

Kanser Tedavisinde Bakteri Destekli İlaç Taşıyıcı Sistemler

Bacteria Mediated Drug Delivery System for Cancer Therapy

Maide ÖZTÜRK^{1,2}

ORCID: 0000-0002-9967-8385

Sibel BOZDAĞ PEHLİVAN^{1*}

ORCID: 0000-0001-5066-2772

¹Department of Pharmaceutical Technology,
Faculty of Pharmacy, Hacettepe University,
Ankara, Turkey

²Department of Pharmaceutical Technology,
Faculty of Pharmacy, Duzce University,
Duzce, Turkey

Corresponding author:

Sibel BOZDAĞ PEHLİVAN

Department of Pharmaceutical Technology,
Faculty of Pharmacy, Hacettepe University,
Ankara, Turkey

E-mail: sbozdog@hacettepe.edu.tr

Tel: +90 312 305 1241

Received date : 18.11.2023

Accepted date : 13.02.2024

DOI: [10.52794/hujpharm.1392635](https://doi.org/10.52794/hujpharm.1392635)

ÖZET

Kanser tedavisine yönelik terapötiklerin ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine rağmen hastalık dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Spesifite eksikliği, sitotoksinite ve çoklu ilaç direnci gibi sınırlamalar nedeniyle kemoterapi, radyasyon terapisi ve immünoterapi gibi kanser tedavileri ile henüz istenen düzeyde başarı elde edilememiştir. Bu nedenle yan etkilerin azaltılarak etkin bir tedavinin gerçekleştirilebilmesi için hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Ancak kanser mikroçevresi, vaskülarizasyonu ve hipoksik bölgeleri ile hedeflendirme için birçok fizyolojik engele sahiptir. 1800'lü yıllardan günümüze kadar yapılan araştırmalar, bakterilerin bu fizyolojik engelleri aşarak kanser dokusuna seçici olduğunu göstermiştir. Bakterilerin doğal olarak tümör dokularını hedefleme ve dokuda birikme özelliklerine sahip olduğunun keşfedilmesiyle birlikte araştırmacılar, bakteri destekli ilaç taşıyıcı sistemler üzerine yoğunlaşmıştır. Bakterilerin hareketlilik, immün yanıt oluşturma ve kolay modifikasyon özelliğiyle konvansiyonel ilaç taşıyıcı sistemlerden daha üstün olduğu bildirilmiştir. Bu derlemede kanser tedavisine yönelik bakteri destekli ilaç taşıyıcı sistemler konusunda literatürde yer alan en güncel gelişmeler değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: İlaç taşıyıcı sistem, Bakteri destekli ilaç taşıyıcı sistem, Hedeflendirilmiş tedavi, Nanoteknoloji, Kanser tedavisi.

ABSTRACT

Despite the development of therapeutics and treatment approaches for cancer treatment, the disease remains one of the leading causes of death worldwide. Due to limitations such as lack of specificity, cytotoxicity, and multidrug resistance, the desired level of success has not yet been achieved with cancer treatments such as chemotherapy, radiation therapy, and immunotherapy. Therefore, it is of great importance to develop targeted treatments to provide effective treatment by reducing side effects. However, the cancer microenvironment, with its vascularization and hypoxic regions, has many physiological obstacles to targeting. Research from the 1800s to the present has shown that bacteria are selective for cancer tissue by overcoming these physiological barriers. With the discovery that bacteria naturally can target and accumulate in tumor tissues, researchers have focused on bacteria mediated drug delivery systems. It has been reported that bacteria are superior to conventional drug carrier systems with their mobility, immune response, and easy modification properties. In this review, the most current developments in the literature on bacteria mediated drug delivery systems for cancer treatment are evaluated.

Keywords: Drug delivery system, Bacteria mediated drug delivery system, Targeted treatment, Nanotechnology, Cancer therapy.

1. Giriş

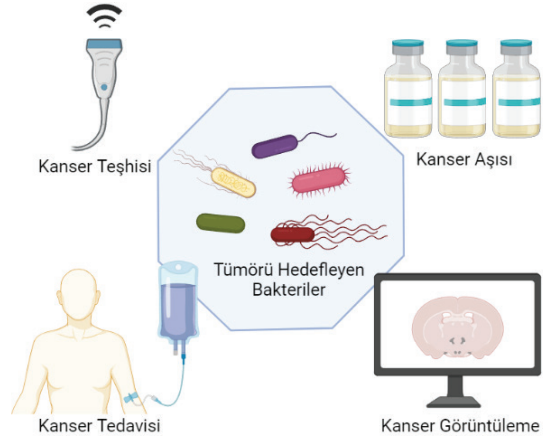
Kanser, dünya çapında en fazla ölüme neden olan halk sağlığı problemlerinden biridir. 2020 yılı verilerine göre dünyada hastalık nedeniyle meydana gelen her altı ölümden biri kanserden kaynaklanmaktadır. Ülkemizde her 5 ölümden birinin kanser kaynaklı olduğu bildirilmektedir. Kadın ve erkeklerde en çok görülen kanser türleri sırasıyla meme, prostat, akciğer ve kolorektal kanserdir. 2017 verilerine göre kanser insidansı 100.000 kişide erkeklerde ortalama 187, kadınlarda ise 259,2'dir [1].

