz bakterije se koriste još samo virusi. Misao o upotrebi virusa za borbu protiv tumora potječe još s početka 20. stoljeća. Između 1950. i 1960. nekoliko je virusa bilo testirano u eksperimentalnim uvjetima i na ljudima. Iako su ta istraživanja bila inovativna i dala prve naznake potencijala za liječenje ljudi, efikasnost viroterapije nije bila značajna ili su virusi nakon primjene pokazali nuspojave što je na kraju dovelo do prestanka testiranja te se u sljedećim desetljećima smanjio broj radova na tu temu. Kasnije, 90-tih godina, razvojem moderne biotehnologije i koncepta genske terapije, ponovno je pobuđen interes za viruse u terapiji tumora i danas se viroterapija potvrđuje kao korisna terapija uz operaciju, kemo- i radioterapiju (Vähä-Koskela i sur. 2007).

O sigurnosti se uvijek najviše treba brinuti kada se genskoj terapiji ljudi koriste živi vektori. Od raznih terapijskih sustava koji koriste viruse, najviše obećava terapija viralnim vektorom koji ima sposobnost replikacije. No kod korištenja virusnih vektora još postoje neke nedoumice što se tiče sigurnosti, da li su vektori dovoljno usmjereni na sam tumor, da li niske razine ekspresije virusnih gena vektora mogu dovesti do povećane toksičnosti i imunogenosti i da li se virusne čestice zadržavaju u ciljnom tkivu ili se izlučuju u tjelesne tekućine kao što je urin što može dovesti do širenja u okoliš. Po tim pitanjima smatra se da su vektori bazirani na sporama klostridije sigurniji od virusnih vektora. *Clostridia* su strogo anaerobne bakterije koje ciljano napadaju tumor i ne bi mogle živjeti u nehipoksičnom okolišu. Nedavni eksperiment s *C. novyi* je pokazao da taj soj bakterija ne može naseliti umjetno stvoreno srce nakon infarkta gdje je razina hipoksije bila nedovoljna da podrži razmnožavanje klostridija. Kod malo vjerojatnih nuspojava klostridija može biti odstranjena iz krvi pomoću široko dostupnih lijekova kao što je metronidazol koji može ukloniti spore iz krvi u roku 9 dana (Wei i sur. 2008b).

Hipoksične, apoptotične i mirujuće stanice su otporne na ulazak i replikaciju virusa što predstavlja velik problem terapiji virusnim vektorima jer vektor ne može djelovati i unjeti terapijski gen. Posljedica toga je da većina tumorske mase ostaje netaknuta s mogućnošću ponovnog rasta. S druge strane, spore klostridije su sposobne naseliti se u svim tim okolišnim nišama jer im njihove jedinstvene metaboličke potrebe omogućuju da iskoriste posebne uvjete unutar tumora i pripadajućih tkiva za vlastitu proliferaciju (Wei i sur. 2008b).

Svi sustavi virusnih vektora trebaju sofisticirane kulture stanica, skupe medije, niz filtracija i pročišćavanja, pažljivo centrifugiranje i skladištenje. Spore klostridije se mogu jednostavno i jeftino proizvesti iz kultura anaerobnih bakterija. Potrebno je samo nekoliko koraka za pripremu i dobivene se spore mogu čuvati na sobnoj temperaturi najmanje 3-6 mjeseci (Wei i sur. 2008b).

Većinu virusnih vektora treba ubrizgati direktno u tumor da bi pokazali efekt. To je daleko od idealnog pošto je većina tumora nedostupna i šire se kroz tijelo tako da ih je teško otkriti i liječiti. Intravenski unos suspenzije spora klostridije je moguć i dovoljan da dođu do tumora i kroz nedovršene žile uđu u njega. Na taj način specifično cilja i naseljava hipoksične regije tumora (Wei i sur. 2008b).

Čvrsti tumori se ne sastoje samo od malignih stanica, već i od ekstracelularnog matriksa i drugih ne malignih stanica kao što su fibroblasti, stanice endotela i upalne stanice. Vektorske klostridije ubijaju tumor pomoću transgena koji kodira za neki enzim ili citokin, što je isto kao i mehanizam virusnih vektora. No jedinstven antitumorski efekt klostridija je posljedica stvaranja hidrolitičkih enzima kao što su proteaze, lipaze i nukleaze. Također postoji natjecanje za iskorištavanje nutrijenata u kojem pobjeđuje klostridija jer se brže dijeli od okolnih stanica tumora koje na taj način izgladni i ubije. To su karakteristike koje nemaju viralni vektori kao ni bilo koji drugi oblik terapije tumora (Wei i sur. 2008b).

