

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

UPOTREBA SINTETSKIH BAKTERIJA U LIJEČENJU
TUMORA

USAGE OF SYNTHETIC BACTERIA IN TUMOR
TREATMENTS

SEMINARSKI RAD

Nika Foglar

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić-Baće

Zagreb, 2017.

SADRŽAJ

Sadržaj

1.	UVOD	3
2.	TUMORI KAO MJESTA RAZMNOŽAVANJA BAKTERIJA.....	4
2.1.	Rod <i>Salmonella</i>	5
2.2.	Rod <i>Clostridium</i>	5
2.3.	Rod <i>Escherichia</i>	6
3.	GENETIČKO MODIFICIRANJE BAKTERIJA.....	7
3.1.	Bakterijska sinteza antitumorskih lijekova.....	7
3.2.	Uspostavljanje sinkroniziranog ciklusa lize bakterija	9
4.	KOMBINIRANJE TERAPIJA	13
5.	LITERATURA	14
6.	SAŽETAK.....	16
7.	SUMMARY	16

1. UVOD

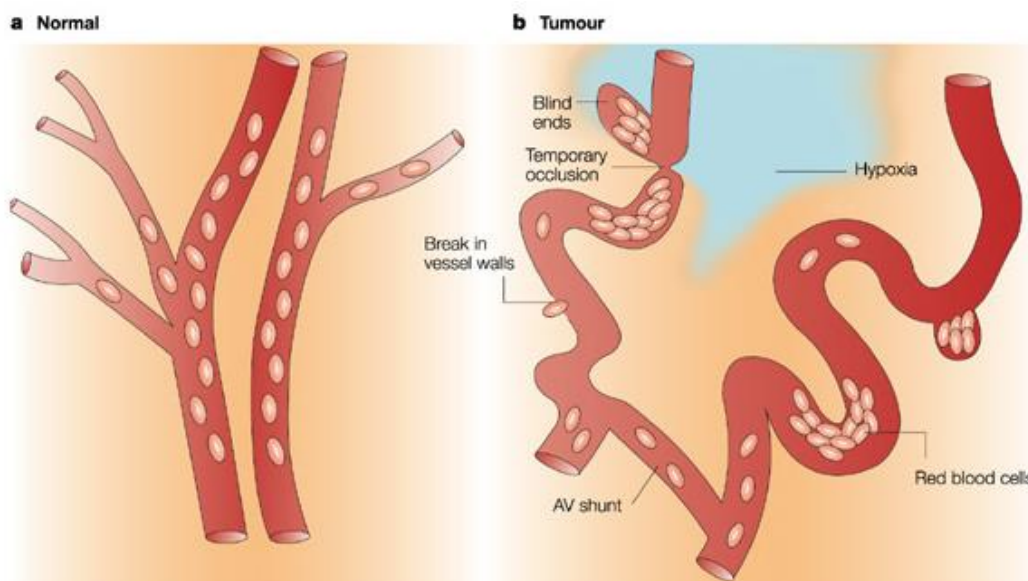
Korištenje bakterija u liječenju tumora ima početak još u starom Egiptu. 2600 BC liječnik Imphotep je povezoao infekciju s liječenjem takozvanih oteklina, koje su najvjerojatnije bile tumorsko tkivo (Ebbell 1937). Tijekom povijesti je bilo još sličnih zabilježenih slučajeva i nekontroliranih testiranja među kojima je prvo bilo provedeno 1863. u Berlinu. W. Busch je namjerno zarazio pacijenticu koja je bolovala od raka sa bakterijom *Streptococcus pyogenes*. Zabilježeno je nazadovanje tumora, no pacijentica je umrla od infekcije (Felgner et al. 2016).

Prvi liječnik koji je koristio bakterije u liječenju tumora bio je William Coley. Potaknut prethodnim istraživanjima osmislio je tretman nazvan „Coley-ev toksin“ koji se sastojao od toplinom inaktivirane bakterije *Streptococcus pyogenes* i bakterije *Serratia marcescens*. Tretman se pokazao izrazito uspješnim za liječenje sarkoma, njime je izliječio preko 1000 pacijenata. Najbolji rezultati dobiveni su na sarkomima kostiju i mekog tkiva, dok je puno slabiji rezultat zabilježen prilikom tretiranja karcinoma i melanoma. Usprkos njegovim postignućima mnogi liječnici nisu vjerovali njegovim rezultatima, te je razvitkom kemoterapije i radioterapije „Coley-ev toksin“ izašao iz uporabe, a njegova istraživanja zaboravljena (McCarthy 2006).

