

MEDYCYNĄ WETERYNARYJNĄ

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA NAUK WETERYNARYJNYCH

CZASOPISMO POSWIECONE NAUCIE I PRAKTYCE WETERYNARYJNEJ
ZAŁOŻONE W 1945 R. PRZEZ WYDZIAŁ WETERYNARYJNY W LUBLINIE

REDAKCJA

Redaktor naczelny: prof. dr Edmund PROST

Członkowie Komitetu Redakcyjnego: prof. dr Ryszard BADURA, prof. dr Jerzy MAZURCZAK,
prof. dr Abdon STRYSZAK, doc. dr Stanisław WOŁOSZYN.

Sekretarz naukowy: dr Ryszard SŁUŻEWSKI

RADA PROGRAMOWA

Dr Anatol BACHAREWICZ, prof. dr Henryk BALBIERZ, prof. dr Władysław BIELAŃSKI, prof. dr Stanisław CAKAŁA, prof. dr Zygmunt EWY, prof. dr Roman HOPPE, prof. dr Tadeusz JASTRZĘBSKI, prof. dr Lech JASKOWSKI, płk doc. dr Stefan KOSSAKOWSKI, prof. dr Zdzisław LARSKI, dyr. dr Henryk LIS, dr Władysław LUTYŃSKI, prof. dr Wincenty PEZACKI, prof. dr Wiktor STEFANIAK, prof. dr Marian TRUSZCZYŃSKI, prof. dr Janusz WELENTO, prof. dr Aleksander ZAKRZEWSKI, prof. dr Eugeniusz ZARNOWSKI

CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

ZYGMUNT CYGAN, TADEUSZ JASTRZĘBSKI

Onkolityczne działanie bakterii, głównie laseczek *Clostridium*

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Lublinie

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych AR
w Lublinie

Choroby nowotworowe stanowią największą i najtrudniejszą do zwalczania plagę cywilizacji XX wieku i z tej racji znajdują się w centrum badawczych zainteresowań. Szczególne znaczenie, obok dążeń do wyjaśnienia etiologii nowotworów, posiada poszukiwanie środków skutecznej terapii. Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie roli bakterii, głównie laseczek *Clostridium* „w bioterapii” nowotworów.

Rola tlenowców w onkolizacji. Idea hamowania nowotworowego wzrostu komórek, przez bakterie tlenowe, powstała jeszcze w ubiegłym stuleciu. Już wówczas zaobserwowano częściową regresję, takich nowotworów jak rak i mięsak w przebiegu infekcji wywołanych paciorkowcami (2). Powyższe spostrzeżenie zostało później potwierdzone przez innych badaczy (18). Z kolei Janker (19) doniósł o działaniu przeciwnowotworowym zakażenia gronkowcami, a Müller (39) — pałeczkami *Pseudomonas aeruginosa*. Zwrócono również uwagę na pewne przesłanki wskazujące na możliwość

wykorzystania szczepu BCG w profilaktyce nowotworów u myszy. Z innych branych pod uwagę bakterii należy wymienić pałeczki *Brucella* i leptospiry (13, 40). Wymienione drobnoustroje przedłużały na ogół czas przeżywania chorych zwierząt, a niekiedy nawet wywierały pewne działanie przeciwnowotworowe.

Reasumując należy jednak stwierdzić, że użycie żywych bakterii tlenowych „w bioterapii” nowotworów nie dało praktycznie przydatnych rezultatów, głównie ze względu na małą skuteczność i niebezpieczeństwo ich chorobotwórczego działania.