Viralni vektori trebaju pristup vijabilnim stanicama i njihovim staničnim mašinerijama da bi postigli prijenos i ekspresiju transgena no nisu sve stanice vijabilne u vrijeme unosa gena. Također, ni jedan postojeći vektorski sustav ne može efikasno transformirati sve tumorske stanice što ostavlja prostora za ponovni rast tumora. Replikacija klostridija nije ovisna o tumorskim stanicama i odvija se ekstracelularnim umnožavanjem bakterija. Isto tako, klostridije ubijaju stanice tumora bez potrebe prijenosa gena i umetanja u genom domaćina što uklanja mogućnost insercijske mutageneze kod korištenja klostridije (Wei i sur. 2008b).

Jedno od glavnih ograničenja viralnih vektora su mali virioni, koji dopuštaju pakiranje samo malih egzogenih DNA. No za klostridiju su ograničenja veličine daleko manja, ne samo jer plazmidi mogu nositi mnogo veće fragmente DNA, nego ako se strani gen ugradi u kromosom postoji zapravo neograničena mogućnost insercija terapijskih gena, što navješta obećavajuću budućnost razvoju snažnih vektora (Wei i sur. 2008b).

4. LITERATURA

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., 2008. Molecular Biology of the Cell, 5th Edition. Garland Sciences, New York, NY
- al-Ramadi B.K., Fernandez-Cabezudo M.J., El-Hasasna H., Al-Salam S., Bashir G., Chouaib S., 2009. Potent anti-tumor activity of systemically-administered IL2-expressing *Salmonella* correlates with decreased angiogenesis and enhanced tumor apoptosis. *Clinical Immunology* **130**, 89-97
- Anderson J.C., Clarke E.J., Arkin A.P., Voigt C.A., 2006. Environmentally Controlled Invasion of Cancer Cells by Engineered Bacteria. *JMB* **355**, 619-627
- Bereta M., Hayhurst A., Gajda M., Chorobik P., Targosz M., Marcinkiewicz J., Kaufman H.L., 2007. Improving tumor targeting and therapeutic potential of *Salmonella* VNP20009 by displaying cell surface CEA-specific antibodies. *Vaccine* **25**, 4183-4192
- Brown J.M., Liu S.-C., Minton N.P., Giaccia A.J., 2002. Anticancer efficacy of systemically delivered anaerobic bacteria as gene therapy vectors targeting tumor hypoxia/necrosis. *Gene Therapy* **9**, 291-296
- Cooper G.M., 2000. The Cell: A Molecular Approach, Second Edition. ASM Press, Washington, DC i Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Forbes N.S., St Jean A.T., Zhang M., 2008. Bacterial therapies: completing the cancer treatment toolbox. *Current Opinion in Biotechnology* **19**, 511-517
- Fujimori M., 2006. Genetically Engineered *Bifidobacterium* as a Drug Delivery System for Systemic Therapy of Metastatic Breast Cancer Patients. *Breast Cancer* **13**, 27-31
- Minton N.P., Heap J.T., Pennington O.J., Cartman S.T., 2009. A modular system for Clostridium shuttle plasmids. *Journal of Microbiological Methods* **78**, 79-85
- Pawelek J.M., Brooks Low K., Bermudes D. 2003. Bacteria as tumour-targeting vectors. *The Lancet Oncology*, **4**, 548-556
- Sangrador-Vegas A., Stanton C., van Sinderen D., Fitzgerald G.F., Ross R.P., 2007. Characterization of plasmid pASV479 from *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* and its use for expression vector construction. *Plasmid* **58**, 140-147
- Shkoporov A.N., Efimov B.A., Khokhlova E.V., Steele J.L., Kafarskaia L.I., Smeianov V.V., 2008. Characterization of plasmids from human infant *Bifidobacterium* strains: Sequence analysis and construction of *E. coli*-*Bifidobacterium* shuttle vectors. *Plasmid* **60**, 136-148

