

Mikroorganizmi, posebice virusi, u liječenju tumorskih bolesti

Microorganisms, especially viruses, in the treatment of tumor diseases



Mazija, H.* , B. Filipič, S. Ivanković

Sažetak

Najčešći i uobičajeni pristupi u liječenju tumorskih bolesti uključuju kirurgiju, radioterapiju, kemoterapiju, imunoterapiju, ciljanu terapiju, hormonsku terapiju, transplantaciju matičnih stanica te sveobuhvatno personalizirano liječenje. Izostavlja se gotovo zaboravljeno liječenje primjenom različitih mikroorganizama od kojih su najzastupljeniji virusi. Njihova je neposredna primjena, ako se radi o apatogenim virusima ili njihovim genomskim modifikacijama, sve učestalija i postigla je vrlo visok stupanj primjenjivosti. Ovaj prikaz odnosi se pretežno na mogućnosti primjene mikroorganizama, u manjoj mjeri bakterija, a uglavnom virusa, u liječenju tumorskih bolesti. Neki virusi mogu zaraziti i ubiti tumorske stanice te su poznati kao onkolitički. Neki se od njih nalaze u prirodi, ali su također i modificirani, kako bi se pojačalo njihovo onkolitičko svojstvo, djelujući isključivo na tumorske stanice bez oštećivanja zdravih. U najnovije vrijeme genetički modificirani virusi postigli su stupanj javne upotrebe stavljanjem na tržište te su od FDA-a (Food and Drug Administration) dopušteni za liječenje melanoma (T-VEC), dok se u Kini modificiranim adenovirusom (H101) liječi rak glave i vrata ljudi. Posebna je vrijednost virusa u liječenju tumorskih bolesti, jer se umnažaju u tumorskoj stanici dok je ne razore, tvoreći tako kompleks tumorskog antigena što omogućuje njegovo prepoznavanje od strane imunskog sustava. Reakcija tog sustava je lokalna ili sustavna, prepoznata danas kao imunoterapija. Uspoređeni s klasičnim oblicima liječenja tumorskih bolesti, primjena onkolitičkih virusa i imunoterapija uspješniji su način s tek blagim nuspojavama. Danas suvereno usmjeruju istraživanja upravo u tom smislu.

Ključne riječi: tumorske bolesti, liječenje, mikroorganizmi, onkolitički virusi

Abstract

The most frequent and usual approaches in treating tumor diseases include surgery, radiotherapy, chemotherapy, immunotherapy, targeted therapy, hormonal therapy, transplantation of stem cells and comprehensively personalized treatment. Treatment using various microorganisms, mainly viruses, has become neglected and almost forgotten. Their direct application, in terms of apathogenic viruses or their genomic modifications, is becoming increasingly common, and has achieved a high level of applicability. This paper relates mainly to the possibility of using microorganisms, mainly viruses and to a lesser extent bacteria, in treating tumor diseases. Some viruses can infect and kill tumor cells, and they are known as

Dr. sc. Hrvoje MAZIJA, dr. med. vet., prof. emeritus, dr. sc. Bratko FILIPIČ, docent, Hrvatski institut za eksperimentalnu i translacijsku onkologiju, Zagreb; dr. sc. Siniša IVANKOVIĆ, dr. vet. med. znanstveni savjetnik, Institut Ruđer Bošković, Zagreb.
Dopisni autor: mazija@vef.hr

oncolytic. Some of them are found in nature, but there are also some that have been modified, in order to enhance their oncolytic potential, acting exclusively on tumor cells without damaging healthy cells. Very recently, genetically modified viruses have achieved a degree of public use by being placed on the market, and have been permitted by the FDA (Food and Drug Administration) for treating melanoma (T-VEC), and in China modified adenovirus (H101) is used in treating cancers of the head and neck in humans. The special value of viruses used for treating tumor diseases is that they multiply inside the tumor cell until they destroy it, thereby creating a complex of tumor antigens, which makes them recognizable by the immune system. The reaction of that system is local or systemic, and this is recognized today as immunotherapy. In comparison with classical forms of treatment for tumor diseases, the use of oncolytic viruses and immunotherapy is more successful, with only mild side-effects. Today, they are dominant in research precisely for that reason.

Key Words: tumor diseases, treatment, microorganisms, oncolytic viruses

Uvod

Pronalaženje uspješnih postupaka liječenja tumorskih bolesti ljudi jedna je od najzahtjevnijih zadaća znanstvenika današnjice. Razlog je jednostavan, prema podacima Međunarodne agencije za istraživanje raka (International Agency for Research on Cancer, IARC) Svjetske zdravstvene organizacije (World Health Organization, WHO) 2012. godine rak je bio vodeći uzrok bolesti i smrtnosti ljudi s približno 14 milijuna zabilježenih novih slučajeva oboljelih i s očekivanim porastom njihova broja u sljedeća dva desetljeća za 70%. Godine 2015. rak je uzrokovao smrt 8,8 milijuna ljudi, pri čemu se približno 70% tog broja odnosi na slabo ili srednje razvijene zemlje.

Međunarodna agencija za istraživanje raka u rujnu 2018. godine, prema podacima Svjetske agencije za rak, GLOBCAN 2018, procijenila je smrtnost od 36 tipova raka u 185 zemalja svijeta. Očekuje se porast novooboljelih na 18,1 milijuna i smrtnost od 9,6 milijuna. Jedan od pet muških i jedna od šest žena u svijetu oboljet će od raka, a jedan od osam muškaraca te jedna od 11 žena, umrijet će od raka. Oko 43,8 milijuna oboljelih proživjet će razdoblje od pet godina nakon pojave bolesti (Anonymous, 2018).

Prema NCI-ju (National Cancer Institut dio je NIH-a, National Institutes of Health USA), od 2010. do 2014. na 100000 stanovnika bilo je 442,7 novooboljelih od raka, a umrlo je njih 166,1 (Anonymous, 2017.). Isti izvor navodi predviđanja za godinu 2017. od 1 688 780 oboljelih odnosno 600 920 umrlih od raka. U razdoblju godina 1975.-2014., do g. 1992. povećavao se broj novih slučajeva, a postupno smanjivao broj umrlih pet godina nakon dijagnosticiranja bolesti, pa stopa preživljenja 2009. godine iznosi prosječnih 69,3 %.

Rak je u zemljama Europske unije uzrokovao smrt nešto više od 1,3 milijuna ljudi u 2014. godi-

ni, što čini 26 % ukupno umrlih u toj godini (izvor: EC.Europa/eu/eurostat 14.2.2018.). Od raka češće obole muškarci (731 300 umrlih) negoli žene (575 300 umrlih). Smrtnost osoba mlađih od 65 godina veća je nego u starijih (odnos 38 % prema 24 %). Smrtnost od raka najveća je u Sloveniji, Irskoj i Nizozemskoj (31 %) a tek neznatno manja u Danskoj i Luksemburgu (30 %), dok je znatno manja u Litvi i Rumunjskoj (20 %), a najmanja u Bugarskoj (17 %). No smrtnost žena 2014. godine veća je negoli muškaraca, a najveća, čak 61 %, bila je u Cipru, Grčkoj i Španjolskoj.

Najveća je smrtnost u zemljama EU-a od raka pluća (21 %), nakon čega slijede rak dojke (12 %), rak prostate (10 % ukupne smrtnosti u muškaraca) te gušterače (8 %) (izvor: EC.Europa/eu/eurostat 03/02/2017).