Działanie onkolityczne wyciągów z tlenowców. Pomysł użycia wyciągów bakteryjnych, zamiast żywych bakterii, powstał jeszcze w ubiegłym stuleciu, kiedy to Coley (6) zastosował ekstrakt z paciorkowców i z *Serratia marcescens* (tzw. „toksyna Coleya”). Działanie tego preparatu nie dało jednak powtarzalnych pozytywnych wyników. W kilkadziesiąt lat później Shear i Turner (48)

i Reilly (45) poczynili próby leczenia nowotworów przy pomocy endotoksyn. Uzyskane frakcje lipido-wielocukrowe z pałeczki *E. coli*, powodowały przekrwienie i częściowe zanikanie guzów mięsaka u myszy. Bardziej aktywny okazał się wyciąg lipido-wielocukrowo-białkowy z *Serratia marcescens* (44). Donelly i wsp. (7) oraz Haves i wsp. (15) wskazali na synergistyczne działanie przeciwnowotworowe toksyn paciorkowców i *Serratia marcescens*. Pewne działanie przeciwnowotworowe zaobserwowano również przy próbach użycia egzotoksyny dyfterytycznej (21). Dużo prac poświęcono działaniu na nowotwory wyciągów z *B. subtilis* (14, 21). Wyosobniona „substancja 221” powodowała piknozę jąder komórek nowotworowych oraz hamowała ich mitozę. Gregory (14) przygotował oczyszczony preparat krystaliczny, który wykazywał pewne działanie na nowotwory u człowieka.

Jednak ostatecznie również i wyciągi z bakterii tlenowych nie uzyskały praktycznego znaczenia w terapii nowotworów, gdyż były zbyt mało aktywne, a poza tym często niebezpieczne w stosowaniu.

Działanie szczepionek. Od dawna próbowano wykorzystać działanie przeciwnowotworowe mikoplazm (13). Szczepionka przygotowana z tych drobnoustrojów dawała przemijające polepszenie samopoczucia chorych, a niekiedy nawet częściową martwicę guzów.

Interesujące wyniki dały również próby zastosowania doguzowo szczepionek wirusowych. Pack (41) wykorzystał w tym celu szczepionkę pko wścieklicznie, a Belisario i Milton (1), Burdick (5), Hermann i Tritsch (16), Hunter-Craig i wsp. (17), Milton i Brown (28) oraz Tritsch (51) szczepionkę pko ospie. W szeregu przypadków uzyskano degenerację komórek nowotworowych. Zupełnie podobne wyniki dały jednokrotne iniekcje adjuwantu Freunda (16). Należy zatem sądzić, że szczepionki mogą niespecyficycznie aktywizować przeciwnowotworowe mechanizmy obronne ustroju.

Rola beztlenowców w onkolizie. Wyjątkowo ciekawe i obiecujące wyniki uzyskano z laseczkami *Clostridium*. Pierwszych prób dokonał Parker i wsp. (42), którzy u myszy zakażonych włókniakomięsakiem zastosowali pod osłoną swoistej antytoksyny — laseczki *Cl. histolyticum*. Jednakże metoda powyższa nie dała całkowitej neutralizacji toksyny i dlatego też dalej nie prowadzono badań z tym drobnoustrojem.

Najciekawszy i najbardziej efektywny etap badań stanowiły próby wykorzystania działania przeciwnowotworowego zarodników beztlenowców. Sam pomysł użycia zarodników powstał dość przypadkowo dzięki obserwacjom poczynionym przez Malmgrena i Flanigana (27), a także Möse (30) oraz Möse i Möse (34). Autorzy ci spostrzegali, że myszy z guzem Ehr-

licha zakażone dożylnie przemytymi zarodnikami *Cl. tetani* padały z objawami tęcza, podczas gdy myszy bez nowotworu pozostawały zdrowe. Fenomen ten powstał w wyniku wykiełkowania spor w guzie nowotworowym i wytworzenia swoistej toksyny. W dalszych badaniach stwierdzono, że również zarodniki beztlenowców nietoksynogennych posiadają właściwość selektywnego kiełkowania w tkankach nowotworowych. Jednocześnie z kiełkowaniem spor pojawia się liza komórek nowotworowych (8, 12, 24, 26, 31, 35, 37, 43, 49). Natomiast nigdy nie występuje uszkodzenie komórek zdrowych (32, 37, 49).