Napretkom tehnologije ponovo je oživjelo korištenje bakterija u liječenju tumora. Danas se provode različita istraživanja sa sintetskim bakterijama i njihovom primjenom u liječenju tumora. Potencijalno predstavljaju idealni lijek koji može uništiti tumorske stanice bez oštećenja normalnog tkiva zbog prirodene tendencije naseljavanja i razmnožavanja u tumorskom tkivu i mogućnosti genetičke manipulacije. Mogu se koristiti kao alat koji sintetizira lijekove i lizom ih oslobađa u tkiva, aktivira imunološki sustav domaćina ili pokreće apoptozu tumorskih stanica.

2. TUMORI KAO MJESTA RAZMNOŽAVANJA BAKTERIJA

Tumorska tkiva pogodna su mjesta za razmnožavanje bakterija iz više razloga. Proliferacija tumorskih stanica dovodi do velike potrošnje kisika, a zbog brzog rasta dolazi do nedostatne opskrbe tkiva krvlju te se stvaraju hipoksični uvjeti koji pogoduju razvoju bakterija. U središtima čvrstih tumora zbog hipoksije dolazi do odumiranja stanica i stvaranja nekrotičnih centara koji bakterije opskrbljuju hranjivim tvarima poput purina. Također se predlaže da nekrotični dijelovi otpuštaju kemoatraktante koji kemotaktički privlače bakterije na mjesto tumora. Primjerice, receptor TRG potiče kretanje prema ribози u nekrotičnom tkivu, dok se iz živih tumorskih stanica detektira izlučen aspartat pomoću receptora TAR (Forbes 2010). Uzrok hipoksije je i neovaskularizacija koja se odvija sporije od rasta tumora i dovodi do neuređenih krvnih žila sa propusnim stjenkama i usporenim krvotokom što omogućuje ulazak bakterija u tumorsko tkivo (slika 1) (Baban et al. 2010). U tumorskim tkivima također dolazi do lokalne imunosupresije što omogućuje replikaciju bakterija koja nije nazadovana djelovanjem makrofaga i neutrofila (Forbes 2010). Prva bakterija povezana sa supresijom tumora je iz roda *Clostridium*, kada je primijećena regresija tumora u pacijenata oboljelih od plinske gangrene uzrokovane bakterijom *C. perfringens*. Osim roda *Clostridium*, nađeno je da tumorska tkiva preferencijalno naseljavaju i drugi bakterijski rodovi poput *Bifidobacterium*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Vibrio cholerae* and *Listeria monocytogenes*. U istraživanjima se najviše koriste rodovi *Clostridium* i *Salmonella* te modificirana *E. coli* (Baban et al. 2010).



Slika 1. Shematski prikaz normalnih krvnih žila (lijevo) i krvnih žila tumora (desno) koje su često široke, sa mnogo zavoja i slijepih krajeva, imaju usporeni krvotok i međusobno su često udaljene što dovodi do kronične hipoksije dijelova tkiva (preuzeto iz Brown et al. 2004).

2.1. Rod *Salmonella*

Bakterije roda *Salmonella* su fakultativni anaerobi, što im omogućuje rast u aerobnim i anaerobnim uvjetima kakve nalazimo u čvrstim tumorima i metastazama. Ove bakterije preferencijalno rastu u čvrstim tumorima u omjeru većem od 1000/1 u usporedbi s normalnim tkivom (Camacho et al. 2016). Akumuliranje divljeg tipa te bakterije dovodi do inhibicije rasta tumora, no toksičnost uzrokuje smrt. Atenuirani oblik bakterije zadržava specifičnost razmnožavanja i akumulacije u tumoru sa ograničenom patogenošću (Pawelek et al. 1997). Bakterije roda *Salmonella* mogu putovati do mjesta tumora udaljenog od mjesta inokulacije i tamo se razmnožavati, a dodatna genetička modifikacija omogućuje uvođenje novih svojstava poput ekspresije gena koji kodiraju za tumorske toksine.

2.2. Rod *Clostridium*

Rod *Clostridium* je jedan od najvećih rodova prokariota sa više od 130 Gram pozitivnih vrsta. Obligatni su anaerobi sposobni stvarati spore u nepovoljnim uvjetima. Manjina patogenih vrsta je dobro poznata, no za istraživanja liječenja tumora bitnije su nepatogene vrste. Važno svojstvo ove bakterije je sposobnost prodiranja i razmnožavanja endospora u hipoksičnim i nekrotičnim dijelovima tumorskog tkiva. Također mogu biti

genetički modificirane za proizvodnju terapijskih proteina poput citozin deaminaze ili TNF- α (Nuyts et al. 2002).

2.3. Rod *Escherichia*

Escherichia coli je jedan od najistraživanijih i najbolje opisanih organizama, te stoga pogodna za korištenje u istraživanju liječenja tumora. Kao i drugi rodovi, soj *E. coli* K-12 kolonizira hipoksična i nekrotična tkiva tumora (Jiang et al. 2010), njen genom je sekvenciran i omogućuje genetičku manipulaciju koja pospješuje lokalizaciju bakterija, praćenje razvoja i otpuštanje lijekova u tumorsko tkivo (Min et al. 2008).