Trećina uzroka smrti pripisuje se lošim dijetnim navikama, poput prekomjerne tjelesne mase (visok tjelesni indeks), nedovoljno jedenja povrća, izostala fizička aktivnost, uživanje alkohola i pušenje. Približno 22 % smrti od raka uzrokuje pušenje (Murray i sur., 2016.). Rak uzrokovan infekcijama poput virusnog hepatitisa odnosno humanim papilomavirusom (HPV) odgovoran je za oko 25% pojava bolesti u siromašnim ili srednje razvijenim zemljama (Plummer i sur., 2016.). Još jedan razlog za povećanu smrtnost od raka u siromašnim zemljama jest dijagnostika i pristup liječenju oboljelih. U nerazvijenim i siromašnim zemljama ono je dostupno u 26 % slučajeva, a u bogatih i više od 90 % (podatak za 2017.). Gospodarske štete koje prouzroči rak u svijetu procijenjene su 2010. godine na ukupno 1,16 trilijuna dolara i neprestano se povećavaju. Ni ovo nije sasvim točno jer siromašne i srednje razvijene zemlje ne nude za to relevantne podatke (Stewart i sur., 2014.).

Godine 2014. od raka je u Hrvatskoj umrlo 13 939 osoba, od toga 7 911 muškaraca te 6 028 žena

odnosno na 100 000 stanovnika 325,3 muškarca te 382,9 žena, što čini odnos 57 : 43. Sljedeće godine od raka oboljevaju ukupno 22 503 osobe (11 969 muškaraca i 10 534 žene), a 2 016. ta brojka narasta na 23.650 (12.632 muškaraca i 11.018 žena). Učestalost smrtnosti u muškaraca još je naglašenija (58:42)(Anonymous, 2019.).

Značajan je stalan postupan rast broja oboljelih nakon 1968. godine te zatim i nagli porast nakon 1998. godine. U odnosu na druge zemlje EU-a smrtnost zbog raka u Hrvatskoj veća je od prosjeka (EC.europa.eu/eurostat). Prema londonskom časopisu *The Guardian* (21. veljače 2018.) u Hrvatskoj je na 100.000 stanovnika od raka umrla 263,1 osoba (315

Tablica 1. Očekivana smrtnost muškaraca i žena prosječne dobi od različitih vrsta raka u 2019. godinama na 100 000 stanovnika (Prema: GLOBCAN, 2018.)

Redoslijed	Država	Smrtnost*	Redoslijed	Država	Smrtnost*
1	Australija	468,0	26	Litva	285,8
2	Novi Zeland	438,1	27	Estonija	283,3
3	Irska	373,7	28	Grčka	279,8
4	Mađarska	368,1	29	Španjolska	272,3
5	SAD	352,2	30	Finska	266,2
6	Belgija	345,8	31	Urugvaj	263,4
7	Francuska	344,1	32	Bjelorusija	260,7
8	Danska	340,4	33	Portugal	259,5
9	Norveška	337,8	34	Island	257,8
10	Nizozemska	334,1	35	Guadalupe	254,6
11	Kanada	334,0	36	Portoriko	254,5
12	NovaKaledonija	324,2	37	Moldavija	254,3
13	Velika Britanija	319,2	38	Poljska	253,8
14	Južna Koreja	313,5	39	Cipar	250,8
15	Njemačka	313,1	40	Martinik	250,8
16	Švicarska	311,0	41	Malta	249,4
17	Luksemburg	309,3	42	Singapur	248,9
18	Srbija	307,9	43	Japan	248,0
19	Slovenija	304,9	44	Austrija	247,7
20	Latvija	302,2	45	Barbados	247,5
21	Slovačka	297,5	46	Guajana	247,0
22	Češka	296,7	47	Bugarska	242,8
23	Švedska	294,7	48	Libanon	242,8
24	Italija	290,6	49	Polinezija	240,6
25	Hrvatska	287,2	50	Izrael	233,6

*prosječna smrtnost s obzirom na dob

muškaraca i 229,3 žena). Procjena institucije GLOB-CAN (Bray i sur., 2018.) svrstava Hrvatsku na 23. mjesto unutar 50 zemalja s prosječnom godišnjom smrtnosti 287,2 na 100.000 stanovnika. Prvih 12 država na ovoj listi dolazi iz Oceanije, Europe i Sjeverne Amerike.

Liječenje tumorskih bolesti iznimno je skupo i, s obzirom na ishod, često nepredvidivo. Pristupi su vrlo različiti, no oni najvažniji, prepoznati u znanosti, razlikuju se s obzirom na vrstu raka, stupanj uznapredovalosti bolesti te općenito zdravlja organizma. Najčešće spominjani postupci liječenja (prema: National Institute of Health, National Cancer Institute, 2017.) jesu kirurško liječenje, otklanjanje tumorskoga tkiva, s brojnim mogućim posljedicama, što nažalost uključuje i tešku invalidnost, ovisno o opsegu i vrsti tkiva koje je tim načinom uklonjeno. Radioterapija se koristi velikim dozama zračenja kojim uništava tumorske stanice, ali i one zdrave. Oštećujući DNK tumorske stanice dovodi do njihove smrti te ih organizam uklanja. Moderni pristup ovim načinom u manjoj mjeri šteti okolnom zdravom tkivu. Kemoterapija uništava sve brzorastuće tumorske stanice, ali i one zdrave. Također, u manjoj mjeri, oštećuje i spororastuće stanice. Zbog toga su učestale i teške nuspojave. Osim toga kemoterapija i radioterapija tek neznatno produljuju preživljenje bolesnika.

Relativno uspješnim, s manje štetnih nuspojava, primjenjuju se i ciljane terapija, lijekovi koji sprečavaju rast tumorskih stanica, njihovu diobu ili općenito hranjenje tumorskog tkiva. Tu su važna sredstva koja razaraju krvožilni sustav tumora i tako ih uništavaju. Hormonskom terapijom sprečava se rast tumora kojima je za to potreban hormon, poput raka prostate ili dojke. I tu se pojavljuju štetne nuspojave, no uspjeh liječenja je znatan. Transplantacijom matičnih stanica nadomještaju se krvotvorne stanice uništene kemoterapijom ili radioterapijom. Postupak zahtijeva dugotrajno liječenje uz štetne nuspojave.

Povoljniji je pristup personalizirano liječenje koje se temelji na prepoznavanju genomske značajke tumorskog tkiva bolesnika te određuje i specifični pristup liječenju. Kod istog tipa tumora genomske se značajke mogu razlikovati, dok kod različitog tipa tumora te značajke mogu biti istovjetne. Za razliku od ostalih pristupa, personalizirano liječenje odnosi se na specifične molekularne ciljeve, dok ostali postupci neselektivno djeluju na sve stanice koje se brzo dijele, uključujući i one zdrave.

Ovaj se prikaz ne odnosi i na jedan, po mnogima najvažniji pristup u liječenju tumorskih bolesti. Radi se o primjeni mikroorganizama koji mogu specifično, djelujući selektivno, isključivo na tumorske stanice, uništiti ih. Osim bakterija tu su u većoj su mjeri opisani virusi (Fukuhara i sur., 2016.).