Właściwości onkolityczne wykazano u szeregu zarodników niepatogennych gatunków *Clostridium* np. *Cl. butyricum*, *Cl. felsineum*, *Cl. paraputrificum*, *Cl. tertium* i *Cl. sporogenes* (35). Spośród zbadanych szczepów najbardziej korzystne działanie wykazał szczep *Cl. butyricum* „M 55”, wyosobniony z gleby przez Möse i Möse (34) oraz Möse (30). Szczep „M 55” jest niepatogenny dla zwierząt i ludzi, bez względu na drogę wprowadzenia do organizmu, posiada silne właściwości onkolityczne, łatwość zarodnikowania i zdolność wybiórczego kiełkowania w tkance nowotworowej; ponadto nie ma właściwości pyrogennych, co umożliwia iniekcję dużych ilości zarodników, które są odporne na działanie immunologicznych mechanizmów obronnych ustroju.

Szczep „M 55” może być wykorzystany nie tylko do onkolizy guzów ale także do pewnego stopnia do wykrywania procesów nowotworowych w organizmie (22, 25, 33). Wykazano bowiem, że w organizmach ludzi i zwierząt dotkniętych nowotworami wstrzyknięte zarodniki kiełkują i indukują powstanie przeciwciał pko formom wegetatywnym zarazka, podczas gdy u ludzi i zwierząt wolnych od nowotworów, wobec braku możliwości kiełkowania, powstają jedynie przeciwciała antyzarodnikowe. Powyższe wyniki sugerują celowość prowadzenia dalszych badań nad wypróbowaniem metod serologicznych w diagnostyce nowotworów.

Beztlenowcowa onkoliza u myszy. Objawy onkolizy u myszy z twardym guzem Ehrlicha, zakażonych dożylnie dawką 20—40 milionów zarodników szczepu „M 55”, pojawiają się już po kilku dniach. Guz staje się miękki, w końcu otwiera się i wypływa z niego brązowy, nekrotyczny płyn o konsystencji rzadkiej ropy. Płyn zawiera początkowo bakteryjne komórki wegetatywne, a później przy końcu lizy także zarodniki. Oględziny zewnętrzne wykazują w miejscu guza, mniej lub bardziej rozległą jamę. Jednak w wielu przypadkach w tkankach przylegających do jamy można jeszcze histologicznie stwierdzić komórki nowotworowe. Dodatkowe wprowadzenie spor szczepu „M 55” nie wpływa na zwiększenie efektu onkolitycznego.

Na podkreślenie zasługuje, że próby użycia zarodników tlenowców *B. mesentericus* i *B. subtilis*, przy tej samej technice stosowania, skończyły się niepowodzeniem tj. nie dały efektu onkolitycznego.

Beztlenowcowa onkoliza u człowieka. Pomyślne wyniki lizy nowotworów wywołanej przez szczep „M 55” u zwierząt doświadczalnych, stworzyły podstawę do wypróbowania jego działania na nowotwory człowieka. Dotychczasowe wyniki badań przeprowadzanych głównie w RFN należy uznać za zachęcające. Świadczy o tym m. in. udział światowej firmy Farbwerke Hoechst w przygotowaniu liofilizatów zarodników szczepu „M 55” dla celów klinicznych (37). Ustalono, że jednorazowa dawka dożylna „M 55” dla człowieka wynosi od 7 do 21 bilionów zarodników, a wyjątkowo dochodzi do 35 bilionów i przy tym nie powoduje ujemnych następstw. Efekt onkolizy pojawia się najczęściej po 5–8 dniach po podaniu zarodników i intensywność jej zależy od wielkości nowotworu, jego lokalizacji i stopnia bakteryjnego zakażenia (23, 32). Duże, jałowe, zamknięte nowotwory, zawierające spontanicznie powstałe mikroskopowe ogniska nekrozy i zaopatrywane w krew przez jedną tylko arterię końcową, najłatwiej podlegają lizie. Przy tym bowiem rodzaju ukrwienia, bariera endotelialna naczyń jest przepuszczalna dla zarodników beztlenowców tylko w zasięgu guza (38). Wykazano, że działanie lityczne szczepu „M 55” najsilniej występuje w nowotworach mózgu, płuc i jąder (32, 38). Natomiast nie osiągnięto pozytywnych wyników w posokowatych rakach kobiecych narządów rodnych, w powierzchniowych naciekach nowotworowych oraz w przypadkach ziarnicy złośliwej (32, 38).

