

ZYGMUNT CYGAN, JULIAN NOWAK, TADEUSZ JASTRZĘBSKI

Badania nad onkolitycznym działaniem wyosobnionego z gleby szczepu *Cl. sporogenes* „CNJ”

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Lublinie

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

Spośród rozwijanych ostatnio metod terapii nowotworów duże zainteresowanie wzbudziły próby wykorzystania onkolitycznych właściwości laseczek z rodzaju *Clostridium* (4, 8, 9, 10, 13, 17, 18, 20, 24). Szczególnie zachęcające wyniki onkolizy dały doświadczenia przeprowadzone z wyizolowanym z gleby szczepem *Cl. butyricum* „M55” (12, 16). Dowiedziano, że przetrwalniki szczepu „M55” podane dożylnie zwierzętom doświadczalnym, zakażonym wirusem raka Ehrlicha i mięsaka *polyoma*, kielkują wybiórczo w guzach nowotworowych i uwalniają niezidentyfikowany czynnik lityczny o charakterze enzymu (2, 3, 5, 6, 11, 15, 22).

Pomyślnie wyniki doświadczeń przeprowadzonych ze szczepem „M55” na zwierzętach doświadczalnych, zachęciły do wypróbowania tych drobnoustrojów również w leczeniu nowotworów człowieka (18). Uzyskane wyniki tych badań należy uznać za interesujące, szczególnie w przypadkach nowotworów mózgu (14, 19). W szeregu przeprowadzonych prób leczniczych obserwowano wyraźną lizę guza, prowadzącą niekiedy nawet do remisji objawów klinicznych. Najczęściej jednak dochodziło do szybkich zejść śmiertelnych pacjenta w wyniku równoczesnego przebiecia komórek mózgowych. Inną wadą użycia szczepu *Cl. butyricum* „M55” była niepełna liza guza nowotworowego.

W związku z powyższym poszukiwanie nowych szczepów *Clostridium* o silniejszych właściwościach onkolitycznych mogłoby być jednym z warunków doskonalenia tej metody bioterapii nowotworów.

W związku z powyższym zadaniem przeprowadzonych badań własnych było wyosobnienie z gleby szczepu *Clostridium* o właściwościach onkolitycznych i przeprowadzenie pełnej jego charakterystyki.

Materiał i metody

1. Szczepy. Wyosobniono z gleby 2 szczepy beztlenowców zarodnikujących „CNJ”-1 i „CNJ”-2.

a) Izolacja szczepów „CNJ”. Przebadano bakteriologicznie 10 próbek ziemi ogrodowej pobranej w miejscowości „L”. Próbkę ziemi wagi około 2 g inkubowano w podłożu Wrzoska bez glukozy w 37°C przez 3 dni. Następnie uzyskaną hodowlę ogrzewano w 100°C przez 1 min., wysiewano na podłoże Zeisslera (met. pyrogallolowa) i inkubowano w 37°C przez 2 dni. Pojedyncze kolonie, które morfologicznie odpowiadały *Cl. sporogenes*, wycinano wraz z agarem i namnażano w podłożu Wrzoska z 0,5% glukozy.

b) Identyfikacja szczepów „CNJ”. Przebadano następujące właściwości:

fermentacyjne — w stosunku do laktozy, glukozy, sacharozy, maltozy, mannitu i salicyny;

proteolityczne — w odniesieniu do 15% żelatyny, mleka lakmusowego i ściętej surowicy (75°C — przez 2 godz.);

zdolność wytwarzania NH₃, H₂S i indolu;

chorobotwórcze — 48 godz. hodowli w podłożu Wrzoska dla myszek (0,5 ml — dootrzewnowo) i świnek morskich (1 ml — domięśniowo).

2. Przeszczepianie nowotworów. Do badań użyto 2 nowotwory: rak Ehrlicha przeszczepiany na myszki „Swiss-Albino” oraz mięsak *polyoma* — na chomiki syryjskie.

Dla wywołania zakażenia zwierząt przygotowano świeżą zawiesinę tkanki nowotworowej w płynie fizjologicznym w stosunku 1:3. Postać guzowatą nowotworu uzyskiwano przez wprowadzenie zwierzętom 0,3 ml zawiesiny podskórnie, a postać wysiękową — 0,2 ml dootrzewnowo.