Zapažanje da slučajna zaraza bakterijom roda *Clostridium* sp. može dovesti do regresije tumora opisano je još 1813. godine (Van Mellaert i sur., 2006.). Prvu namjernu infekciju bakterijom, uzročnikom vrbanca radi liječenja tumorske bolesti, opisao je njemački liječnik Busch (1868.), a Fehleisen (1882.) dokazuje da je uzročnik vrbanca bakterija *Streptococcus pyogenes*. Poznat je rad koji opisuje Coley (1891.), koji je izazvao regresiju tumora inaktiviranim sojem ove bakterije te, potaknut tom spoznajom, primijenio i živi soj što je nažalost dovelo do smrti pacijenta. Zatim je soju *S. pyogenes* dodao bakteriju *Serratia marcescens*. Inaktivirani pripravak, poslije nazvan Coleyevim toksinom, prvi je imunomodulacijski pripravak, zbog čega Coleya nazivaju ocem imunoterapije. Crtež 1. Shematski prikaz uloge bakterija u liječenju raka (Patyar i sur., 2010.).

U proteklom razdoblju u liječenju tumora iskušane su uglavnom anaerobne ili fakultativno anaerobne bakterije rodova *Clostridium*, *Salmonella*, *Bifidobacterium*, *Escherichia* i drugih. Zbog nuspojave, često vrlo patogenog djelovanja, istraživanja su usmjerena prema atenuiranim odnosno inaktiviranim bakterijama te njihovim toksinima. Jedini bakterijski protutumorski pripravak koji se već dugi niz godina uspješno

Crtež 1. Shematski prikaz uloge bakterija u liječenju raka

Cijele, atenuirane ili genetički modificirane	Kao vektor		Kao imunoterapijski agens	Toksini bakterija		Spore bakterija
	Nosači tumorocidnih agensa	Nosači bakterijskih enzima		Konjugirani s antigenima površine tumora	Konjugirani s ligandima	

primjenjuje u liječenju raka mokraćnog mjehura jest cjepivo protiv tuberkuloze BCG – *Bacillus Calmette-Guerin* (*Mycobacterium bovis* BCG). Taj je soj nastao atenuiranjem patogene *M. tuberculosis* tijekom 230 pasaža u razdoblju od 1908. do 1921. godine (Guérini i sur., 1926.), a djeluje kao imunoterapeutik primijenjen neposredno u mokraćni mjehur pocijenata s površinskim tumorom ovog organa (Morales i sur., 1976.). U međuvremenu istraživanja mogućnosti primjene bakterijskih sustava u liječenju tumorskih bolesti uznapredovala su, no ne i postigla praktičnu primjenu (Patyar i sur., 2010.). Vitiello i suradnici (2019.) opisuju protutumorski učinak atenuiranog soja (Lm^{at} -LLO) bakterije *Listeria monocytogenes* u liječenju melanoma na mišjem modelu, koja djeluje kao imunomodulator, a može istodobno poslužiti i kao nosač drugih protutumorskih lijekova. Wallecha i suradnici (2012.) ovu su bakteriju uspješno koristili u liječenju raka prostate. Također na mišjem modelu, Chowdhury i suradnici (2019.) koristili su genetski modificiranu bakteriju *E. coli* na način u kojem se razgrađuje (lizira) u tumorskom mikrookolišu, oslobađajući kodirani antagonist CD47, antifagocitni receptor posebno izražen u nekih tumora u ljudi. Lokalno primijenjen potiče sustavni antigeno specifični imunostimulacijski odziv što je prvi primjer bakterijski poticane imunoterapije. Tako ovi autori dokazuju da se i modificirane bakterije mogu koristiti u poticanju protutumorske imunosti.

Virusi u liječenju tumorskih bolesti

S obzirom na postignut stupanj u liječenju tumorskih bolesti najdalje se došlo primjenom onkolitičkih odnosno citolitičkih virusa. No zapažanja sveze regresije tumorskih bolesti i virusnih infekcija sežu stotinama ili tisućama godina unatrag (Hoption i sur., 2002.). Dock (1904.) opisuje slučaj izlječenja 42-godišnje žene od mijelogene leukemije nakon zaraze influencom 37 godina prije negoli je dokazana virusna etiologija ove bolesti. Jetra i slezena u bolesnice bila su znatno povećana te su se nakon influence smanjila na gotovo normalnu veličinu, a broj limfocita smanjio se za gotovo 70 puta. Sljedeći je slučaj četverogodišnjeg dječaka (Bierman i sur., 1953.) koji je u tijeku leukemije očitovane enormnim povećanjem jetre i slezene te vratnih limfnih čvorova obolio od vodenih kozica (varicela). Za nekoliko dana povećani organi smanjili su se na normalu, a također i broj limfocita (s 200 stanica/ μ L na 4,1 stanica/ μ L). Nažalost, poboljšanje je bilo kratkotrajno, pa su oboljeli u oba slučaja umrli nakon približno mjesec dana.

Početak 19. stoljeća pojavljuje se interes za primjenu virusa u liječenju tumorskih bolesti, no tek sporadično. DePace (1912.) opisuje regresiju raka grlića maternice u žene koja je nakon ugriza bijesnoga psa bila cijepljena protiv bjesnoće atenuiranim cijepnim sojem virusa. Istraživanja koja opisuju Levaditi i Nicolau (1922. i 1936.) prva se odnose na namjernu primjenu virusa kravljih boginja (virus vakcinije) te virusa newcastleske bolesti (VNB) u liječenju tumorskih bolesti. Hoster i suradnici (1949.) istraživali su utjecaj zaraze virusom hepatitisa na tijek Hodgkinsova sindroma u bolesnika koji su slučajno zaraženi virusom sadržanim u kontaminiranom serumu. Dokazali su regresiju tumora, ali i štetne posljedice zaraze. Slično, Taylor (1953.) istražuje učinak mononukleoze (herpesvirusna zaraza) na regresiju mijeloidne leukoze te je dokazao njezin kratkotrajno povoljan učinak.

Razdoblje kasnih četrdesetih te početak pedesetih godina prošloga stoljeća obiluje opisima djelovanja virusnih bolesti na regresiju tumora pri slučajnim ili namjerno izazvanim zarazama. Opsežnija istraživanja djelovanja brojnih virusa na različite vrste tumora proveli su Pack (1950.), Higgins i suradnici (1951.), Southam i Moore (1952.) te Pollard i Snyder (1954.), koji su koristili viruse bjesnoće, miksovirus te paramiksovirus te arboviruse. Njihova su iskustva bila zapažanje najprije kratkoga povoljnog djelovanja tih virusa, a zatim smrti bolesnika. Sličan je bio ishod pokušaja liječenja leukemije i nekih drugih tumorskih bolesti primjenom virusa hemoragijske groznice, pripadnika obitelji flavivirusa, uzročnika niza bolesti ljudi i životinja, uključujući krpeljni encefalitis različite etiologije (Webb i sur., 1966.).

Spomenuti se virusi nisu mogli primjenjivati u terapijske svrhe, prije svega zbog nepoznavanja postupaka atenuiranja virusa uz zadržano svojstvo njihove replikacije u tumorskim stanicama. Danas se međutim zna da je mehanizam obrane od neke virusne infekcije, vezan uz interferon-beta, narušen u većine stanica raka (Platanias, 2005.), zbog čega se većina virusa umnaža u tumorskim stanicama višestruko uspješnije negoli u zdravim. Problem je bilo umnažanje virusa u zdravim stanicama i bolest koju su ti virusi mogli izazvati. Zato su se prestali koristiti prirodno lentogeni virusi poput virusa hepatitisa, groznice Zapadnog Nila, žute groznice, virusa dengue i adenovirusa. Opasnost je i dalje bila njihova moguća patogenost za ljude (Kelly i Russell, 2007.).