3. GENETIČKO MODIFICIRANJE BAKTERIJA

Iako neke bakterije imaju intrinzičnu sposobnost regresije tumora, njihova patogenost i toksini oštećuju zdravo tkivo domaćina, dovode do nekroze tkiva i smrti. Razvojem genetičkog inženjerstva postalo je moguće ukloniti patogena svojstva, kontrolirati razmnožavanje bakterija te dodati nove osobine za bolju lokalizaciju unutar tumora i proizvodnju lijekova. Postoji mnogo proteinskih lijekova koji su vrlo efektivni protiv linija tumorskih stanica, no velik problem predstavlja selektivno dopremanje lijekova do tumorskog tkiva. Kod većih tumorskih masa dolazi do neefektivne penetracije lijeka zbog slabe prokrvljenosti (Kubiak and Minton 2015). Bakterije mogu poslužiti kao transporteri koji te lijekove mogu dopremiti duboko u hipoksične dijelove tumora do kojih ti proteini inače ne bi mogli doprijeti.

3.1. Bakterijska sinteza antitumorskih lijekova

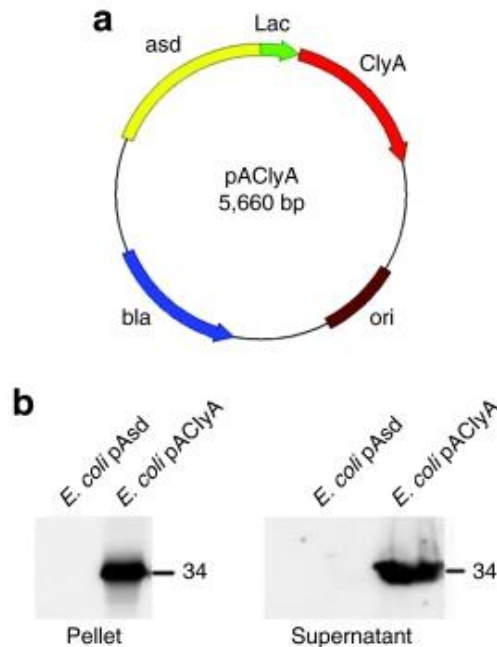
Najčešće su istraživane četiri skupine antitumorskih lijekova, toksini, citokinini, antigeni (tablica 1) i prolijekovi.

Tablica 1. Najčešći antitumorski lijekovi ugrađivani u bakterije (Preuzeto i prilagođeno iz Forbes 2010).

A. eksprimirani antitumorski agensi		
<i>Citotoksični spojevi</i>	<i>citokinini</i>	<i>Antigeni i protutijela</i>
Cytolysin A (ClyA, HlyE)	CCL21	C-Raf
Ligand Fas	Interleukin 2 (IL-2)	fuzijski protein CtxB-PSA
TNF α	Interleukin 18 (IL-18)	fuzijski protein CPV-OmpA
TRAIL	LIGHT	tumorski antigen NY-ESO-1
		jednolančana HIF-1 α protutijela

Bakterijski toksini su najjednostavniji za upotrebu jer su prirodni bakterijama i sekvencirani. Hemolizin E ili citolizin A je jedan takav antitumorski toksin kodiran genom *hlyE* iz *E. coli*. On formira pore na površini tumorskih stanica u sisavaca i uzrokuje apoptozu (Din et al. 2016). Ugrađen u *E. coli* K-12 transportira se na površinu bakterije i izlučuje bez

post-translacijske obrade (slika 2). Kombiniran s terapijom zračenjem uzrokuje značajno smanjenje tumora jer uništava stanice koje se nalaze u hipoksičnim dijelovima tumora koji su otporni na terapiju zračenjem (Jiang et al. 2010).



Slika 2. a) Karta bakterijskog plazmida s genima za citolizin A i aspartat β -semialdehid dehidrogenazu (*asd*) ugrađenog u *E. coli* K-12 *asd* mutanta (soj HJ1020). Taj mutant se u odsutnosti gena *asd* lizira te se time osigurava zadržavanje plazmida *in vivo*. b) Analiza ekspresije i izlučivanja ClyA u talogu i supernatantu bakterija koje sadrže ugrađeni plazmid pAClyA i plazmid koji sadrži samo gen *asd* western blot analizom. Korištena su anti-ClyA protutijela (preuzeto iz Jiang et al. 2010).

Citotoksično djelovanje na tumore imaju i tri člana proteinske TNF α obitelji: ligand FAS, TNF α i TRIAL (od engleski TNF-related apoptosis-inducing ligand). Oni uzrokuju smrt stanice vezanjem na receptore koji aktiviraju proteolitičke enzime kaspaze koje zatim razgrađuju staničnu strukturu i DNA te uzrokuju smrt stanice. Ovi proteini su selektivno citotoksični samo za tumorske stanice (Forbes 2010).