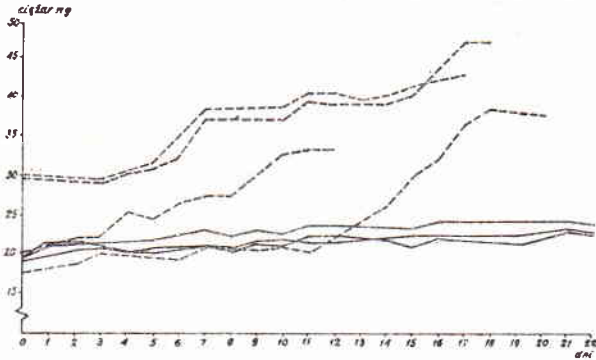
Ocenę wzrostu nowotworów i działania onkolitycznego użytych szczepów przeprowadzano określając codziennie u myszy — ciężar ciała, a u chomików orientacyjnie — wielkość i konsystencję guza.

3. Badania beztlenowcowej onkolizy. Do badań używano zawieszony w p.f. przetrwalniki szczepów „CNJ” (gęstość 4 próbowki skali Mac Farlanda) otrzymane w podłożu wg Hauschilda i wsp. (7). Obserwacje onkolizy prowadzono przy stałej dootrzewnowej dawce zarazka wynoszącej w przypadku myszy — 0,3 ml, a chomików — 0,5 ml. Efekt onkolityczny określano na podstawie spadku ciężaru ciała myszy oraz stopnia lizy guza u chomików.

Wyniki i omówienie

Z 10 próbek ziemi wyosobniono 2 szczepy zarodnikujących beztlenowców „CNJ”-1 oraz „CNJ”-2. Pod względem morfologicznym były to gramodatnie laseczki, które w podłożu wg Hauschilda i wsp. (7) wytwarzały owalne, ułożone subterminalnie zarodniki. Na agarze z 10% krwi owczej tworzyły po 24 godz. inkubacji w 37°C kolonie matowe, w środku wypukłe, o nitkowatych brzegach. Obydwa szczepy „CNJ”-1 i „CNJ”-2 fermentowały glukozę, maltozę, mannit i salicynę, a ponadto wytwarzały NH₃ i H₂S. Natomiast nie fermentowały laktozy i sacharozy oraz nie wytwarzały indolu. Obydwa szczepy wykazywały silne właściwości proteolityczne w stosunku do żelatyny, ściętej surowicy i mleka lakmusowego. Na podstawie powyższych właściwości, charakterystycznych dla *Cl. sporogenes*, obydwie szczepy określono jako przynależne do tego gatunku.

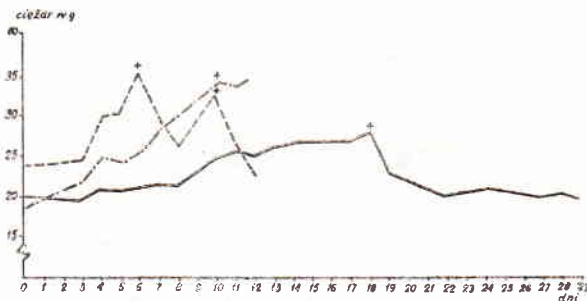
Dynamikę wzrostu raka Ehrlicha u myszy w formie wysiękowej przedstawia ryc. 1. Wynika z niej, że ciężar ciała myszy z wysiękową formą raka Ehrlicha wyraźnie wzrasta, począwszy od 4—5 dnia po zakażeniu tkanką nowotworo-



Ryc. 1. Przyrost ciężaru ciała myszy niezakażonych i zakażonych rakiem Ehrlicha

Objaśnienia: ————— = myszy niezakażone; - - - - - = myszy zakażone.

wą i po kilkunastu dniach przyrost ciężaru ciała wyniósł ok. 14 g. Zaznaczyć przy tym należy, że średnie dzienne przyrosty ciężaru ciała wyniosły ok. 0,9 g. Jednak w poszczególnych przypadkach dzienne przyrosty były b. zróżnicowanie i wahały się w granicach od 0,5 g w pierwszych 5 dniach do 4—5 g w 8—12 dniu po zakażeniu nowotworem. U myszy z guzowatą formą nowotworu Ehrlicha wzrost ciężaru ciała po 18 dniach wyniósł — 7,5 g, przy czym dzienne przyrosty nie przekraczały 1,5 g (ryc. 2). W przypadku myszy zdrowych, niezakażo-