Günümüzde genel olarak kanser tedavisinin temeli, cerrahi, kemoterapi ve radyasyon gibi geleneksel uygulamalar oluşturmaktadır. Geleneksel kemoterapide, ilacın tümör hücreleri için seçici olmaması, bazı fizyolojik engeller nedeniyle tümör bölgesinde yeterli ilaç konsantrasyonuna ulaşılamaması, ilaç direnci ve sistemik toksisite gibi nedenlerle tedavide istenilen başarı elde edilememektedir. Tedavinin etkinliğini artırmak amacıyla araştırmacılar kök hücre tedavisi, gen tedavisi, immünoterapi ve hedefe yönelik tedaviler üzerine yoğun bir şekilde çalışmaktadır [2, 3].

Hedefe yönelik tedavide amaç, ilacın spesifik olarak tümör dokusunda birikmesi ve sağlıklı doku üzerinde en az etkiye neden olacak şekilde tasarlanmasıdır [4]. Bu amaçla polimerik, lipid, metal bazlı birçok nanopartiküler sistemler (nanopartikül, lipozom, dendrimer, nanotüp kuantum noktaları vb.) geliştirilmiş olup, araştırmalar yeni yaklaşımların keşfedilmesiyle devam etmektedir. Bu keşiflerden biri de son yıllarda hücreler, bakteriler ve virüsler gibi biyolojik materyallerin tedaviye yönelik kullanılmalarıdır. Bu materyaller arasında bakteriler, tümör dokusunu spesifik olarak hedefleyebilme yeteneği ile öne çıkmaktadır.

Tümör dokusunun sağlıklı dokulardan ayrılmasına neden olan özellikleri, bakterilerin tümörü hedefleyebilmesini sağlamaktadır. Damar yapısındaki bozukluk, genişlemiş interkapiller boşluklar, tümör tarafından üretilen kemotaksik moleküller ve bağırsıklık sisteminin tümör dokusunda yeterince etkin olmaması gibi özellikler tümöre özgü nitelikler olarak sıralanabilir [5]. Bu durum, anaerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerin solid tümörlerin içinde daha yüksek oranda bulunmasını açıklamaktadır. Araştırmacılar bu durumu bakterilerin kanserin teşhis, görüntüleme ve tedavide kullanılması için bir üstünlük olarak nitelendirmiş ve bu yönde araştırma-

larını genişletmişlerdir [6] (Şekil 1). Bu derlemede bakterilerin kanser tedavisinde kullanım stratejileri, ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmaları ve tedavide elde edilen en güncel sonuçlar tartışılacaktır.



Şekil 1. Bakterilerin görüntüleme, teşhis ve terapötik etki amacıyla kullanımı (BioRender.com ile hazırlanmıştır.)

2. Kanser Tedavisi

Literatürde, kanser tedavisi için konvansiyonel ve modern/yenilikçi yöntemler ile karşılaşılmaktadır. Kanser türü, yerleşim yeri ve bulunduğu evre gibi unsurlar tedavi seçeneklerinin belirlenmesi ve sürdürülmesine rehberlik etmektedir. En yaygın kullanılan geleneksel tedavi yöntemleri cerrahi, kemoterapi ve radyoterapiyken modern yöntemler arasında hormon tedavisi, gen tedavisi, hedeflendirilmiş tedavi ve immünoterapi yer almaktadır.

2.1. Geleneksel Kanser Tedavileri

Solid tümörlerin tedavisinde tümörün rezeksiyonu, kemoterapi ve radyoterapi uygulamaları günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tedavi yöntemlerinin üstünlüklerinin yanında sakıncaları da oldukça fazladır. Tedavide tümör rezeksiyonu çoğu zaman tek başına yeterli olmamaktadır. Yüksek nüks riski, kalıcı şekil bozukluğu ve her tümör grubuna uygulanamaması gibi sınırlamalar cerrahi yöntemlerin başarı oranını azaltmaktadır [7, 8].

Radyoterapi, kanser hücrelerini öldürmek için yüksek dozda genellikle iyonlaştırıcı radyasyon kullanılmaktadır. Tümör dokusunun yanı sıra çevre dokulara verdiği zararlar nedeniyle akut yan etkilerle birlikte kalıcı ve ilerleyen yan etkilere de neden olabilmektedir. Radyoterapide görülen yan etkilere rağmen tüm kanser hastalarının en az % 50'si için tedavinin

önemli bir bileşeni olmaya devam etmektedir [9].

Kemoterapötik ilaçlar, tümör hücreleri ve hızlı çoğalan diğer hücreler (deri, saç, kemik iliği ve gastrointestinal sistem epitelyumu) dahil olmak üzere yüksek bazal proliferasyon ve rejenerasyon özelliğine sahip hücreleri hedeflemektedir. Bu durum, kemoterapi ile tedavi edilen hastalarda yüksek düzeyde toksisiteye neden olmaktadır. Ayrıca konvansiyonel kanser tedavilerini, kardiyotoksiste, nörotoksiste, infertilite, nefropati ve kronik karaciğer hasarı gibi birçok uzun süreli komplikasyon sıklıkla takip etmektedir [7].