Citokinini se koriste kako bi se stimuliralo uklanjanje tumora imunološkim sustavom domaćina. U bakterije se ugradi gen za određeni citokinin, među kojima su najčešći IL2 i IL18, koji se izlučuju i pokreću nekoliko mehanizama imunološkog sustava poput aktivacije NK stanica i limfocita te poticanja njihove proliferacije.

Imunološki sustav može postati tolerantan prema tumorskim stanicama, omogućujući im nekontrolirani rast. Stoga se, osim citokinima, imunološki sustav može aktivirati i prezentiranjem određenih antigena na površini bakterijskih stanica. Takve bakterije senzibiliziraju stanice imunološkog sustava na tumorske antigene i sprječava se stvaranje tumora s tim antigenima na površini (Forbes 2010).

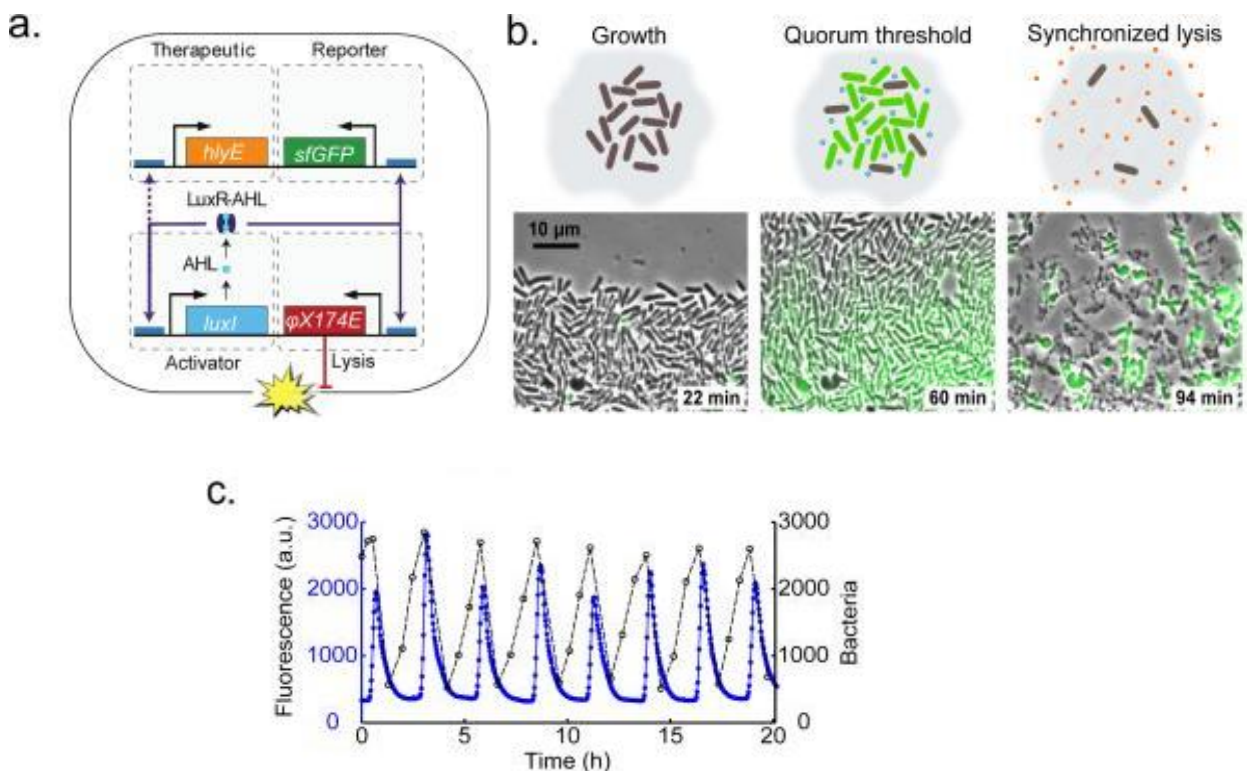
Prolijek je spoj koji se nakon ulaska u organizam mora metabolički obraditi kako bi prešao u aktivni oblik. Enzim koji ga aktivira može se ugraditi u bakterije koje specifično naseljavaju tumorsko tkivo. Na tome se temelji CDEPT (od engleski Clostridium directed enzyme prodrug therapy). U kliničkim studijama koristila se *C. sporogenes*, preimenovana u *C. oncolyticum*, genetički modificirana da proizvodi enzim citozin deaminazu iz *E. coli* koji može pretvoriti 5-fluorocitozin u toksični protutumorski lijek 5-fluorouracil. Ova bakterija naseljava hipoksična i nekrotična tkiva tumora daleko od krvnih žila i time minimalizira djelovanje toksičnog spoja na normalno tkivo (Liu et al. 2002). Postoji više prolijek-enzim kombinacija, primjerice timidin kinaza iz virusa Herpes Simplex i prolijek ganciclovir ili purinska nukleozidna fosforilaza, produkt gena *deoD* iz *E. coli* koji katalizira cijepanje N-glikozidne veze ribo- i deoksiribonukleotida koristeći ortofosfat i stvarajući dva produkta, purinsku bazu i riboza/deoksiriboza-1-fosfat (Lehouritis et al. 2013).