Gotovo zaboravljena i potisnuta istraživanja onkolitičkih virusa nastavljena su razvojem molekularnih proba i genetičkim manipuliranjem mik-

roorganizmima. Prekretnica je uspješna primjena genetički modificiranog virusa *herpes simplex* tipa I (HSV-1) s mutacijom gena timidin-kinaze u liječenju pokusno izazvanog humanog glioma u miša. Taj se virus umnažao gotovo isključivo u stanicama tumora (Martuza i sur., 1991.). Tako je otvoreno novo razdoblje u liječenju raka (Fukuhara i sur., 2016.). Do danas je genetičkim modifikacijama virusa ostvarena mogućnost kliničke primjene (faza II, III i IV) više njih, no najpoznatiji su mutanti virusa HSV-1 T-Vec (Imlygic, Talimogen, Laherparepvec) koji su u primjeni u SAD-u od 2015., a u Europi od 2016. godine, te se primjenjuju u liječenju melanoma (faza od IIIB do IV). Mutant HSV-1 G47 Δ namijenjen je liječenju glioblastoma i u fazi II je istraživanja. Virus JX-594 (Pexavec, Pexastimogenedevacirepvec) genetička je modifikacija virusa vakcinije te je u fazi II istraživanja namijenjen liječenju hepatocelularnog karcinoma. Modificirani adenovirus CG0070 nalazi se u fazi II/III istraživanja (Fukuhara i sur., 2016.).

Razvojem znanosti, napose otkrivanjem novih brojnih, za čovjeka apatogenih virusa, prošireno je područje njihove onkolitičke primjene. Godine 2017. zaključena je faza III istraživanja izvornim (nemodificiranim) reovirusom (*Reovirus Type 3, Dearing* soj) nazvanim *Reolysin (Pelareorep)* u liječenju niza solidnih i hematoloških tumorskih bolesti, napose metastatskog i rekurentnog raka glave i vrata, što je prepoznala i FDA. Protutumorsko djelovanje usmjereno mu je i prema malignom gliomu, raku jajnika te raku gušterače. Uspjeh liječenja ovim virusom znatno je poboljšan istodobnom primjenom citostatika (Mahalingam i sur., 2017.). Zasižno najvažniji događaj u primjeni onkolitičkih virusa jest stavljanje u promet prvoga takvog cjepiva u Kini. Radi se o modificiranom adenovirusu oznake H101, namijenjenog liječenju raka glave i vrata u ljudi (Bell, 2006., Yu i Fang, 2007.).

Među mnogim virusima koji se danas koriste, bilo u izvornom bilo modificiranom obliku, virus newcastleske bolesti (VNB) zaslužuje posebno mjesto. Zараza od VNB-a često je fatalna za brojne vrste ptica, napose kokošarke i neke papige, a ovisno o njegovu patotipu te tropizmu uzrokuje bolest dišnog, probavnog ili živčanog sustava. Sisavce rijetko zaražava te dovodi do supkliničkog očitovanja bolesti. U zaraženih ljudi očituju se tek blagi znakovi konjunktivitisa ili je nalik influenci (Alexander, 1988.). Virus NB soj 73-T umnaža se 10.000 puta bolje u stanicama raka negoli u zdravim stanicama čovjeka (Bonab i sur., 2017.), što se inače pripisuje nedovoljnoj protivirusnoj obrani stanica nekih vrsta raka (Pecora i sur., 2002.). Taj soj, primjerice, selektivno *in vitro* ali

i *in vivo*, ubija stanice fibrosarkoma, osteosarkoma, karcinoma grlića maternice, mokraćnog mjehura, stanice neuroblastoma, ali ne i zdrave stanice. Sojevi VNB-a AF2240 i V4-UPM ubijaju stanice mišje mijelomonocitne leukemije također *in vivo* (Alabsi i sur., 2012.). Poznati cijepni soj VNB-a La Sota, doduše *in vitro*, ubija selektivno stanice raka gušterače u ljudi, koji su na taj virus 700 puta osjetljivije od zdravih stanica (Rafiq i sur., 2012., Walter i sur., 2012.). Soj La Sota VNB-a u istraživanjima koristio je i Ivanković (1999., 2006.), te najprije dokazao njegova samostalna onkolitička svojstva, a zatim i mogućnost poboljšanja onkolitičke aktivnosti soja uz LaSota uz primjenu mangana, deksametazona i indometacina. Nadalje, u okviru kombiniranih pristupa pokazalo se u novijim istraživanjima da farmakološki modulatori autofagije također mogu pojačati onkolitičku aktivnost VNB-a (Jiang i sur., 2014.).

Virus NB-a posjeduje nekoliko iznimnih svojstava koja ga svrstavaju u posebnu skupinu, jednako pri monoterapiji tumorskih bolesti u nativnom obliku ili kao osnova genetičkih modifikacija. Lam i suradnici (2011.) sažeto opisuju svojstva VNB-a koja ga razlikuju od drugih virusa što se primjenjuju u liječenju raka. Virus NB svojim se površinskim HN glikoproteinom veže za površinu tumorske stanice. Njegovo umnažanje u inficiranoj tumorskoj stanici dovodi do pojačane ekspresije virusnog antigena na površini tumorskih stanica. Nadalje, VNB potiče sintezu citokina poput interferona i čimbenika nekroze tumora TNF (*tumor necrosis factor*), a također potiče proizvodnju toplinskog šok-proteina, adrenokortikotropnog hormona te tkivnog inhibitora metaloproteaza. Također je znatno imunopoticažno djelovanje VNB-a na pojačanje učinka T-pomoćničkih stanica (TH), citotoksičnih T-limfocita, stanica prirodnih ubojica (NK stanice) te makrofaga. Važno je svojstvo VNB-a i njegovo neposredno onkolitičko djelovanje ili neposredno ubijanje tumorskih stanica u liječenih jedinki. Osim brzog umnažanja u tumorskim stanicama treba ponovno naglasiti i njegovu apatogenost za ljude.

Ovom prilikom treba spomenuti i soj VNB-a oznake ZG1999HDS kojeg su u Hrvatskoj, iz pluća, ali ne i iz tkiva mozga tovnih pilića, izdvojili Mazija i suradnici (2011.) te opisali njegova citolitička i druga svojstva. Uspoređen s cijepnim sojem LaSota VNB-a, ovaj je soj, jednako *in vitro* i *in vivo*, znatnije djelovao citolitički te inhibirao rast tumorskih stanica mišjeg fibrosarkoma, mišjeg karcinoma pločastih stanica, mišjeg adenokarcinoma debelog crijeva i mišjeg adenokarcinoma dojke. Imunogeniji je od soja La Sota (Bidin, 2008., Nedeljković, 2014.). Istodobno

soj ZG1999HDS znatan je induktor interferona, što se može poistovjetiti sa sojem Cantell Sendai VNB (Filipič i sur., 2014.). Dodatak vitamina B₆ (piridoksin) pojačava svojstvo indukcije interferona obaju spomenutih virusa (Filipič i sur., 2015.). Soj VNB-a ZG1999HDS ima izražena i jaka imunomodulacijska svojstva dokazana *in vitro*, djelujući ponajprije protiv niza gram-pozitivnih bakterija, aktivacijom različitih citokina (Filipič i sur., 2013., 2015.a).