Ryc. 2. Kształtowanie się ciężaru ciała myszy z wysiękową i guzowatą formą raka Ehrlicha po podaniu przetrwalników szczepu *Cl. sporogenes* „CNJ”-1 i płynu fizjologicznego

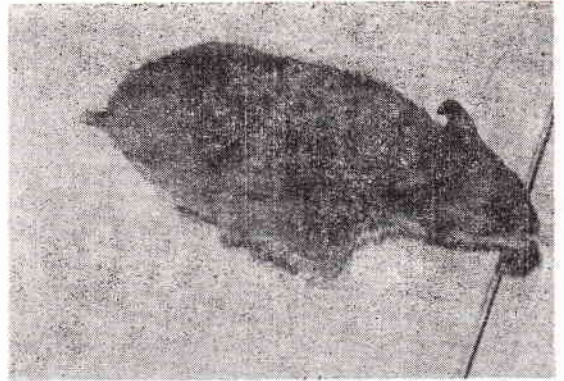
Objaśnienia: ————— = mysz z guzowatą formą nowotworową po podaniu szczepu „CNJ”-1; - - - - - = mysz z wysiękową formą nowotworową po podaniu szczepu „CNJ”-1; — · — · — = mysz z wysiękową formą nowotworową po podaniu płynu fizjologicznego.

nych nowotworem, przyrosty ciężaru ciała po 22 dniach badania wyniosły ogółem od 4 do 5 g, przy czym średnie dzienne przyrosty nie przekraczały na ogół 0,2 g (ryc. 1).

Wstępne badania nieszkodliwości oraz właściwości onkolitycznych szczepów „CNJ”-1 i

„CNJ”-2 — wykazały, że zachowują się one podobnie tj. są nieszkodliwe i powodują jednaki efekt onkolityczny. W związku z tym do dalszych badań użyto tylko szczep „CNJ”-1.

Właściwości onkolityczne tego szczepu w stosunku do myszy z rozwiniętą, wysiękową formą raka Ehrlicha przedstawia ryc. 2. Wynika z niej, że po podaniu zarazka pojawiał się spadek ciężaru ciała myszy dochodzący w ciągu 24 godz. nawet do 5 g (z 34,8 g do 29,5 g).



Ryc. 3.

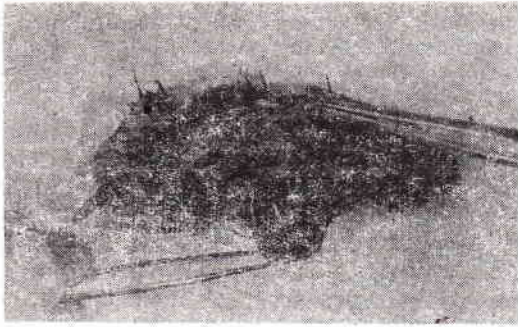
Uzyskany efekt onkolitycznego działania zarodników szczepu *Cl. sporogenes* „CNJ”-1 w stosunku do raka Ehrlicha w formie guzowatej ilustruje ta sama ryc. 2. Wykazuje ona, że po dootrzewnowym podaniu zarazka dochodzi w ciągu 48 godz. również do wyraźnego spadku ciężaru zakażonej myszy (z 27,5 g do 22,7 g).

Czas przeżycia myszy z wysiękową formą raka Ehrlicha po zastosowaniu bakteryjnej onkolizy („CNJ”-1) wynosił od 2 do 11 dni, średnio 6 dni. Natomiast u myszy z guzowatą formą nowotworu czas przeżycia wynosił przeciętnie 16 dni. Ogólnie stwierdzić należy, że proces onkolizy wyraźnie skracał czas życia myszy z wysiękową formą raka Ehrlicha, natomiast przeżywalność myszy z guzowatą formą raka Ehrlicha odpowiadała na ogół średniej przeżywalności myszy kontrolnych, nie poddanych bakteryjnej bioterapii.