Dość rozbieżne są poglądy na temat działania litycznego szczepu „M 55” na ogniska martwice związane z tłem nienowotworowym. Thiele i wsp. (50) sądzą, że w niektórych przypadkach chorobowych np. w zawałach nerek dochodzi do lizy takiego ogniska, natomiast Propst i Möse (43) są odmiennego zdania.

Mechanizm beztlenowcowej onkolizy. Istota onkolizy wywołanej przez szczep „M 55” nie jest jeszcze znana. Kayser (20) tłumaczy onkolizę dużą wrażliwością komórek nowotworowych na nadtlenek wodoru powstały w wyniku kontaktu beztlenowców z tlenem. Autor opiera swoją hipotezę na wynikach badań Wartburga i wsp. (52), które wskazują na niską zawartość katalaz w komórkach nowotworowych. Według Kaysera (20) brak onkolizy w obwodowych partiach guza, ma być wynikiem ochronnego działania, wywieranego przez katalazę krwi. Proces wybiórczego osiedlania się i kiełkowania spor w guzie nowotworowym jest wg Kaysera (20) uwarunkowany niską koncentracją tlenu tj. poniżej 40 mm wody.

Natomiast Gericke (11) wiąże istotę onkolizy z konkurencją o substraty odżywcze, pomiędzy komórkami nowotworowymi i beztlenowców.

Dla wyjaśnienia istoty onkolitycznego działania beztlenowców, szczególne znaczenie miały badania Rousseau i wsp. (46) przeprowadzone z użyciem hodowli komórek diploidalnych i heteroploidalnych. Autorzy ci wykazali, że zarodniki szczepu „M 55” nie wnikają do heteroploidalnych (nowotworowych) komórek lecz lokalizują się pozakomórkowo. Cytotoksyczny więc efekt, obserwowany wyłącznie w komórkach heteroploidalnych, mógł być tylko następstwem działania czynnika uwalnianego z zarodników. Przemawiają za tym pozytywne wyniki hamowania wzrostu nowotworów uzyskane przez Fredette i Plante (9, 10) oraz Mohra i wsp. (29) przy użyciu wyciągów z beztlenowców.

Na działaniu pozakomórkowego czynnika litycznego opiera się również robocza hipoteza przedstawiona przez Möse i wsp. (36) oraz Brantnera (3, 4). Powyżsi autorzy wiążą zjawisko onkolizy ze zdolnością szczepu „M 55” do produkowania kininaz tj. enzymów rozkładających kininy, które warunkują prawidłowe mikrokrążenie krwi w guzie. W wyniku braku aktywnych kinin dochodzić ma do martwicy nowotworu. Jednak ostateczne ustalenie roli w onkolizie beztlenowcowych kininaz, wymaga przede wszystkim sprawdzenia działania czystych preparatów enzymatycznych i przeprowadzenia prób hamowania ich aktywności przez swoiste inhibitory.

Perspektywy beztlenowcowej terapii nowotworów. Poważnym brakiem metody jest niedostateczny na razie efekt onkolityczny. Obecnie usiłuje się wzmocnić beztlenowcową onkolizę na drodze zahamowania reakcji immunologicznych przez podanie steroidów i wczesne naświetlanie ciała ^{60}Co (47). Onkoliza jest hamowana także w następstwie uwalniania porfiryn z rozpadłych komórek nowotworowych (12). Niekorzystne działanie porfiryn ma polegać na przyspieszeniu resporulacji szczepu „M 55”. W związku z tym Gericke i Engelbart (12) proponują blokowanie porfiryn podawaniem preparatów żelaza.

Reasumując podkreślić należy, że na obecnym etapie badań, użycie beztlenowców w terapii nowotworów u ludzi, nie daje jeszcze klinicznie skutecznych wyników. Niemniej jednak niekiedy obserwuje się regresję objawów chorobowych, chociaż częściej w przypadkach wyraźnej onkolizy, dochodzi do wczesnych zejść śmiertelnych w następstwie powstania przerzutów i autotoksemii (18). Jednak wydaje się, że powyższa metoda przy dalszym udoskonaleniu może w przyszłości rokować nadzieję na znalezienie praktycznej przydatności w leczeniu niektórych nowotworów.