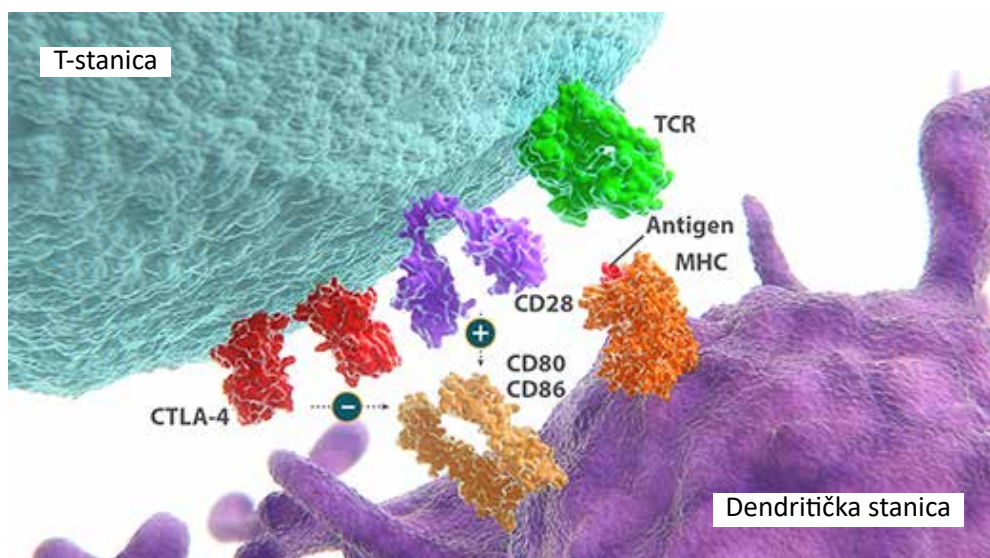
Imunoterapija tumorskih bolesti

Infekcija tumorske stanice onkolitičkim virusom, nakon njegova umnažanja, uzrokuje smrt stanice. Ta stanica oslobađa tumorske antigene koji mogu aktivirati inače imunološki inaktivni mikrookoliš tumora i tako privući niz imunskih stanica. Temeljena na ovim činjenicama, imunoterapija tumorskih bolesti u osnovi je priprema efektivnih stanica imunskog sustava (T i B, stanice prirodni ubojice) da napadnu i unište tumorsku stanicu. Spomenute su stanice primarne ubojice oštećenih ili bolesnih stanica. Postoji međutim važan sustav koji ometa imunoterapiju. Tumorske stanice, naime, često iskorištavaju svojstvo inhibitora hvatišta imunskih bjelancevina (*check point inhibitors*, CPI), pa ih usmjeruju prema slabljenju imunskog odziva. Tako oslabljeno svojstvo ubijanja stranih (tumorskih ili oštećenih) stanica opisuje se kao iscrpljenost efektorskih stanica. Tipičan su predstavnik toga protein programirane

smrti stanica (PD-1) i citotoksični protein 4 pridružen T-limfocitu (CTLA-4) (Anonymous, 2019.).

Za uspjeh imunoterapije posebno su važni kimerički antigeni receptora T-stanica (CAR T-stanice), nastali genetičkom modifikacijom. CAR T-stanice naime prepoznaju tumorske stanice i razaraju ih. Izrađene su kao specifične za neki antigen eksprimiran na tumorskoj, ali ne i zdravoj stanici (Srivastava i sur., 2015.) i živi su lijek koji razara tumorske stanice opsežnim razmnožavanjem, pojačanjem toksičnosti prema drugim živim stanicama te pojačanim izlučivanjem tvari poput citokina, interleukina i čimbenika rasta koji mogu djelovati na druge stanice (Li i sur., 2019.).

Imunoterapija raka usmjerena prema restituciji proteina ključnih hvatišta s funkcijom protutumorske imunosti novija je i revolucionarna strategija. U usporedbi s klasičnom terapijom specifičnom za antigen, ovaj pristup osigurava dugotrajniji odziv prema širem spektru malignih bolesti (Patel i sur., 2015., Sivanandam i sur., 2019.). Inhibiciju CPI-ja na površini tumorskih stanica pripravkom Ipilumab, specifičnih protutijela, čija je primjena odobrena od FDA, prvi su objavili Cameron i suradnici (2011.). Njihovu su radu prethodila istraživanja koja opisuju Leach i suradnici (1996.), koji su prvi ostvarili pojačanje protutumorske imunosti blokadom CPI-ja (CTLA-4). CTLA-4 je naime inhibitor aktivacije T-limfocita pa primjena protutijela za tu molekulu omogućuje i jača imunski odziv prema tumorskim stanicama. Za



Slika 1. Citotoksični T-limfocitni antigen 4 (CTLA-4) kao imunski receptor hvatišta negativno djeluje na imunski odziv. Blokiranje CTLA-4 može neposredno povratiti aktivaciju T-stanica, obnoviti T-staničnu supresiju vođenu regulacijskim (normalnim) T-stanicama (Treg) i tako dovesti do dugotrajne protutumorske imunosti. Sljedeća istraživanja provode se u smjeru optimizacije CTLA-4 blokade (preuzeto od: Leach i sur., 1996.).

Tablica 2. Inhibitori hvatišta imunskih bjelančevina (CPI) odobreni za upotrebu (izvor: *Molecular Therapy: Oncolytics* Vol. 13 June 2019 (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)).

Naziv pripravka i komercijalno ime	Ciljna molekula djelovanja	Godina početka i obnavljanja primjene
<i>Ipilimumab Yervoy</i>	CTLA-4	2011. – 2018.
<i>Nivolumab Opdivo</i>	PD-1	2014. – 2019.
Pembrolizumab Keytruda	PD-1	2014. – 2019.
Atezolizumab Tecentriq	PD-L1	2016. – 2019.
<i>Avelumab Bavencio</i>	PD-L1	2017. – 2018.
Durvalumab Imfinzi	PD-L1	2017. – 2018.
Cemiplimab Libtayo	PD-1	2018.

istraživanja u području medicine i liječenja tumorskih bolesti Nobelovu nagradu za 2018. godine za medicinu podijelila su dvojica istraživača, Amerikanac James P. Allison i Japanac Tasuku Honjo (Devlin, 2018. i Xingxing, 2018.). U međuvremenu odobrena je upotreba i drugih CPI-ja, a neke od njih prikazujemo u sljedećoj tablici (tablica 2).

Uspješnost liječenja tumora primjenom onkolitičkih virusa temelji se na tri međusobno ovisna i usuglašena mehanizma. Ponajprije, neposredna je infekcija stanica tumorskog tkiva i njegovih endotelnih stanica što dovodi do onkolize inficiranih stanica u mikrookolišu. Nadalje, posredan je učinak ovoga nekroza (apoptoza) neinficiranih tumorskih stanica i stanica pridruženog im endotela. Tako naime prestaje angiogeneza u tumorskom tkivu. Konačno, djelovanjem onkolitičkih virusa postiže se protutumorska i protuvirusna imunost djelovanjem imunskih stanica u mikrookolišu tumora (Guo i sur., 2017.).