2.2. Klasik Tedavilerde Karşılan Zorluklar

Kanser tedavilerinde etkin tedaviye ulaşılması için direkt olarak tümör dokusunu hedefleyen stratejilerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Hedeflemeyle birlikte, uygulanan ilacın dokuya etkili bir şekilde penetre olması ve yeterli konsantrasyonda bulunması, tedaviden en yüksek derecede yararlanılmasını sağlamaktadır. İlacın penetrasyonunun artırılması için tümör dokusunun sağlıklı dokulardan farklarının bilinmesi gereklidir. Bu farklar şu şekilde sıralanabilir (Şekil 2):

- Tümör mikroçevresi: Normal dokularla karşılaştırıldığında tümör stroması, farklı hücre dışı matrisi ve büyüme faktörlerini, kemokinleri, adezyon moleküllerini sentezleyen yüksek sayıda fibroblast bulundurmaktadır.
- Tümör vasküler sistemi: Tümörlerdeki kan damarları genellikle dilate ve kıvrımlıdır. Bu yapılar anormallikler içerir ve geçirgenlikleri farklı olmaktadır. Birçok tümörde kan akışı düzensiz ve değişkendir. Aynı tümör içinde bile vasküler morfoloji ve kan akış hızı, yere ve zamana göre değişebilmektedir. Solid tümörlerde, normal dokulara göre daha az fonksiyonel lenf damarı bulunabilmekte veya bundan yoksun olabilmektedir. Bu durum intertisyel basıncı artırarak daha büyük moleküllerin konveksiyon yoluyla dağılımını engellemekte ve kanın tümörün merkezinden çevreye doğru yayılmasını sağlamaktadır.
- Tümör dokusundaki hipoksi ve asitlik: Tümör hücrelerinin normal hücrelere göre kılcıl damarlardan daha uzak olması hipoksik bölgelerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu bölgelerdeki hücreler canlı olabilmekte, ancak genellikle nekroz bölgelerine bitişik bulunmaktadır. Kan damarlarına yakın tümör hücreleri tedavi ile yok edilse bile, hipoksik olan hücrelere sağlanan besin bu

hücrelerin hayatta kalarak tümörü yeniden oluşturmaya neden olabilmektedir. Buna ilaveten, tümör hücreleri hayatta kalmak ve çoğalmak için ihtiyaç duydukları enerjiyi glikoliz yoluyla elde ederek ortamdaki karbondioksit ve karbonik asit miktarını artırmakta ve böylece çevrelerinde asidik bir pH oluşumunu sağlamaktadır [10, 11].

- Tümör immunosüpresif mikroçevresi: Tümör gelişiminin başlangıcında meydana gelen bileşenler arasındaki etkileşim, oluşan yapının kronik inflamatuvar bir durum gibi gözükmesine neden olmaktadır. Bu durum, tümör hücrelerinin konakçının savunmalarından kaçmasını sağlayarak olası akut inflamatuvar yanıtın engellenmesine neden olmaktadır [12, 13].

2.3. Yenilikçi Kanser Tedavileri

Teknolojik gelişmelere bağlı olarak kanser oluşumunun altında yatan biyolojik süreçlerin keşfedilmeye başlanmasıyla tedavide değişiklikler meydana gelmektedir. Bu değişikliklerin amacı tedavinin etkinliğini artırarak hastaların yaşam sürelerini ve kalitelerini iyileştirmek için yeni yöntemler geliştirmektir [14].

İmmünoterapi, bağışıklık sisteminin kanserle savaşmasına yardımcı olan görece yeni bir tedavi yöntemidir. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından ilk immünoterapötik ilaç 1986 yılında onaylanmasına rağmen immünoterapötiklerin kanser alanındaki etkinliğinin kanıtlanması ve kullanımının yaygınlaşması son on beş yıl içinde gerçekleşmiştir. Şu anda kanser tedavisi için onaylanmış birçok immünoterapötik ilaç bulunmaktadır. Bu ilaçlar, kontrol noktası inhibitörleri, lenfosit aktive edici sitokinler, kimerik antijen reseptör T hücreleri ve diğer hücresel bileşenler, yardımcı uyarıcı reseptörlere karşı agonistik antikolar, kanser aşılı, onkolitik virüsler ve bispesifik antikolar dahil olmak üzere sınıflara ayrılabilir [15]. Birçok grubu içermesine rağmen immünoterapötikler sadece belirli kanser tiplerinde ve az sayıda hasta üzerinde etkili olabilmektedir. Buna ilaveten heterojen yapı, ilaca karşı gelişen direnç mekanizması ve yüksek maliyet gibi sakıncalar da kanserin immünoterapisini sınırlamaktadır [16].

Hormon tedavisi, büyümesi ve yayılması hormonlara bağlı olan belirli kanser türlerini tedavi etmek için hormon miktarını değiştirmeyi esas almaktadır. Bu yöntem meme, üreme sistemi ve prostat kanserlerinin

tedavisinde yaygın şekilde kullanılmaktadır ve ortaya çıkan yan etkiler kanserin türüne, yaşa, cinsiyete ve kullanılan ilaca bağlı olarak değişmektedir [14].

Hedeflendirilmiş kanser tedavisi, tümör dokusu içinde ilacın birikmesini sağlayacak stratejilerin geliştirilmesini içermektedir. Nanoteknoloji bazlı formülasyonlar üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda ilacın tümöre pasif hedeflendirilmesi kavramı ortaya çıkmıştır. Bu hedeflendirme biçiminde tümör dokusundaki bozulmuş damar yapısı ve lenfatik sistemin yokluğu nedeniyle ilacın bu bölgede birikmesi sağlanmaktadır. Bir diğer hedefleme yöntemi olan aktif hedeflendirmede proteinler (antikorlar ve fragmanları), peptitler, nükleik asitler (aptamerler), küçük moleküller (vitaminler) gibi ligandlar kullanılmaktadır. Bu ligandlar, hedef organ, doku, hücre veya hücre altı yapılarda aşırı sunulan yüzey moleküllerine veya reseptörlere bağlanmak üzere seçilmektedir. Hedeflendirilmiş kanser tedavisinde kullanılmak üzere birçok ilaç FDA tarafından onaylanmıştır [17, 18].