Ryc. 4.

W toku dalszych badań określono działanie onkolityczne szczepu *Cl. sporogenes* „CNJ”-1 na mięsak *polyoma* u chomików syryjskich. Szczep „CNJ”-1 podany dootrzewnowo chomikom z rozwiniętym guzem *polyoma* (ryc. 3) powodował w ciągu 3—4 dni rozmiękanie guza, a potem jego pęknięcie z następowym wyciekaniem brunatnego płynu, zawierającego liczne sporulujące laseczki (ryc. 4). W miejscu guza powstawał duży, nieogający się ubytek (ryc. 5). Przeżywalność poddanych bioterapii chomików była również krótsza niż zwierząt nieleczonych.



Ryc. 5.

Dyskusja

Przeprowadzone własne badania potwierdziły wcześniejsze spostrzeżenia szeregu autorów wskazujące na działanie onkolityczne niektórych laseczek *Clostridium* (11, 12, 16, 17). Wyosobniony z gleby własny szczep *Cl. sporogenes* „CNJ”-1 okazał się całkowicie nieszkodliwy dla myszy i chomików zarówno przy wprowadzeniu domięśniowym jak i dootrzewnowym w postaci przemytej zawiesiny przetrwalników. Zwierzęta pozostawały zdrowe i nie traciły na wadze. Badania właściwości onkolitycznych wykonano na myszach i chomikach zakażonych nowotworami. Zwierzęta te wykazywały rozwój nowotworów wszczepionych i ginęły z czasem wśród objawów wyniszczenia.

Próby działania onkolitycznego objęły zakażone rakiem Ehrlicha myszy białe i mięsakiem *polyoma* — chomiki. Przy formie wysiękowej raka Ehrlicha u myszy i wprowadzeniu dootrzewnowym zarazka „CNJ”-1 uzyskiwano wyraźny i szybki, w ciągu 24 godz., efekt onkolityczny, ale czas życia zwierzęcia ulegał skróceniu. Iniekcja dożylna przetrwalników nie powodowała w tym przypadku onkolizy i nie wpływała na czas życia zwierzęcia. Stwierdzony szybki efekt onkolityczny, występujący przy użyciu drogi dootrzewnowej, zdaje się zależeć nie od namnożenia bakterii, lecz być wynikiem działania hipotetycznego, gotowego czynnika litycznego zarazka (2, 3, 5, 6, 11). Natomiast brak działania przy iniekcji dożylnej, może wynikać z nienamnożenia się w tych warunkach wprowadzonych przetrwalników i z rozcieńczenia wprowadzonego czynnika litycznego.

Przy formie guzowatej raka Ehrlicha, zarówno wprowadzenie dootrzewnowe jak i dożylnie „CNJ”-1 powodowały efekt onkolityczny: spadek ciężaru ciała i rozmiękanie guza. Czas życia zwierząt nie ulegał ani skróceniu, ani przedłużeniu w stosunku do zwierząt nieleczonych. Być może, że czynnikiem aktywnym jest tu kininaza, która wg Brantnera (2, 3) oraz Möse i wsp. (15) warunkuje proces onkolizy, na drodze wywołania zaburzeń w mikrokrążeniu krwi w guzie.

W przypadku chomików zakażonych mięsakiem *polyoma* — powstałe guzy — po zastosowaniu dootrzewnowym szczepu „CNJ”-1, wykazywały całkowite rozmiękanie tkanki nowotworowej z powstaniem dużych, nieogających się ubytków. Czas życia zwierząt, w porównaniu do zwierząt nieleczonych, uległ niestety skróceniu.

Przeprowadzone obserwacje wskazują na możliwość uzyskania efektu onkolitycznego przez użycie szczepu *Cl. sporogenes* „CNJ”-1, przy obydwóch zastosowanych nowotworach, co jednak nie przyczynia się do przedłużenia czasu życia zwierząt. Podobne wyniki uzyskał ostatnio Schweizer (23) przy użyciu zarazków *Cl. butyricum*.