- Vähä-Koskela M.J.V., Heikkilä J.E., Hinkkanen A.E., 2007. Oncolytic viruses in cancer therapy. *Cancer Letters* **254**, 178–216
- Van Mellaert L., Barbé S., Anné J., 2006. *Clostridium* spores as anti-tumour agents. *TRENDS in Microbiology* **14**, 190-196
- Wei M. Q., Ellem K. A.O., Dunn P., West M. J., Bai C. X., Vogelstein B., 2007. Facultative or obligate anaerobic bacteria have the potential for multimodality therapy of solid tumours. *European Journal of Cancer* **43**, 490-496
- Wei M.Q., Mengesha A., Good D., Anné J., 2008.a Bacterial targeted tumour therapy-dawn of a new era. *Cancer Letters* **259**, 16-27
- Wei M.Q., Ren R., Good D., Anné J., 2008.b Clostridial spores as live 'Trojan horse' vectors for cancer gene therapy: comparison with viral delivery systems. *Genetic Vaccines and Therapy* **6**, (u ovom radu nije označen broj stranica)
- Yazawa K., Fujimori M., Amano J., Kano Y., Taniguchi S., 2000. Bifidobacterium longum as a delivery system for cancer gene therapy: Selective localization and growth in hypoxic tumors. *Cancer Gene Therapy* **7**, 269-274

5. SAŽETAK

U današnje vrijeme tumor je jedan od najčešćih i najraširenijih uzročnika smrti u ljudi. Velikim povećanjem broja oboljelih došlo je i do većeg interesa znanstvenika za razvoj efikasnijih načina liječenja tumora od dugo primjenjivanih radio- i kemoterapije. Povoljno djelovanje nekih bakterijskih bolesti na regresiju tumora bilo je poznato već nekoliko stoljeća, no tek je razvojem genetičkog inženjstva ponovno pobuđen interes za bakterije, ovaj puta kao vektore za ciljano liječenje tumora.

U ovom radu su predstavljena tri soja bakterija na kojima je rađen najveći broj istraživanja: *Bifidobacterium*, *Salmonella* i *Clostridium*. Svaki soj ima svoje prednosti i nedostatke, ali za sada najviše obećava soj bakterija *Clostridium*, najviše zbog svoje izrazite anaerobnosti, velike efikasnosti naseljavanja tumora i mogućnosti stvaranja spora. U bakterije se ugrađuju geni za enzime koji će u samom tumoru pretvarati lijekove u aktivan oblik i time smanjiti njihovu sistemsku toksičnost.

Do sada su se bakterije pokazale kao učinkovitiji i sigurniji vektori za liječenje tumora u odnosu na virusne vektore. Unatoč uspjehu modelnih pokusa potrebno je još mnogo testiranja i istraživanja prije nego bakterijski vektori prođu sve faze kliničkih studija i uđu u široku upotrebu, no mogli bi značiti prekretnicu u liječenju ne samo tumora nego i ostalih bolesti nedostupnih uobičajenim terapijama.

6. SUMMARY

Tumour is one of the most common and the most widely spread cause of death in humans in the modern world. Scientists became more interested in finding a more effective tumour treatment than those commonly used, such as radio- and chemotherapy, with the increase in the number of tumour patients. Although the beneficial effect of some bacterial infections on tumour regression was observed a few centuries ago, the interest in bacteria arose once again with the development of genetic engineering, which led to the use of bacteria as vectors for targeted tumour treatment.

Most researches were performed on three genera of bacteria: *Bifidobacterium*, *Salmonella* and *Clostridium*, which are presented in this work. All of these genera have their advantages and disadvantages but the most promising seems to be *Clostridium* because they are strictly anaerobic, spore forming bacteria with a great capacity to colonize tumours. Bacteria were engineered to express prodrug activating enzyme inside the tumour, thus lowering systemic toxicity induced by the activated prodrug.

Engineered bacteria have been shown to serve as a more efficient and safer vector for tumour treatment than the viral vectors. Although bacterial vectors have been shown to be successful in many tumour models, further experiments and researches are necessary for completing all clinical trials and entering a wide use in treating tumour patients. However, bacterial vectors could be a turning point in tumour treatment as well as for other diseases unreachable to conventional therapies.