2.3.1. Bakterilerin Kanser Tedavisinde Kullanımı

Konvansiyonel kemoterapide kullanılan birçok etken maddenin yarı ömrünün kısa olması, biyolojik dağılımının yeterli olmaması ve vücuttan atılım hızının yüksek olması gibi farmakokinetik özellikleri nedeniyle ilaç formülasyonlarının etkinliği istenilen düzeyde olmamaktadır. Bu nedenle konvansiyonel kemoterapötiklerin yüksek miktarda ve tekrarlanan uygulamalarının yapılması gerekmektedir. Bu durum sistemik olarak dağılımı nedeniyle ciddi yan etkilere neden olmaktadır [19]. Örneğin, yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçlarından doksorubisin kardiyotoksisiteye, sisplatin nefrotoksisiteye ve renal proksimal tüpte hasara neden olmaktadır [20, 21].

Tedavi etkinliğini artırmak ve yan etkileri azaltmak üzere son zamanlarda yapılan araştırmalarda özel olarak tasarlanmış, hedeflendirilmiş çok fonksiyonlu ilaç taşıyıcı sistemlerle tümör hücrelerinin tespit edilerek yok edildiği umut verici sonuçlar elde edilse de, protein adsorpsiyonu, fagositoz gibi fizyolojik engeller ve akış, kayma kuvveti gibi nanopartikülün tümöre difüzyonunu veya dağılımını önleyen fiziksel engeller nedeniyle sonuçlar hala istenen düzeyde değildir. Buna ilaveten, tümör mikroçevresinin özelliklerinin (düşük pH, hipoksi, artmış interstisyel basınç, rijit tümör stroması) ilaçların permeabilitesini azalttığı ve heterojen bir dağılıma neden olduğu tespit edilmiştir. Bu kapsamda yapılan araştırmalardan elde edilen bulgular değerlendirildiğinde intravenöz

yol ile uygulanan hedeflendirilmiş nanopartikül miktarının ortalama olarak ancak yaklaşık % 1'inin tümöre ulaştığı bildirilmiştir. Bu durum, araştırmacıları kemoterapötik yüklü nanopartikül sistemlerinden daha da ileri bir strateji olarak kanser tedavisinde bakterilerin uygulanması gibi yöntemlerin araştırılmasına yönlendirmiştir [22].

Literatürde tümör bölgesinde gram pozitif ve gram negatif bakterilerin izole edildiği bildirilmiştir. Buna ilave olarak, vücuda verilen bakterilerin sağlıklı dokulardan ziyade tümör bölgelerinde birikip büyüdüğü gözlenmiştir. Araştırmacılar bu durumun nedenini, tümör mikroçevresinin bakterinin hayatta kalması için uygun bir ortam sağlaması olarak açıklamıştır [23].

Bakterinin tümör dokusu içinde daha derine penetre olmasını sağlayan özelliği motilitesidir. Kemoterapötik ilaçlara özgü pasif dağılım ve sınırlı penetrasyonun aksine, bakteriler çevrelerindeki ortamdan enerji elde edebilen karmaşık yapıdaki canlı organizmalardır. Sistemik uygulamayı takiben bakteriler, kendilerini tümör dokusu içinde dağıtmak ve damar sisteminden aktif olarak uzaklaşmak için kendi enerjilerini ve itme yeteneklerini kullanabilmektedir [24]. Bakterilerin tümör dokusundaki ilerleme mekanizmaları spesifik kemotaksis, tercihli büyüme ve hipoksik çimlenme olmak üzere üç mekanizma ile açıklanmaktadır [25].

Tümör mikroçevresinde salınan kimyasal moleküllerin kemotaksiye neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, aspartat reseptörü, serin reseptörü, riboz/galaktoz reseptörü gibi kemoreseptörlerin fakültatif anaerob *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) bakterilerinin tümörün farklı bölgelerine yönlendirilmeleri üzerine etkileri olduğu kanıtlanmıştır [26, 27].

Zorunlu anaerobik bakteriler yaşamak için oksijene ihtiyaç duymadıklarından tümör bölgesinin hipoksik bölgelerine doğru hareket ederler. *Clostridium* ve *Bifidobacterium* bu bakterilere örnek olarak verilebilmektedir. *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *S. typhimurium* gibi fakültatif anaerobik bakteriler ise besin açısından zengin ortamı algılayarak tümörlerin hem iç hem de periferik alanlarında birikme eğilimi göstermektedir. Ek olarak, tümör bölgesinde gözlenen immünoşüpresif etki nedeniyle, tümörde kolonize olan bakteriler makrofaj ve nötrofiller tarafından temizlenememektedir. Chen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada tümörlü dokuya sahip farelere bakteri enjeksiyonu yapılmıştır. Enjeksiyondan sonraki üçüncü günde tümördeki bakteri sayısının diğer

4.1. Salmonella

Salmonella, kanser tedavisi çalışmalarında en yaygın kullanılan anaerobik bakteri türüdür. *Salmonella*'nın, yüzeyinde bulunan kimyasal reseptörlerin modifiye edilmesi ile besin açısından zengin tümör bölgelerine girebileceği gösterilmiştir. Fakültatif anaerobik bakteriler, sadece solid tümörlerin nekrotik ve anaerobik merkezini değil, aynı zamanda tümör dokusunun iyi perfüze edilmiş çevresini de potansiyel olarak kolonize edebildiğinden, bu bakterilerin zorunlu anaeroblara göre üstünlük gösterebileceği bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada fakültatif anaerob *S. typhimurium*, kanser tedavisi için kullanılacak pürin ve diğer oksotrofik mutasyonlar ile zayıflatılmıştır. Çalışmada bakterinin normal dokularla karşılaştırıldığında tümörde 1000 kat daha fazla çoğaldığı bildirilmiştir [36].