3.2. Uspostavljanje sinkroniziranog ciklusa lize bakterija

Bakterije koje proizvode antitumorske lijekove prethodno opisane moraju imati mehanizme otpuštanja tih tvari u okolinu. Ako se neka tvar ne može aktivno izlučiti iz bakterije ili se izlučuje u premalim količinama, oslabljuje se njeno djelovanje na tumorsko tkivo. Kako bi se riješio taj problem i omogućilo oslobađanje lijekova u većim količinama, te kako bi se kontrolirala populacija bakterija u tkivu, napravljen je soj bakterija koji ulazi u sinkronu lizu nakon što postigne određenu gustoću populacije.

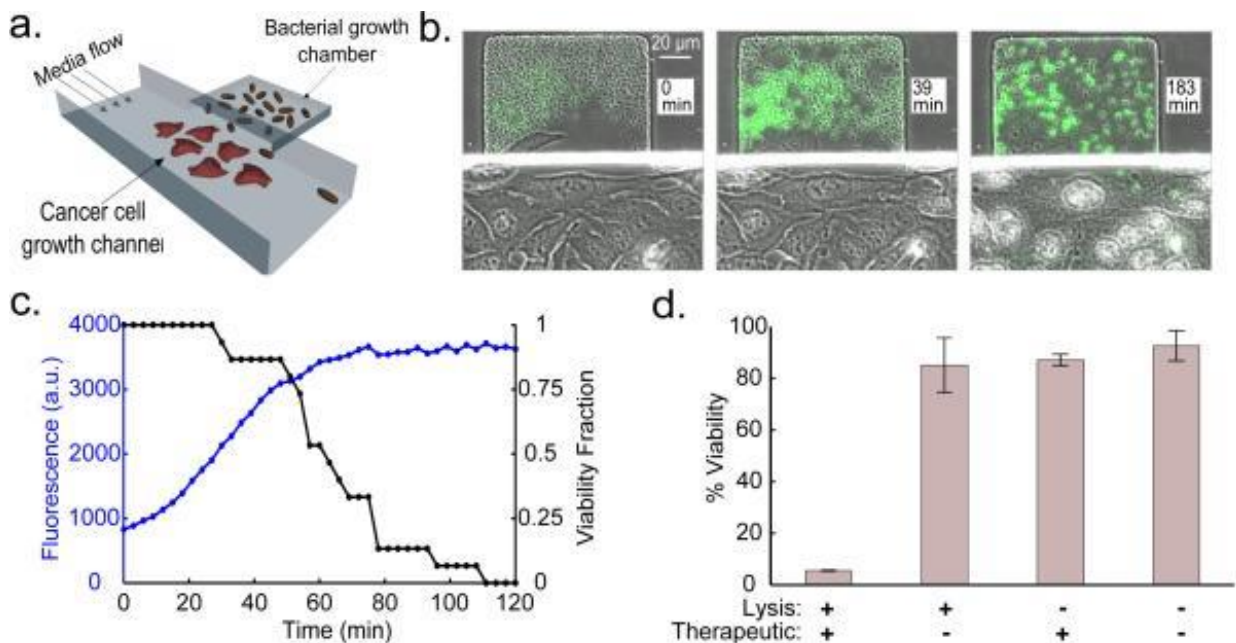
Sinkronizirani ciklus lize (SLC) sastavljen je od zajedničkog promotora *luxI*, koji potiče ekspresiju vlastitog aktivatora i gena za lizu. Autoinduktor AHL djeluje na temelju pozitivne povratne sprege, veže se za LuxR koji onda transkripcijski aktivira promotor *luxI* te dovodi do pojačane sinteze AHL-a, male signalne molekule koja može difundirati u susjedne stanice i time sinkronizirati bakterijsku populaciju. Kad koncentracija AHL-a poraste na graničnu, promotor potiče ekspresiju gena za lizu E iz bakteriofaga ϕ X174 i negativnom