Piśmiennictwo

1. Beltsario J. C., Milton G. W.: Aust. J. Derm. 6, 613, 1961.
2. Busch E. cyt. wg. poz. 23.
3. Brantner H.: Zentbl. Bakt. Parasitkde I. Orig. A. 220, 432, 1972.
4. Brantner H., Fischer G.: Path. Microbiol. 39, 99, 1973.
5. Burdick K. H.: Arch. Derm. 82, 438, 1960.
6. Coley cyt. wg. poz. 23.
7. Donelly A. J., Havas H. F., Groesbeck M.: Cancer Res. 18, 149, 1958.
8. Engelbart K., Gericke D.: Cancer Res. 24, 239, 1964.
9. Fredette V., Plante C.: Can. J. Microbiol. 16, 249, 1970.
10. Fredette V., Plante C.: Can. J. Microbiol. 18, 367, 1972.
11. Gericke D.: Naturwissenschaften 52, 629, 1965.
12. Gericke D., Engelbart K.: Cancer Res. 24, 217, 1964.
13. Gerlach F.: Krebs und obligater Pilzparasitismus, Urban-Schwarzenberg, Wien 1948.
14. Gregory J. E.: cyt. wg. poz. 23.
15. Havas H. F., Groesbeck M. E., Donelly A. J.: Cancer Res. 18, 141, 1958.
16. Herrmann W. P., Tritsch H.: Dtsch. Arztebl. 67, 2117, 1970.
17. Hunter-Craig I., Newton K. A., Westbury G., Lacey B. W.: Br. med. J. 11, 512, 1970.
18. Huth E. F.: Z. Krebsforsch. 58, 524, 1952.
19. Janker R.: Zentbl. Chir. 65, 1016, 1938.
20. Kayser D.: Les bacteries anaerobies, Laval-des-Rapides, Montreal 1967.
21. Kluyeva N. J., Roskin G. J.: Biotherapy of malignant tumors, Pergamon Press, Oxford, New York 1963.
22. Kretschmer H.: Medsche Klin. 27, 245, 1972.
23. Kretschmer H.: Arch. Geschwulstforsch 39, 185, 1972.
24. Kretschmer H., Grasser A.: Arch. Geschwulstforsch 39, 195, 1972.
25. Kretschmer H., Grasser A.: Arch. Geschwulstforsch 39, 322, 1972.
26. Kretschmer H., Grasser A., Glaser A.: Arch. Geschwulstforsch 39, 315, 1972.
27. Malmgren R. A., Flanagan C. C.: Cancer Res. 15, 437, 1955.
28. Milton G. W., Brown M.: XIII Congr. int. Dermat. vol. II., Springer, Berlin — New York 1968.
29. Mohr U., Boldingh W. H., Emminger A., Behagel H. A.: Cancer Res. 32, 1122, 1972.
30. Möse J. R.: Z. Krebsforsch. 63, 447, 1960.
31. Möse J. R.: Medsche Klin. 59, 1189, 1964.
32. Möse J. R.: Les bacteries anaerobies, Laval-des-Rapides, Montreal 1967.
33. Möse J. R.: Krebsforsch. 73, 329, 1970.
34. Möse J. R., Möse G.: Z. Krebsforsch. 63, 63, 1959.
35. Möse J. R., Möse G.: Cancer Res. 24, 212, 1964.
36. Möse J. R., Fischer G., Mobascherie T. B.: Zentbl. Bakt. Parasitkde I. Orig. A. 219, 530, 1972.
37. Möse J. R., Möse G., Propst A., Heppner F.: Medsche Klin. 62, 189, 1967.
38. Möse J. R., Möse G., Propst A., Heppner F.: Medsche Klin. 62, 222, 1967.
39. Müller W.: cyt. wg. poz. 30.
40. Oravec C., Kmety E.: Zentbl. Bakt. Parasitkde I. Orig. 176, 514, 1959.
41. Pack G. T.: Arch. Derm. 62, 694, 1950.
42. Parker R. C., Plummer H. C., Siebenmann C. O., Chapman M. G.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 66, 461, 1947.
43. Propst A., Möse J. R.: Z. Krebsforsch. 68, 337, 1966.
44. Rathgeb P., Sylven B.: J. natn. Cancer Inst. 14, 1108, 1954.
45. Reilly H. C.: Cancer Res. 13, 821, 1953.
46. Rousseau P., Chagnon A., Fredette V.: Cancer Res. 30, 849, 1970.
47. Schweizer K.: Z. Immun. Forsch. 142, 455, 1972.
48. Shear M. J., Turner F. C.: J. natn. Cancer Inst. 4, 81, 1944.
49. Thiele E., Arison R. N., Boxer G. E.: Cancer Res. 24, 222, 1964.
50. Thiele E., Arison R. N., Boxer G. E.: Cancer Res. 24, 234, 1964.
51. Tritsch H.: Dt. med. Wschr. 95, 2432, 1970.
52. Warburg O., Gawehn K., Gelssler A. W.: Z. Naturf. 12, 393, 1957.