S. enterica serovar typhimurium VNP20009, *S. typhimurium*'un zayıflatılmış bir oksotrofik mutantıdır. İki genin silinmesi ile meydana getirilen bu suş, bakterinin hayatta kalabilmesi için dış pürin kaynaklarına bağımlı hale gelmesine neden olmuştur. Bu bağımlılık bakterinin normal dokularda çoğalamasını, solid tümörleri ve metastatik kanseri etkili bir şekilde hedeflemesini, iyi bir güvenlik profiline ve etkili tümör penetrasyon özelliğine sahip olmasını sağlamıştır [31, 37].

S. typhimurium bakterisinin farklı suşlarının baş ve boyun kanseri, pankreas kanseri, metastatik melanoma, karaciğer kanseri ve spesifik olmayan solid tümörler üzerindeki klinik çalışmaları devam etmektedir [24].

4.2. Escherichia

Escherichia gram negatif, spor oluşturmeyen bir bakteri türüdür. Bu türün en çok bilinen üyesi *E. coli*, kanser tedavisi alanında giderek daha fazla ilgi gören fakültatif anaerobik bir bakteridir. *E. coli*, nekrotik olmayan ve metastatik tümör bölgelerine hedeflenebilmekte ve normal organlardan hızla temizlenebilmektedir. *E. coli*'nin üstünlüğü, suşların çoğunun patojenik olmaması ve çeşitli antitümör proteinleri yüksek oranda eksprese edebilmesidir [28, 38, 39].

E. coli, insan bağışıklık sisteminin uyarılmasını sağlayabilmektedir. *E. coli* gibi bazı bakteriyel enfeksiyonların, sitotoksik CD8⁺ ve CD4⁺ T hücrelerinin uyarılmasını ve tümör hücrelerine çekilmesini sağlayarak tümörü baskıladığı belirtilmiştir [40].

4.3. Clostridium

Clostridium ailesinin üyeleri, patojenik olabilen ve spor oluşturabilen gram pozitif, zorunlu anaeroblardır [41]. *Clostridium* türleri, ilaç taşıyıcı sistemlerde hedeflendirme ajanı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Patojenik *Clostridium* türlerinin birçok türü tümör dokularında incelenmiştir. *Clostridium perfringens*'in, hedef hücrede claudin-3 ve claudin-4'e bağlanarak epitel hücrelerinde sıkı bağlantıyı parçalayabilen CPE enterotoksin ürettiği ve antitümör aktivite sergilediği bulunmuştur. Bir başka tür olan *C. novyi* önemli antitümör etki göstermesine rağmen deney hayvanlarında ölüme neden olmuştur. Araştırmacılar bu durumu engellemek amacıyla öldürücü toksini kodlayan geni silerek *C. novyi*- NT suşunu elde etmiştir [42].

Yapılan bir çalışmada *C. novyi*- NT sporlarının intratümoral veya intravenöz uygulamasının, doğal katil hücre ve benzeri yapıların aktivitesini artırdığı, inflamatuvar yanıtları indükleyerek tümör hücrelerinin baskılanmasına neden olduğu bildirilmiştir [31]. Bu sporların sadece oksijen yokluğunda filizlenebilmesi, solid tümörler ve nekrotik alanlarda kolonize olabileceğini göstermiştir.

4.4. Bifidobacterium

Bifidobacterium, patojenik olmayan, hareketsiz ve spor oluşturmeyen gram pozitif zorunlu anaerob bakteridir. *Bifidobacterium* türleri, kanser tedavisinde kullanım için önemli özelliklere sahiptir. İlk olarak, çoğu *Bifidobacterium* insan bağırsağının doğal, zararsız florasıdır. Bazı *Bifidobacterium* suşlarının probiyotik olduğu gösterilmiştir ve insanlarda oral kullanımları yaygındır. Diğer bir özelliği ise, çeşitli *Bifidobacterium* türlerinin, intravenöz uygulamadan sonra tümörlere seçici olarak lokalize olmasıdır. Bunların yanı sıra Bifidobacterium suşları peptidoglikan bakımından zengin yüzeyi nedeniyle kimyasal modifikasyonlara uygundur ve ilaç taşıyıcı sistem olarak da kullanılabilir [41, 43].

4.5. Listeria

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*), hem hayvanlarda hem de insanlarda listeriyozise neden olan gram pozitif bir bakteridir [44]. Yapılan çalışmalarda *L. monocytogenes*'in kanser tedavisinde kullanılmasını destekleyebilecek birçok özelliği bulunmuştur. *Listeria* türleri, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidazın aktivasyonuna ve hücre

içi kalsiyum seviyelerinin artmasına neden olarak tümör hücrelerini doğrudan öldürebilmektedir. Bunun yanı sıra *Listeria* bakterileri, tümör hücrelerinin immün sistem tarafından algılanarak etkili bir şekilde öldürülmesini sağlamaktadır [24].