povratnom spregom održava populaciju bakterija konstantnom. Zajedno sa genom za lizu E, promotor *luxI* pokreće transkripciju gena *sfGFP* ili *luxCDABE* koji služe kao reporterske molekule. Gen za Hemolizin E se nalazi pod promotorom *luxI* ili *tac*, a LuxR je pod nativnim promotorom *luxR* (slika 3. a). Razmnožavanje bakterija i proizvodnja te otpuštanje signalne molekule AHL u okolinu dovodi do postepenog povećanja koncentracije AHL. Kada koncentracija dođe do granične, bakterije se liziraju i otpuštaju sintetizirani Hemolizin E u okolinu. Preživjela frakcija bakterija ponovno se počinje razmnožavati i stvarati signalne molekule te se ciklus ponavlja. Otpuštanje bakterijskog sadržaja i time liza potvrđena je praćenjem fluorescencije *sfGFP* (slika 3. b), a praćenjem porasta fluorescencije u vremenu potvrđena je periodičnost lize bakterijske populacije (slika 3. c) (Din et al. 2016).



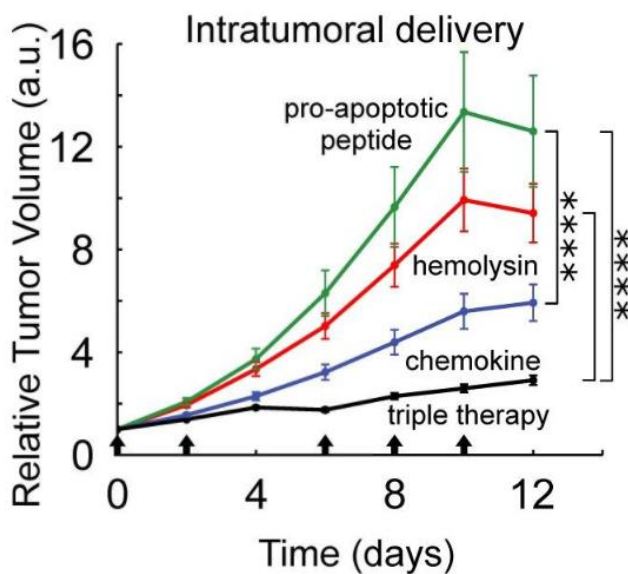
Slika 3. a) Shematski prikaz sinkroniziranog ciklusa lize, koji sadrži aktivator i plazmid za lizu. b) Shematski su prikazane tri glavne faze cikličke lize, razmnožavanje bakterija i stvaranje aktivatora, postizanje granične koncentracije aktivatora te aktivacija gena za lizu i gena *sfGFP* i sinkronizirana liza stanica. Ispod shema su slike stanica sa ugrađenim SLC kako prolaze kroz nabrojene faze ciklusa na mikrofluidnoj pločici. c) Graf prikazuje promjenu u fluorescenciji i broju bakterija kroz vrijeme što pokazuje da se događaj lize odgovara trenutku maksimuma fluorescencije (preuzeto iz Din et al. 2016).

Kako bi se dokazalo da dolazi do otpuštanja dovoljne količine toksina HlyE potrebne za ubijanje tumorskih stanica, SLC je ugrađen u *S. Typhimurium* i uzgojen u ko-kulturi sa stanicama humanog tumora grlića maternice HeLa na mikrofluidnom čipu (slika 4. a). Primijećeno je odumiranje HeLa stanica nakon lize bakterijskih stanica, koja se pratila porastom u fluorescenciji (slika 4. b, c). Također, kulture HeLa stanica su se izložile supernatantima iz kulture SLC bakterija sa genom *HlyE*, bez gena *HlyE*, te kulturama bez SLC, sa i bez gena *HlyE* (slika 4. d). Mjerenjem vijabilnosti stanica potvrđeno je da samo SLC soj koji proizvodi HlyE dovodi do gubitka vitalnosti HeLa stanica, dok je soj koji proizvodi HlyE bez lize samo djelomično utjecao na kulturu stanica (~ 15%) (Din et al. 2016).



Slika 4. a) Shematski prikaz ko-kulture stanica raka i bakterija na mikrofluidnoj pločici sa vrlo slabim protokom medija koji omogućava vezanje stanica raka na podlogu i difuziju bakterija nakon otpuštanja iz komore za rast. b) Slike prikazuju vremenski period kroz koji dolazi do lize *S. typhimurium* popraćene zelenom fluorescencijom u ko-kulturi i smrt HeLa stanica. c) Praćenje promjene fluorescencije i vijabilne frakcije HeLa stanica (broj živih stanica / broj mrtvih stanica) u vremenu. d) Mjerenje vijabilnosti HeLa stanica izloženih supernatantima redom bakterija koje sadrže SLC + HlyE, samo SLC, konstitutivno izražen samo HlyE i bakteriji bez plazmida. (preuzeto iz Din et al. 2016).