Imunoterapija tumorskih bolesti (onkolitička imunoterapija) opsežno se istražuje i klinički primjenjuje diljem zemalja Europske unije. U novije se vrijeme (2017.) istražuju onkolitička svojstva virusa *herpes simplex*, adenovirusa, virusa vakcinije, parvovirusa, virusa ospica, reovirusa, virusa vezikularnog stomatitisa te virusa newcastleske bolesti. Istraživanja se provode u Finskoj, Velikoj Britaniji, Latviji, Nizozemskoj, Njemačkoj, Poljskoj, Belgiji, Francuskoj, Portugalu, Francuskoj, Italiji, Španjolskoj, Sloveniji, Mađarskoj i Grčkoj (Duffy i sur., 2017.). Nažalost, Hrvatske nema na tom popisu, što i nije sasvim opravdano.

Još 1999. godine Ivanković je opisao protutumorski učinak virusa newcastleske bolesti (VNB – ptičji paramiksovirus) koristeći soj La Sota u istraživanjima *in vitro* i *in vivo*. Istraživanja je nastavio i proširio 2006. godine (Ivanković, 2006.) primijenivši istovjetni virus istodobno, bilo s manganom, deksametazonom bilo indometacinom. To je zapravo prvo istraživanje u Hrvatskoj u kojemu je s virusom korišteno i drugo kemijsko sredstvo te se može opisati kao kemoviroterapija. Istraživanje *in vitro* i *in vivo* objavio je i Čović (2008.) koristeći tri soja VNB-a (La Sota, Hitchner i Ulster 2C), a osim njih istodobno i usporedno djelovanje γ -zračenja ^{60}Co . Ova su dva istraživača prvi u nas primijenili kombinirani pristup u liječenju tumorskih bolesti. Zaključili su da je opisani pristup znatno bolji negoli samostalna primjena virusa odnosno nekoga sredstva, upućujući pritom na štetne nuspojave kemoterapije. To su i dokazali sljedećim istraživanjem u miša, injekcijom virusa i lokalnom primjenom zračenja (Čović i sur., 2006.).

Kemoviroterapija

Kemoviroterapija podrazumijeva istodobnu primjenu kemoterapeutika s prirodno ili genetički modificiranim onkolitičkim virusom. Primjena samo virusa, bez obzira na njihovu neagresivnost, izostala toksičnost, opisuje se kao nedovoljno učinkovito. Kao razlog tomu uglavnom se navodi nemogućnost pristupa tumoru (Le i sur., 2004.), njegova veličina (Cordaro i sur., 2000.), slaba prokrvljenost (Bilbao i sur., 2000.) te gustoća intersticija tumora (Stohrer i sur., 2000.). Prava vrijednost onkolitičkih virusa

očituje se tek u kombinaciji s uobičajenim načinima liječenja tumora, primjenom kemoterapeutika s kojim djeluju sinergistički. Pravilnim odnosom virusa i lijeka zaobilazi se učinak mikrookoliša tumora koji sprečava ili oslabljuje djelovanje virusa (Simpson i sur., 2016.).

Svakako valja spomenuti i soj VNB-a ZG1999HDS izdvojen u Hrvatskoj (Mazija i sur., 2011.). Iako lentogen, uzrokovao je 77,29 % uginuća tovnih pilića u tijeku četiri tjedna bolesti, uglavnom zbog ugušenja, što se pripisuje njegovu izrazitom pneumotropizmu. Virus je izdvojen iz tkiva pluća, ali ne i tkiva mozga. Taj virus, osim imunogenih, očituje i znatna onkolitička svojstva, dokazana *in vitro* na kulturama tumorskih stanica mišjeg fibrosarkoma, mišjeg karcinoma pločastih stanica, mišjeg adenokarcinoma debelog crijeva i mišjeg adenokarcinoma dojke, te *in vivo* na stanicama mišjeg adenokarcinoma debelog crijeva i mišjeg adenokarcinoma dojke inokuliranih miševima.

Onkolitički virusi koriste se i u liječenju tumorskih bolesti životinja. Proteklih su tridesetak godina različiti virusi iskušani na animalnim modelima u liječenju tumorskih bolesti. Primjenjivani bilo sistemski bilo neposredno u tkivo tumora očitivali su onkolitička (citolitička) svojstva te se nalaze u različitim fazama istraživanja. To su već spomenuti različiti sojevi virusa newcastleske bolesti, reovirusi, lentivirusi, virus herpes simplex (HSV), enterovirusi, virus Sindbis, virus Semliki Forest, virus Seneca Valley, adenovirus, virus vakcinije, miksoma virusi te virus boginja rakuna (Patil i sur., 2012.).

Čini se da je najveći napredak ostvaren u suzbijanju odnosno liječenju melanoma u pasa. Na tržište je stavljeno cjepivo Oncept® (Merial) koje je međutim izazvalo brojne kontroverze (Treggiari i sur., 2016.). U svakom slučaju otvorilo je vrata primjeni protuturnorskih cjepiva u veterinarskoj medicini ali, prema rezultatima, poslužilo kao animalni model u liječenju tumorskih bolesti ljudi.

Zaključno

Najnovija postignuća u imunoterapiji tumorskih bolesti, prije svega melanoma, nisu umanjila važnost potrebe neposredne primjene izvorno onkolitičkih virusa. Oni su i dalje od iznimnog interesa u mnogim pristupima liječenju tumorskih bolesti, samostalno u izvornom obliku, genetički modificirani, kao temelj imunoterapije odnosno kao adjuvans u ublažavanju agresivnih oblika liječenja poput kemoterapije ili zračenja i njihovih nuspojava, jer omogućuju smanjenje doza koje se u tim sustavima koriste. Onkolitička viroterapija sprečava imunosupresiju koju izazivaju

tumorske stanice čime poboljšavaju učinak drugih oblika imunoterapije. Raznolikost u djelovanju virusa uključuje i imunogenu smrt tumorskih stanica što im daje posebno mjesto u liječenju tumorskih bolesti općenito (Marchini i sur., 2019.). Napredak ostvaren u istraživanjima onkolitičkih virusa, imunoterapiji te postignuti rezultati u kliničkim istraživanjima najbolji su svjedok tomu (Hamid i sur., 2017.).

Literatura

- ALABSI, A. M., R. ALI, A. IDERIS, A. R. OMAR, M. H. BEJO, K. YUSOFF, A. M. ALI (2011): Anti-leukemic activity of Newcastle disease virus strains AF2240 and V4-UPM in murine myelomonocytic leukemia *in vivo*. *Leuk. Res.* 36, 634-645.
- ALEXANDER, D. J. (1988): Newcastle disease. Boston: Kluwer Academic Publishers. (197-246).
- ANONYMOUS (2014): Stewart BW, Wild CP, editors. World cancer report 2014. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014.
- ANONYMOUS (2017): US Department of Health. National Cancer Institute at the National Institutes of Health. 2017. Updated April 6, 2017.
- ANONYMOUS (2018): Incidencija raka u Hrvatskoj 2015. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Bilten 40, Zagreb, 2018.
- ANONYMOUS (2019): Immune Checkpoint Binding and Interaction Assays. Creative Biolabs, 2019.
- BELL, J. (2006): China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J. Natl Cancer Inst.* 98, 298-300.
- BIDIN, M. (2008): Imunogenost i neškodljivost terenskog soja virusa NB ZG.2000. primijenjenog pilićima podrijetlom SPF. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, 2008.
- BIERMAN, H. R., D. M. CRILLE, K. S. DOD, K. H. KELLY, N. L. PETRAKIS, L.P. WHITE, M. B. SHIMKIN (1953): Remission in leukemia of childhood following acute infectious disease: staphylococcus and streptococcus, varicella, and feline panleukopenia. *Cancer* 6, 591-605.
- BILBAO, R., M. BUSTOS, P. ALZUGUREN, M. J. PAJARES, M. DROZDIK, C. QIAN, J. PRIETO (2000): A blood-tumor barrier limits gene transfer to experimental liver cancer: the effect of vasoactive compounds. *Gene Ther.* 7, 1824-1832.
- BONAB, S.F., N. KHANSARI (2017): Virotherapy with Newcastle Disease Virus for Cancer Treatment and its Efficacy in Clinical Trials. *MOJ Immunol.* 5. 00176.