5. Bakterilerin Kanser Tedavisinde

Kullanım Stratejileri

5.1. Zayıflatılmış veya Değiştirilmiş Canlı

Bakteriler

19.yy'dan itibaren yapılan araştırmalarda başarılı sonuçlar elde edilmesine paralel olarak enfeksiyonla ilişkili toksisiteler ve bazı olgularda istenilen düzeyde antitümör etkinliğin elde edilememesi gibi istenmeyen durumlar, araştırmacıları bakteriler üzerinde yapılabilecek değişikliklere yönlendirmiştir. Bu değişiklikler;

- bakterinin zayıflatılmış suşlarının hazırlanması,
- toksisiteyi azaltmak için patojenleri kodladığı bilinen genlerin silinmesi veya kısıtlanması,
- tümöre özgü toksik proteinleri ve tümörle ilişkili antijenleri üretmek üzere tasarlanmış genetik kodların bakteri kromozomlarına entegre edilmesi,
- DNA/RNA iletimi için gen taşıyıcı olarak bakterilerin değiştirilmesi,

olarak sayılmaktadır [45].

Canlı, zayıflatılmış veya genetik olarak değiştirilmiş patojenik olmayan bakteriler, ya doğrudan tümör öldürücü etkiler sağlamak ya da tümör öldürücü molekülleri oluşturmak üzere potansiyel antitümör faktör olarak kullanılmaktadır [31].

Araştırmalarda hem güvenliği hem de etkinliği artırmaya yönelik diğer bir strateji ise özel algılama yeteneklerine sahip değiştirilmiş bakteri türlerini geliştirmektir. Bu tür bakteriler, sensörleri aracılığıyla çeşitli ortamları akıllı bir şekilde algılayabilmekte ve bunlara yanıt verebilmektedir. Böylece bakteri içerdiği ilaçları serbest bırakmak veya programlanmış ölümü gerçekleştirmek gibi aktivitelerde bulunabilmektedir [46].

Diğer bir strateji, sistemik olarak uygulanan bakterilerin sistemik olarak uygulanan ön ilacı, tümör dokusunda aktif bileşiğe dönüştürebilen bir geni/enzimi

taşımak amacıyla kullanmasıdır. Bir başka deyişle, bakteriyel sistemlerin terapötik amaçlar için kullanımına ek olarak genlerin ve ürünlerinin taşınması için bu sistemlerde genetik değişiklikler yapılabilmektedir [47, 48].

Genetiği değiştirilmiş bakteri kanser tedavisinin yanı sıra birçok alanda da kullanılmaktadır. Bu alanlar;

- *E. coli* Nissle 1917 suşunun fenilalanin liyaz enzimlerini salarak fenilketonüriinin tedavisinde kullanılması [49],
- Değiştirilmiş *Lactococcus lactis*'in antiinflamatuar sitokin interlökin-10'u salgılayarak enflamatuar bağırsak hastalıkları, ülseratif kolit ve Crohn hastalığının tedavisinde kullanılması [50],
- Değiştirilmiş *Lactobacillus reuteri*'nin kemokin CXCL12 üreterek yara iyileşmesini hızlandırma da kullanılması [51],

olarak sıralanabilir [52].

5.2. İmmünoterapötik Faktörler Olarak Bakteri Yapıları

Kanser tedavisinde uzun yıllardır kemoterapi ve radyoterapi birlikte kullanılmaktadır. Bu terapiler genelde önemli fayda ve iyileştirme sağlasa da, tümör hücrelerinin bir bölümünde ilaca direnç mekanizmalarının gelişmesinden kaynaklanan tümör nüksü hala önemli bir sorundur. Bu nedenle, dirençli tümör hücrelerini ortadan kaldırmak için immünoterapi gibi terapötik yaklaşımlar araştırılmaktadır [53].

Bağışıklık sistemi, tümörleri tanıyabilir ve birçok yeni oluşan malign hücreyi ortadan kaldırabilir. Bununla birlikte, tümörler bağışıklık sisteminden kaçmak için yöntemler geliştirir ve tümör mikroçevresi bağışıklık baskılayıcıdır [54]. Bakterilerle kanser tedavisinin kanser hücrelerine doğrudan sitotoksik olarak etki ettiğine dair bulgular elde edilmesine ilave olarak, bu tedavinin tümörün büyümesine karşı koymak üzere bağışıklık sistemi hücrelerini modüle ettiğini gösteren birçok araştırma da bulunmaktadır. Coley'in yaptığı çalışmalarda biyogüvenlik sorunlarının bakteriler üzerinde yapılan değişiklik ve zayıflatma ile giderilmesi yaklaşımı, immünoterapötik açıdan tedavi potansiyelinin düşmesine neden olacağı endişelerini beraberinde getirmiştir [46]. Felgner ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada shikimate yolağındaki genlerin mutasyonları ile *Salmonella*'nın zayıflatılmış bir suşu oluşturulurken immünojenitesinin artırılması sağlanabilmiştir [55].

Hu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Salmonella*, katyonik bir polimer (çapraz bağlı β -siklodekstrin-PEI600) ve DNA yüklü nanopartiküller ile kaplanmıştır. Pozitif yüklü nanopartiküller *Salmonella* yüzeyine kendiliğinden birleşerek bir araya getirilmesi ile oluşturulmuştur. Oral yolla uygulanan bu hibrit sistem T hücresi aktivasyonu ve sitokin üretimine neden olarak tümör büyümesini başarılı bir şekilde inhibe etmiştir [56].

5.2.1. Bakteri Sporları

Kanser tedavisinde temel hedeflerden biri kanser hücreleri için toksik olan antikanser ilaçların normal dokular için toksik olmamasının sağlanmasıdır. Bu tür antikanser ilaçları tümör hücrelerine taşımak için viral vektörlerle denemeler yapılmıştır. Bu denemelerde, viral vektörlerin tümöre spesifikliğinin olmaması ve tümör kitlesinde dağılım seviyelerinin düşük olması gibi sakıncalarının olduğu bildirilmiştir [57].