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

MARIAN KRÓLAK

Znaczenie erytrytu w patogenezie brucelozy

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Gdańsku

W patogenezie brucelozy podstawowe znaczenie posiada zdolność bruceli do przeżywania i rozmnażania się wewnątrz fagocytów i komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego (usś). To zjawisko wewnątrzkomórkowego pasożytnictwa bruceli kryje w sobie wiele niewyjaśnionych zagadnień i pobudza licznych autorów do podejmowania badań w tym kierunku. W ostatnim dziesięcioleciu serię prac na temat chemicznych podstaw zjadliwości *Brucella abortus* wykonał zespół autorów angielskich (5, 6, 7, 12, 15, 18, 19, 21, 22, 24). Tematykę tę podjęli także inni autorzy rozszerzając badania na cały rodzaj *Brucella* (4, 11, 14, 16, 17). Badania te doprowadziły do wykrycia erytrytu, normalnego składnika płynów płodowych niektórych gatunków zwierząt, który w sposób swoisty pobudza rozwój bruceli *in vivo* i *in vitro*. Rzuca to nowe światło na niektóre, niejasne dotąd zagadnienia w patogenezie brucelozy i pozwala lepiej zrozumieć mechanizm przebiegu procesu chorobowego tej groźnej zoonozy. Wyniki tych badań posiadają także znaczenie praktyczne, pozwalają bowiem na bardziej świadome postępowanie przy zwalczaniu i zapobieganiu brucelozie, a ponadto mogą stanowić punkt wyjścia w podejmowaniu badań z zakresu rozpoznawania brucelozy.

Powyższe względy zdecydowały o przygotowaniu przez autora niniejszego przeglądu piśmiennictwa na temat erytrytu i jego roli w patogenezie brucelozy.

1. Erytryt jako czynnik stymulujący rozwój bruceli

W przebiegu procesu chorobowego brucelozy u domowych zwierząt kopytnych takich jak bydło, owce, kozy i świnie wyróżnić można powolną infekcję dojrzałych tkanek (ta postać dominuje u zwierząt niekopytnych i człowieka) oraz postać ostrej infekcji łożyska i młodocianych tkanek płodu, prowadzącą do poronienia. W brucelozie ciężarnych krów obserwuje się wyraźną predylekcję bruceli do tkanek płodu.

Spostrzeżenia powyższe potwierdzone zostały doświadczalnie przez Smith'a i wsp. (19), którzy zdrowym krowom w 5—6 miesiącu ciąży podali dożylnie kulturę zjadliwego szczepu *Br. abortus* 544. Po 3—4 tygodniach od chwili zakażenia, tuż przed zbliżającym się poronieniem, zwierzęta poddane zostały ubojowi i drobiazgowym badaniom bakteriologicznym. Autorzy stwierdzili, że z ogólnej ilości bruceli zawartych w tkankach płodu i matki, kotyledony łożyska zawierały 60—85%, płyn omocznioowo-owodniowy 1—25%, kosmówka 2—8%. Doświadczalne zakażenie krów ograniczyło się więc w zasadzie do jamy macicy.