- BRAY, F., J. FERLAY, I. SOERJOMATARAM, R. L. SIEGEL, L. A. TORRE, A. JEMAL (2018): Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin. press.* <http://gco.iarc.fr/>
- BUSCH, W. (1868): Aus der Sitzung der medizinischen Section vom 13 November 1867. *Berl. Klin. Wschr.* 5, 137.
- CALMETTE, A., C. GUÉRIN, L. NÉGRE, A. BOQUET (1926): Prémunition des nouveaux vaccinés contre la tuberculose par le vaccin B.C.G., 1921-1926. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 40, 89-133.
- CAMERON F., G. WHITESIDE, C. PERRY (2011): Ipilimumab: first global approval. *Drugs.* 71, 1093-104.
- CHOWDHURY, S., S. CASTRO, C. COKER, T. E. HINCHLIFFE, N. ARPAIA, T. DANINO (2019): Programmable bacteria induce durable tumor regression and systemic antitumor immunity. *Nat. Med.*, 25, 1057-1063.
- ČOVIĆ, D. (2008): Primjena virusa newcastleske bolesti u suzbijanju rasta tumora. (disertacija). Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2008.
- ČOVIĆ, D., S. IVANKOVIĆ, N. HIRŠL, B. RUPČIĆ, M. ŠAMIJA, M. JURIN (2006): Combined action of virus injection and local tumor irradiation on tumor growth in mice. *Collegium Antropol.* 30, 315-319.
- DePACE, N. (1912): Sulla scomparsa di un enome canco vegetante del collo dell'utero senza cura chirurgica. *Ginecologia*, 82-89.
- DEVLIN, H. (2018): James P Allison and Tasuku Honjo win Nobel prize for medicine. *The Guardian* 15, 27.
- DOCK G. (1904): The influence of complicating disease upon leukemia. *Am. J. Med. Sci.* 127, 563-592.
- DUFFY, M. J., N. HARBECK, M. NAP, R. MOLINA, A. NICOLINI, E. SENKUS, F. CARDOSO (2017): Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European group on Tumor Markers (EGTM). *European J. of Cancer* 75, 284-298.
- FEHLEISEN F. (1882): Über die Züchtung der Erysipel kokken auf künstlichem Nährboden und Ihre Übertragbarkeit auf den Menschen. *Dtsch. Med. Wschr.* 8, 553-554.
- FILIPIČ, B., A. PEREYRA GONZALES, H. MAZIJA (2015): Vitamin B₆ enhances the inducing capability of the Paramyxoviruses of Newcastle disease virus strain ZG1999HDS and Sendai virus strain Cantell. *Proc. XI Symp. Poult. Days 2015.* Croatia, Šibenik, May 13-16, 2015.
- FILIPIČ, B., A. PEREYRA GONZALES, J. POTOKAR, S. KOREN, E. ŠOOŠ, H. MAZIJA (2014): Sposobnost indukcije interferona-alfa (HulFN-An3) virusa Newcastle disease (NDV) ZG1999HDS. *Knjiga povzetkov 6. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva*, 24.-26. september 2014, Bled, Slovenija. Ljubljana: Veterinarska fakulteta. 2014, pp. 106, Po-27.
- FILIPIČ, B., A. PEREYRA GONZALES, L. GRADIŠNIK, J. POTOKAR, E. ŠOOŠ, H. MAZIJA (2013): HulFN-[alpha] N3 inducing capacity of the Newcastle disease virus (NDV) ZG1999HDS. *EUSAAT 2013.* Linz 2013, September 15-18, 2013, *Altex Proc.*, Vol. 2, 2, 26.
- FUKUHARA, H., Y. INO, T. TODO (2016): Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci.* 107, 1373-1379.
- GUO, C. J., F. Y. CHANG, T. P. WYCHE, K. M. BACKUS, S. NAYFACH, K. S. POLLARD, C. S. CRAIK, B. F. CRAVETT, J. CLARDY, C. A. VOIGT, M. A. FISCHBACH (2017): Discovery of reactive microbiota-derived metabolites that inhibit host proteases. *Cell* 168, 617-628.
- HAMID, O., B. HOFFNER, E. GASAL, J. HONG, R. D. CARVAJAL (2017): Oncolytic immunotherapy: unlocking the potential of viruses to help target cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 66, 1249-1264.
- HIGGINS, G. K., G. T. PACK (1951): Virus therapy in the treatment of tumors. *Bull. Hosp. J. Dis.* 12, 379-382.
- HOPTION CANN, S. A., J. P. Van NETTEN, C. Van NETTEN, D. W. GLOVER (2002): Spontaneous regression: A hidden treasure buried in time. *Med. Hypotheses* 58, 115-9.
- HOSTER, H. A., R. P. ZANESP, E. VON HAAM (1949): Studies in Hodgkin's syndrome: The association of "Viral" hepatitis and Hodgkin's disease (A preliminary report). *Cancer. Res.* 9, 473-480.
- IVANKOVIĆ S. (2006): Protutumorski učinak lentogenih sojeva virusa newcastleske bolesti uz primjenu mangana, deksametazona i indometacina (disertacija). Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2006.
- IVANKOVIĆ, S. (1999): Antitumorski učinci virusa njukastleske bolesti (magistarski rad). Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 1999.
- JIANG, K., Y. LI, Q. ZHU, J. XU, Y. WANG, W. DENG, Q. LIU, G. ZHANG, S. MENG (2014): Pharmacological modulation of autophagy enhances Newcastle disease virus-mediated oncolysis in drug-resistant lung cancer cells. *BMC Cancer.* 14, 551.