1–2 mm³'ten daha büyük tümörlerde oksijen ve besinlerin tümörün merkezindeki hücrelere iletilmesi zordur. Bu durum, tümöral anjiyojenezin başlamasına neden olan hücreselel hipoksiye neden olmaktadır. Genelde neoanjiyojenez neoplastik hücrelerin büyümesini karşılayamamaktadır. Bu nedenle, oksijen ve besin maddeleri yeterli düzeyde tümör hücrelerine iletilmemektedir. Bu durum genel olarak tümör içinde düşük oksijen seviyelerine ve aşırı derecede hipoksik bölgelere neden olmaktadır [58].

Spor oluşturan anaerobik bakteriler, yüksek oranda oksijen içeren ortamlarda çoğalamaz ve tümörün hipoksik-nekrotik bölgelerinde kolonize olurlar. *Clostridium*, zorunlu anaerobik, gram-pozitif, çubuk şeklinde sporlanan bakterileri içeren en büyük prokaryotik türlerden biridir. *Clostridium tetani*, *C. botulinum*, *C. difficile* ve *C. perfringens* gibi güçlü toksinler üreten çeşitli patojenler bu türün üyelerindedir. Bununla birlikte, *Clostridium* türlerinin çoğu, patojenik olmayan, toprakta zararsız olarak bulunan bakterilerdir [58, 59].

C. novyi-NT, *C. novyi*'nin α -toksin geninin silinmesi ile oluşturulmuş bir suştur. Tedaviye dirençli solid tümörü olan hastalar üzerinde yapılan faz I klinik çalışmada 24 hastaya *C. novyi*-NT suşu intratümoral enjeksiyonla uygulanmıştır. 3 farklı dozun dendiği çalışmada 10 hastada (% 42) tüm dozlarda enjekte edilen *C. novyi*-NT'nin, lizis ile geçici sistemik sitokin ve tümör spesifik T-hücresi cevabına yol açtığı bildirilmiştir [60].

5.2.2. Dış Zar Vezikülleri

Hem patojenik hem de komensal gram- negatif bakteriler, normal büyümelerinin bir özelliği olarak dış zar vezikülleri (DZV) üretmektedir. DZV, boyutu yaklaşık 20 nm ila 250 nm arasında olan iki katmanlı, küresel şekilde yapılardır. Bakteri zarı proteinleri tarafından düzenlenebilen bir işlem sırasında bakteri zarından salınmaktadır. Proteomik ve biyokimyasal analizler, DZV'nin DNA, RNA, lipopolisakarit, proteinler, enzimler ve peptidoglikan dahil olmak üzere çok sayıda bakteri bileşeni içerdiğini ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle, DZV, ana bakteri içinde bulunan, ancak replikatif olmayan bir formda bulunan biyolojik materyalin çoğunu içerir [61, 62].

DZV konakçı hücrelere adezyonu sağlayabilen yüzey faktörleri dahil olmak üzere çeşitli bakteri proteinleri, virülans faktörleri taşımaktadır. Ayrıca zar yapısı, güçlü enflamatuvar yanıtları ortaya çıkarmak için Toll benzeri reseptörleri aktive edebilen lipopolisakarit ile kaplıdır [63]. Yapılan bir çalışmada immünosupresif bir yapıda bulunan tümör mikroçevresinin DZV ile uyarılması sağlanmıştır [64]. Bir başka çalışmada, bakteriyel DZV'nin tek başlarına uygulandıklarında spesifik olarak tümör dokusunu hedefledikleri, burada biriktikleri gösterilmiştir. DZV'nin tümör mikroçevresinde antitümör sitokinler (CXCL10 ve IFN- γ) üreterek antitümör tepkileri tetikledikleri gösterilmiştir. Çalışmanın sonucunda önemli yan etkiler olmadan tümör dokusunun tamamen yok edilmesini sağlayan uzun süreli bir immün yanıtın oluştuğu gözlenmiştir [65].

5.2.3. Bakteriyel Toksinler

Birçok patojen bir konakçıyı enfekte ederken hayatta kalmak için konakçının sinyal iletim yollarını değiştirmektedir. Bakteriyel toksinlerin çoğu, bakteriyel kromozomal genler, plazmitler veya fajlar tarafından kodlanan proteinlerdir [66].

Antitümör aktiviteye sahip bakteriyel toksinler, tümör yüzey antijenlerine konjuge olan toksinler ve ligandlara konjuge olan toksinler olarak sınıflandırılabilir. Kanser hücreleri genellikle hücre yüzeyinde çok sayıda tümöre özgü antijen bulundurmaktadır. Difteri toksini gibi bazı toksinler yüzey reseptörlerine bağlanır ve daha sonra aktive olur. *Corynebacterium diphtheria*, *C. perfringens* ve *Pseudomonas aeruginosa* kaynaklı Difteri toksini, *C. perfringens* enterotoksin ve *Pseudomonas* ekzotoksin A gibi bakteriyel toksinler tümör hücrelerine hedefli toksin olarak kullanılmıştır [67].

Yapılan bir çalışmada, *C. perfringens* tarafından üretilen enterotoksin, kolorektal kanserleri tedavi etmek için değerlendirilmiştir. Kolon karsinomu ve diğer epitelyal tümörler hücre yüzeyinde yüksek düzeyde claudin-3 ve/veya claudin-4 bulundurduğu için, spesifik olarak claudin-3 ve/veya claudin-4'e bağlanan bu enterotoksin hücrel osmotik dengenin kaybıyla birlikte hücre lizisine yol açmıştır. Çalışmada enterotoksinin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda etkili bir antikanser faktör olduğu gösterilmiştir [68].