Przyczyna przyspieszonego padania zwierząt nie jest jasna. Prawdopodobnie organizm ich nie jest w stanie unieszkodliwić tak dużych ilości rozpadłej tkanki (u myszy ciężar nowotworu w formie guzowatej wynosił do 15% ogólnego ciężaru ciała). Poza tym niewykluczone, że dla osłabionego nowotworem ustroju zwierzęcia, użyte w doświadczeniu nieszkodliwe dla myszy zdrowych bakterie i produkty ich metabolizmu, stają się wyraźnie szkodliwe. Według Raynauda (21) laseczki *Cl. sporogenes* mogą w pewnych warunkach produkować znaczne ilości amoniaku i toksycznych amin. Być może, że wczesne otwarcie chirurgiczne rozmiękającego guza dla usunięcia rozpadłej tkanki oraz zneutralizowanie produktów metabolizmu bakterii za pomocą surowicy odpornościowej, jak również wstrzymanie dalszego ich rozwoju przez użycie antybiotyków, mogłoby przedłużyć okres życia leczonych zwierząt. Sprawdzenie tej tezy wymaga jednak przeprowadzenia odpowiednich badań.

Piśmiennictwo

1. Billy C.: Annals Inst. Pasteur, Paryż 103, 605, 1962.
2. Brantner H.: Zentbl. Bakt. Parasitkde I. Orig. A. 220, 432, 1972.
3. Brantner H., Fischer G.: Path. Microbiol. 39, 93, 1976.
4. Engelbart K., Gericke D.: Cancer Res. 24, 239, 1964.
5. Fredette V., Plante C.: Can. J. Microbiol. 16, 249, 1970.
6. Fredette V., Plante C.: Can. J. Microbiol. 10, 337, 1972.
7. Hauschild A. H. W., Nüilo L., Dorward W. J.: Can. J. Microbiol. 16, 331, 1970.
8. Gericke D., Engelbart K.: Cancer Res. 24, 217, 1964.
9. Kretschmer H., Grasser A.: Arch. Geschwulstforsch 39, 135, 1972.
10. Kretschmer H., Grasser A., Glaser A.: Arch. Geschwulstforsch 39, 315, 1972.
11. Mohr U., Boldingh W., H., Emminger A., Behagel H. A.: Cancer Res. 32, 1122, 1972.
12. Möse J. R.: Z. Krebsforsch. 63, 447, 1960.
13. Möse J. R.: Medsche Klin. 59, 1189, 1961.
14. Möse J. R.: Les bacteries anaerobies, Lavel — des — Rapides, Montreal 1967.

15. Möse J. R., Fischer G., Mobascherie T. B.: Zentbl. Bakt. Parasitkde I. Orig. A. 219, 530, 1972.
16. Möse J. R., Möse G.: Z. Krebsforsch. 63, 63, 1959.
17. Möse J. R., Möse G.: Cancer Res. 24, 212, 1964.
18. Möse J. R., Möse G., Propst A., Heppner F.: Medsche Klin. 62, 189, 1967.
19. Möse J. R., Möse G., Propst A., Heppner F.: Medsche Klin. 62, 222, 1967.
20. Propst A., Möse J. R.: Z. Krebsforsch. 68, 337, 1966.
21. Raynaud M.: Contribution à l'étude de substance toxique de Clostridium sporogenes, These de Sciences Naturelles, Paris 1946.
22. Rousseau P., Chagnon A., Fredette V.: Cancer Res. 30, 849, 1970.
23. Schweizer K.: Z. Immun. Forsch. 142, 455, 1972.
24. Thiele E., Arison R. N., Boxer G. E.: Cancer Res. 24, 222, 1964.

Adres autora: doc, dr hab. Zygmunt Cygan, ul. Słowicza 2 m. 7, 20-336 Lublin.

Цыган З., Новак Ю., Ятшембски Т. — Исследования онколитического действия выделенного из земли штамма *Clostridium sporogenes* „CNJ”.