Za *in vivo* eksperimente na imunokompetentnim miševima sa kolorektalnim tumorom (stanična linija MC26), gubitak plazmida u odsustvu antibiotske selekcije smanjen je dodatkom stabilizirajućih elemenata za zadržavanje i segregaciju plazmida. Kao reporter za praćenje bakterijske populacije unutar tumora koristio se gen *luxCDABE* koji je stavljen pod promotor *luxI* kako bi luminescencijom ukazao na proizvodnju HlyE i lizu populacije. Osim soja SLC-hly, napravljena su još dva soja SLC s genima koji aktiviraju imunološki sustav domaćina ili pokreću apoptozu tumorskih stanica. Imunološki sustav domaćina se aktivira pomoću mišjeg kemokina CCL21, koji kemotaktički privlači T limfocite i dendritičke stanice. Apoptoza stanica se inducira koristeći domenu smrti proteina Bit1 fuzioniranog sa peptidom iRGD ili CDD-iRGD koji može penetrirati u tumorsko tkivo. Od tri soja unesena intratumoralno u miševе, soj SLC koji je aktivirao imunološki sustav pokazao je najjače djelovanje na rast tumora, no terapija sa sva tri soja (3 SLC) pomiješana u jednakom omjeru dala je bolji rezultat nego bilo koji soj zasebno (slika 5) (Din et al. 2016).



Slika 5. Relativni volumen tumora kroz vrijeme za supkutane tumore miševa kojima je intratumoralno injektiran soj SLC-hly (crvena linija), SLC-cdd (zelena linija), SLC-ccl21 (plava linija) i sva tri soja (crna linija). Crne strelice predstavljaju dane administracije bakterija, 0, 2, 6, 8 i 10. dan (preuzeto iz Din et al. 2016).

4. KOMBINIRANJE TERAPIJA

Bakterije djeluju na tumore uništavajući njihove nekrotične i hipoksične dijelove, dok standardne radioterapije i kemoterapije djeluju na tumore izvane, na dobro prokrvljene dijelove tumora. Kombiniranjem dvaju terapija više puta je pokazano da dolazi do značajnog smanjena tumorske aktivnosti s većim šansama za preživljene nego s ijednom terapijom zasebno. Administracijom 3 soja SLC *S. Typhimurium* bakterija sa kemoterapeutikom 5-fluorouracilom (5-FU) tijekom 18 dana, primijećeno je smanjenje tumorske aktivnosti za najmanje 30%, dok je vrijeme preživljenja životinja sa neizlječivim metastazama poraslo za oko 50% (Din et al. 2016). Terapija s *E. coli* modificiranom za proizvodnju *ClyA* u kombinaciji sa radijacijom od 21 Gy, rezultirala je smanjenjem tumora i njegovim potpunim nestankom u miševa, za razliku od terapije samo sa modificiranom *E. coli*, koja je dovela do smanjenja rasta tumora, no nakon prestanka terapije tumor se vratio, dok je samo radijacijom postignuto zaustavljanje rasta, bez promjene u veličini tumora (Jiang et al. 2010). Postoji mnogo mogućnosti kombiniranja te zbog velike fleksibilnosti bakterijskih terapija, mogućnosti modificiranja i individualiziranja, buduće terapije potencijalno će imati sposobnost ciljanja više tumorskih mjesta i točne kontrole mjesta djelovanja toksičnosti lijeka.

5. LITERATURA

- Baban, Chwanrow K., Michelle Cronin, Deirdre O'Hanlon, Gerald C. O'Sullivan, and Mark Tangney. 2010. "Bacteria as Vectors for Gene Therapy of Cancer." *Bioengineered Bugs* 1 doi:10.4161/bbug.1.6.13146.
- Brown, J. Martin, and William R. Wilson. 2004. "Exploiting Tumour Hypoxia in Cancer Treatment." *Nature Reviews Cancer* 4: 437–47. doi:10.1038/nrc1367.
- Camacho, Eva María, Beatriz Mesa-Pereira, Carlos Medina, Amando Flores, and Eduardo Santero. 2016. "Engineering Salmonella as Intracellular Factory for Effective Killing of Tumour Cells." *Scientific Reports* 6: 30591. doi:10.1038/srep30591.
- Din, M Omar, Tal Danino, Arthur Prindle, Matt Skalak, Jangir Selimkhanov, Kaitlin Allen, Ellixis Julio, et al. 2016. "Synchronized Cycles of Bacterial Lysis for in Vivo Delivery." *Nature* 536. doi:10.1038/nature18930.
- Ebbell, B. 1937. *The Papyrus Ebers : The Greatest Egyptian Medical Document*.
- Felgner, Sebastian, Dino Kocijancic, Michael Frahm, and Siegfried Weiss. 2016. "Bacteria in Cancer Therapy: Renaissance of an Old Concept." *International Journal of Microbiology* 2016. doi:10.1155/2016/8451728.
- Forbes, Neil S. 2010. "Engineering the Perfect (Bacterial) Cancer Therapy." *Nature Reviews. Cancer* 10. doi:10.1038/nrc2934.
- Jiang, Sheng-Nan, Thuy X Phan, Taek-Keun Nam, Vu H Nguyen, Hyung-Seok Kim, Hee-Seung Bom, Hyon E Choy, Yeongjin Hong, and Jung-Joon Min. 2010. "Inhibition of Tumor Growth and Metastasis by a Combination of Escherichia Coli-Mediated Cytolytic Therapy and Radiotherapy." *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18. doi:10.1038/mt.2009.295.
- Kubiak, Aleksandra M., and Nigel P. Minton. 2015. "The Potential of Clostridial Spores as Therapeutic Delivery Vehicles in Tumour Therapy." *Research in Microbiology* 166: 244–54. doi:10.1016/j.resmic.2014.12.006.
- Lehouritis, Panos, Caroline Springer, and Mark Tangney. 2013. "Bacterial-Directed Enzyme Prodrug Therapy." *Journal of Controlled Release* 170.