- KELLY, E., S. J. RUSSELL (2007): History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol. Ther.* 15, 651-659.
- LE, Z. Y., S. NI, X. YANG, N. KIVAIT, A. LIEBER (2004): Xenograft models for live metastasis. Relationship between tumor morphology and adenovirus vector transduction. *Mol. Ther.* 9, 650-657.
- LEACH, D. R., M. F. KRUMMEL, J. P. ALLISON (1996): Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271, 1734-1736.
- LEVADITI, C., S. NICOLAU (1922): Sur le culture du virus vaccinal dans les neoplasmes epithelieux. *CR Soc. Biol.* 86, 928.
- LEVADITI, C., S. NICOLAU (1936): Affinité du virus de la peste aviare pour les cellules neoplastiques (epithelioma) de la souris. *CR Soc. Biol.* 202, 218-220.
- LI, D., X. LI, W-L. ZHOU, Y. HUANG, X. LIANG, L. JIANG, X. YANG, J. SUN, Z. LI, W-D. HAN, W. WANG (2019): Genetically engineered T cells for cancer immunotherapy. *Sig. Transduc. Targete Ther.* 4, 35.
- MAHALINGAM, D., C. FOUNTZILAS, J. MOSELEY, N. NORONHA, H. TRAN, R. CHAKRABARTY, G. SELVAGGI, M. COFFEY, B. THOMPSON, J. SARANTOPOULOS (2017): A phase II study of REOLYSIN® (pelareorep) in combination with carboplatin and paclitaxel for patients with advanced malignant melanoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 79, 697-703.
- MARCHINI, A., L. DAEFFLER, V. I. POZDEEV, A. ANGELOVA, J. ROMMELAERE (2019): Immune Conversion of Tumor Microenvironment by Oncolytic Viruses: The Protoparvovirus H-1PV Case Study. *Front. Immunol* 10, 1848.
- MARTUZA, R. L., A. MALICK, J. M. MARKERT, K. L. RUFFNER, D. M. COEN (1991): Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* 252, 854-856.
- MAZIJA, H., Ž. GOTTSTEIN, S. IVANKOVIĆ, D. ČOVIĆ (2011): Lentogenic cytolitic strain of the Newcastle disease virus isolated in Croatia. (In Croatian, English Summary). *Proc. IX Symp. Poultry Days 2011. Croatia, Šibenik, May 11-14, 2011.* (48-58).
- MORALES, A., D. EIDINGER, A. W. BRUCE (1976): Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J. Urol.* 116, 180-183.
- NEDELJKOVIĆ, G. (2014): Usporedba staničnih imunskih odgovora potaknutih okulonazalnom primjenom virusa newcastleske bolesti soj ZG1999HDS i cjepnog soja La Sota u pilića u dobi četiri tjedna. *Dissertacija. Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet.*
- PACK, G. T. (1950): Note of experimental use of rabies vaccine for melanomatosis. *AMA Arch. Dermatol.* 62, 694-695.
- PATEL, M. A., J. E. KIM, J. RUZEVIĆ, M. LIM (2015): Present and future of immune checkpoint blockade: Monotherapy to adjuvant approaches. *World J. Immunol.* 5, 1-15.
- PATIL, S. S., I. GENTSCHEV, I. NOLTE, G. OGILVIA, A. A. SZALAY (2012): Oncolytic virotherapy in veterinary medicine: current status and future prospects for canine patients. *J. Translation Med.* 10, 3.
- PECORA, L., N. RIZVI, G. I. COHEN, N. J. MEROPOL, D. STERMAN, J. L. MARSHALL, S. GOLDBERG, P. GROSS, J. D. O'NEIL, W. S. GROENE, M. S. ROBERTS, H. ROBIN, M. K. BAMAT, L. M. LORENCE (2002): Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. *J. Clin. Oncology* 20, 2251-2266.
- PLATANIAS, L. C. (2005): Mechanisms of type-I and type-II-interferon-mediated signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 375-386.
- PLUMMER, M., C. DE MARTEL, J. VIGNAT, J. FERLAY, F. BRAY, S. FRANCESCHI (2016): Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob. Health* 4, 609-916.
- POLLARD, M., C. SNYDER (1954): Treatment of a human cancer case with viruses. *Tex. Rep. Biol. Med.* 12, 341-344.
- SIMPSON, G. R., K. RELPH, K. HARRINGTON, A. MELCHEP, H. PANDHA (2016): Cancer immunotherapy via combining oncolytic virotherapy with chemotherapy: recent advances. *Oncolytic virotherapy* 5, 1-13.
- SIVANANDAM, V., C. J. LAROCCA, N. G. CHEN, Y. FONG, S. G. WARNER (2019): Oncolytic Viruses and Immune Checkpoint Inhibition: The Best of Both Worlds. *Molecular Therapy. Oncolytics* 13, 93-109.
- SOUTHAM M., A. E. MOORE (1952): Clinical studies of viruses as antineoplastic agents, with particular reference to Egypt 101 virus. *Cancer* 5, 1025-1034.
- SRIVASTAVA, S., S. R. RIDDELL (2015): Engineering CAR-T cells: Design concepts. *Trends Immunol.* 36, 494-502.
- Stewart, B.W., C. P. Wild (2014) editors. *World cancer report 2014.* Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014.
- STOHRER, M., Y. BOUCHER, M. STANGASSINGER, R. K. JAN (2000): Oncolytic pressure in solid tumor is elevated. *Cancer Res.* 60, 4251-4255.

- TAYLOR, A. W. (1953): Effects of glandular fever infection in acute leukaemia. *Br. Med. J.* 1, 589–593.
- TREGGIARI, E., J. P. GRANT, S. M. NORTH (2016): A retrospective review of outcome and survival following surgery and adjuvant xenogenic DNA vaccination in 32 dogs with oral malignant melanoma. *J. Vet. Med. Sci.* 78, 845–850.
- VAN MELLAERT, L., S. BARBÉ, J. ANNÉ (2006): Clostridium spores as anti-tumor agents. *Trends-Microbiol.* 14, 190–196.
- VITIELLO, M., M. EVANGELISTA, N. DI LASCIO, C. KUSMIC, A. MASSA, F. ORSO, S. SARTI, A. MARRANCI, K. RODZIK, L. GERMELLI, D. CHANDRA, A. SALVETTI, A. PUCCI, D. TAVERNA, F. FAITA, C. GRAVEKAMP, L. POLISENO (2019): Antitumoral effects of attenuated *Listeria monocytogenes* in a genetically engineered mouse model of melanoma. *Oncogene* 38, 3756–3762.
- WALLECHA, A., R. PETIT, C. FRENCH, J. ROTHMAN (2012): Immune Response and immunotherapy: live attenuated *Listeria monocytogenes* immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Current cancer therapy rev.* 8, 254–263.
- WALTER, R. J., B. M. ATTAR, A. RAFIQ, S. TEJASWI, M. DELIMATA (2012): Newcastle disease virus LaSota strain kills human pancreatic cancer cells in vitro with high selectivity. *JOP* 13, 45–53.
- WEBB, H. E., G. WETHERLEY-MEIN, C. E. SMITH, D. Mc MAHON (1966): Leukaemia and neoplastic processes treated with Langat and Kyasanur forest disease viruses: a clinical and laboratory study of 28 patients. *Br. Med. J.* 1, 258–266.
- XINGXING, Z. (2018): 2018 Nobel Prize in medicine awarded to cancer immunotherapy: Immune checkpoint blockade – A personal account. *Genes Dis.* 5, 302–303.
- YU, W., H. FANG (2007): Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. *Current Cancer Drug Targets* 7, 141–148.

COVID-19

Virus SARS-CoV-2

BOLEST UZROKOVANA NOVIM KORONAVIRUSOM *Novel coronavirus*

- Zaštita:**
- * redovito perite ruke sapunom i vodom Ili koristite dezinficijens na bazi alkohola
 - * kada kašljete i kišete prekrijte usta i nos laktom ili papirnatom maramicom koju poslije odbacite u koš za otpad te operite ruke
 - * izbjegavajte dodirivanje lica, usta, nosa i očiju
 - * izbjegavajte bliski kontakt s osobama koje imaju povišenu tjelesnu temperaturu, kašalj i/ili kratak dah
 - * izbjegavajte rukovanje i održavajte razmak od barem 1m kod razgovora
 - * provjetravajte prostorije i boravite što više na otvorenom
 - * izbjegavajte veće grupe ljudi i javna okupljanja