Из 10 образцов земли выделили 2 штамма анаэробов (CNJ-1 и CNJ-2), которые идентифицировали как *Clostridium sporogenes*. Оба штамма оказались совершенно безвредными для здоровых мышей и хомяков. Подробно исследованный штамм CNJ-1 оказался активно онколитическим в отношении к экссудативной и к опухолевой форме карциномы Эрлиха у мышей и к саркоме пелиома у хомяков. Продолжительность жизни животных зараженных экссудативной формой карциномы Эрлиха и саркомой полиома после онколизы вызванной введением штамма CNJ-1 была однако короче чем у животных

не подвергнутых действию CNJ-1. В случае опухолевой формы карциномы продолжительность жизни не изменялась. Обсудили результаты исследований и возможность улучшения онколитического действия штамма для эвентуальной биотерапии опухолей.

Cygan Z., Nowak J., Jastrzębski T. — Investigations on the oncolytic action of *Cl. sporogenes* „CNJ” isolated from the soil.

Out of 10 samples of soil there have been isolated two anaerobic strains producing spores. They were called CNJ-1 and CNJ-2 which were later determined as *Cl. sporogenes*. Both the strains displayed oncolytic properties but simultaneously their spores proved to be apathogenic for mice and hamsters after given by different routs. The strain CNJ-1 was examined towards different oncolytic characteristics. It was effective both against Ehrlich's carcinoma (exudative form and tuberous form) and against polyoma. The time of survival of the animals infected with carcinoma and polyoma was shorter than those infected with neoplasms and treated with the spores of *Clostridium*. Only in mice with the tuberous type of carcinoma there was not any difference in the time of survival both in treated and untreated animals. In the paper there have been discussed the reason of rapid deaths of infected animals and the possibility of improvement of this method of biotherapy of neoplasms.

BRONISŁAW KOZAKIEWICZ, ZBIGNIEW PAWŁOWSKI, JAN ZATOŃSKI

Skuteczność niklosamidu i bunamidyny w zwalczaniu echinokokozy u psów*)

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Poznaniu

Z Kliniki Chorób Pasożytniczych AM w Poznaniu

Bąblowica świń jest w Wielkopolsce jednym z istotnych problemów z zakresu chorób inwazyjnych; w niektórych rejonach ponad 35% trzody chlewnej wykazuje w badaniu po uboju pęcherze bąblowcowe w wątrobie (9). Dość znaczna ekstensywność tej inwazji u świń wiąże się z niemalym odsetkiem psów zarażonych tasiemcami z gatunku *Echinococcus granulosus* (9).

Mimo znacznego postępu w leczeniu tasiemczyc, jaki miał miejsce w ciągu ostatnich 10 lat, usuwanie postaci dojrzałych tasiemca bąblowcowego u psów jest nadal nierozwiązanym elementem wybiórczej terapii. Krajowy przemysł farmaceutyczny, poza arekolina, nie dysponuje skutecznymi preparatami do zwalczania inwazji *E. granulosus* u psów.

W odniesieniu do preparatów stosowanych za granicą opinie na temat skuteczności niklosa-

midu są kontrowersyjne, natomiast dość dobrą opinią cieszy się bynamidyna wprowadzona do lecznictwa weterynaryjnego w 1965 r.

Celem pracy było porównanie skuteczności niklosamidu i bunamidyny produkcji zagranicznej w zwalczaniu echinokokozy psów.

Materiał i metody

Badania wykonano u 15 psów bezrasowych, 6 samców i 9 samic, w wieku 2—3 miesięcy, o wadze ok. 4 kg. Psy pochodziły z mnogich miotów w zagrodach wiejskich i większa ich część była przeznaczona do uśpienia.

Badanie kliniczne psów wykonane przed zarażeniem nie wykazało żadnych odchyleń od normy. Psy były uprzednio odrobaczone, co potwierdzono badaniem parazytologicznym. Kontrolne badanie koproskopowe po leczeniu wykazało jedynie obecność jaj *Trichocephalus vulpis*.

Psy zarażono *E. granulosus* podając codziennie, przez okres 7 dni, protoskoleksy tasiemca. Pochodziły one z bąblowców znalezionych w wątrobach kilkunastu świń. Żywotność protoskoleksów była każdorazowo sprawdzana pod mikroskopem. Inwazyjne protoskoleksy były dokładnie mieszane z karmą, którą równomiernie dzielono pomiędzy poszczególne psy. Dawka

*) Badania wykonano w ramach polsko-amerykańskiej współpracy naukowej z Center for Disease Control, Atlanta, USA.