doi:10.1016/j.jconrel.2013.05.005.

- Liu, S C, N P Minton, A J Giaccia, and J M Brown. 2002. "Anticancer Efficacy of Systemically Delivered Anaerobic Bacteria as Gene Therapy Vectors Targeting Tumor Hypoxia/necrosis." *Gene Therapy* 9: 291–96. doi:10.1038/sj.gt.3301659.
- McCarthy, Edward F. 2006. "The Toxins of William B. Coley and the Treatment of Bone and Soft-Tissue Sarcomas." *The Iowa Orthopaedic Journal* 26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16789469>.
- Min, Jung-Joon, Vu H Nguyen, Hyun-Ju Kim, Yeongjin Hong, and Hyon E Choy. 2008. "Quantitative Bioluminescence Imaging of Tumor-Targeting Bacteria in Living Animals." *Nature Protocols* 3: 629–36. doi:10.1038/nprot.2008.32.
- Nuyts, S, L Van Mellaert, J Theys, W Landuyt, P Lambin, and J Anné. 2002. "Clostridium Spores for Tumor-Specific Drug Delivery." *Anti-Cancer Drugs* 13: 115–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11901303>.
- Pawelek, John M, K Brooks Low, and David Bermudes³. 1997. "Tumor-Targeted Salmonella as a Novel Anticancer Vector¹." *cancer research* 57: 4537–44.

6. SAŽETAK

Istraživanja povezanosti tumora i bakterija počela su još u 19. stoljeću, a u zadnja dva desetljeća su postala intenzivnija i opširnija zahvaljujući napretku tehnologije. Bakterije posjeduju prirodnu tendenciju naseljavanja tumora zbog hipoksičnog okoliša, nutrijenata nastalih odumiranjem stanica te zaštićenosti od imunološkog sustava. Ugrađivanjem gena za lijekove u genom bakterije one postaju vektori koji nose lijekove duboko u tumorsko tkivo koje bi inače lijekovima ostalo nedostupno zbog sporije neoangiogeneze od rasta tumora. Također se smanjuje djelovanje lijekova na zdrava tkiva. Korištenjem bakterija napravljenih da ciklički ulaze u lizu nakon što populacija dosegne određenu gustoću, omogućuje se efikasnije otpuštanje toksičnih produkta u tumorsko tkivo i kontrolira se populacija bakterija. Time se smanjuje vjerojatnost sistemske upalne reakcije na bakteriju. Bakterijske terapije kombinirane sa standardnima, poput kemoterapija ili radioterapija, daju znatno bolje rezultate jer se postiže sinergistički efekt: bakterije ubijaju stanice tumora daleko od krvnih žila, dok one bliže ubijaju kemoterapeutici ili zračenje. Jednom usavršene bakterijske terapije postati će nezamjenjiv alat u klinici koji će omogućiti liječenje do sada neizlječivih tumora.

7. SUMMARY

First experiments of bacterial effect on tumors were made in 19. century and became popular research subject in the last two decades. They are used primarily because of their natural tendency to populate tumor disease sights due to lower oxygen levels, nutrient availability and local immune suppression. The progress made in technology opened the door for genetic engineering of bacteria. Armed with therapeutic agents, bacteria became vectors able to penetrate tumor tissue and deliver the therapeutic directly and locally. The engineering of synchronized cycles of bacterial lysis enabled efficient *in vivo* delivery and control over population density with decreased probability of generating a inflammatory response to the bacteria. The bacterial therapies can be used in addition to standard treatments, because of their synergic effect. Bacteria eliminate tumor cells far from blood vessels, while chemotherapeutics or radiation kill those closer. Once perfected, bacterial treatments will become an essential clinical tool able to treat currently incurable tumors.