6. Bakteriler ile Kombine Tedaviler

Kanser tedavisinde tümör mikroçevresi, gen mutasyonları, tolerans, difüzyon ve nüks gibi pek çok faktör göz önüne alındığında tek bir tedavi ile başarıya ulaşılmasının güç olduğu belirtilmiştir. Örneğin, konvansiyonel sitotoksik terapi, nanoterapi ve immünoterapi genellikle tümörleri tamamen ortadan kaldıramamakta, hatta bazen tümörleri dirençli hale getirebilmektedir. Bu durumun önüne geçmek ve sinerjik etki elde etmek amacıyla kombinasyon tedavileri önerilmiştir [69].

Fotodinamik/fototermoterapi, girişimsel olmayan özelliği ve lokal uygulanabilmesi nedeniyle son yıllarda nispeten küçük deri altı solid tümörleri için umut verici bir kanser tedavisi haline gelmiştir. Bununla birlikte, tümör dokularının hipoksik, asidik, besin açısından yetersiz ortamları ve fototermal tedavi reaktiflerinin (FTR) hedefleme kapasitesinin düşük olması bu yöntemin sakıncaları olarak bildirilmiştir [70]. Chen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, FTR'lerin tümördeki birikimini artırmak amacıyla FTR maddesi polidopamin, *Salmonella* yüzeyine kaplanarak formülasyon hazırlanmıştır. Farelerle yapılan *in vivo* deneylerde sistemik enjeksiyonun ardından uygulanan 5 dakikalık yakın kızılötesi lazer ışın tedavisi ile tümör bölgesinde 55°C sıcaklığa ulaşılmıştır. Araştırmacılar, 90 günlük deney sırasında belirgin bir tümör nüksi veya metastazı olmaksızın tümörde yüksek oranda gerileme gözlemlendiğini belirtmiştir [71].

Radyonüklid tedavisi, radyasyonun tümöre seçici olarak iletilmesi için radyoaktif maddelerin kullanılmasını esas almaktadır. Radyonüklid tedavisinde radyoaktif maddelerin hedeflendirme ajanlarıyla birlikte kullanımı başarılı bir tedavi uygulanmasını sağlamaktadır [72]. Yapılan bir çalışmada, *L. monocytogenes* ile ¹⁸⁸Rhenium radyoaktif maddesinin bağlanması sonucu elde edilen sistem, metastatik

pankreas modeli oluşturulan farelerde incelenmiştir. Çalışmada, sağlıklı hücrelere zarar vermeden tümör dokularında radyoaktivite sağlandığı bildirilmiştir [73].

7. Bakteri Destekli İlaç Taşıyıcı Sistemler

7.1. Bakteriyel Mikrorobotlar

Mikrorobotlar; mobilite, algılama ve tanımlanmış görevleri yerine getirme gibi özelliklere sahip olan mikro boyutlardaki makineler olarak tanımlanabilmektedir [69]. Mikrorobotik sistemler, aktif hareketliliği sağlamak için kimyasal, ışık ve manyetik enerji gibi farklı enerji kaynaklarını kullanır. Bu durum mikrorobotların, merkezi sinir sistemi gibi daha önce erişilemeyen veya erişilmesi zor olan vücut bölümlerinde dolaşmalarını sağlamaktadır. Böylece, otonom veya uzaktan kontrol ile hedef bölgeye terapötik maddelerin taşınmasını gerçekleştirirler [19, 70].

Mikrorobotik tasarımlar sentetik ve biyohibrit mikrorobotlar olarak iki ana gruba ayrılabilir. Bakteriler ilaç yükleme ve hedefleme için kullanılabilirlerinden canlı mikrorobotlar olarak kabul edilmektedir [71]. Bakteriler, kimyasal enerjiyi mekanik işe dönüştürerek tümör mikroçevresinde ilerleyebilir. Bakterilerin ilerleme yönlerine sıcaklık, pH, oksijen ve farklı kimyasal çekici maddeler etki edebilmektedir. Bu nedenle, bakteriyel mikrorobotlar, ilaç taşıyıcı sistemler içinde biyohibrit mikrorobotların önde gelen bir grubudur [72]. Darnton ve arkadaşları flagella yapısına sahip bir bakteri olan *Serratia marcescens* türünün taşıyıcı olarak kullanılmasını araştırmıştır [73].

Nanopartiküler sistemler, yüksek ilaç yükleme kapasiteleri, azaltılmış sistemik toksisite, kanserli dokularda birikiminin sağlıklı dokuya oranla daha yüksek olması ve terapötiklerin biyoyararlanımının korunması gibi nedenlerle kanser tedavisinde halihazırda kullanılmaktadır [74]. Ancak, çeşitli fiziksel ve biyolojik engeller nanopartiküllerin tümör dokusunda yeterince penetre olarak etkili olmasına neden olmaktadır. Nanopartiküller tümörlerin hipoksik alanlarından ziyade tümörün periferinde birikmektedir [75]. Bakterilerin antikanser etkileri üzerine yapılan çalışmalarda, bakterilerin tek başına kullanımının genellikle yetersiz kaldığı görülmüştür. Yapılan araştırmalarda bakterilerin kanser hücrelerini hedefleme özelliği kullanılarak sitotoksik ajanlar-

la birlikte kullanımının sinerjik terapötik etkiyi sağladığı bildirilmiştir (Şekil 3) [76].

Çeşitli aktif bileşenlerin hedeflendirilmesi ve taşınması için bakteriler, lipozom, polimerik nanopartikül, hidrojeller, mikropartiküller ile bir araya getirilerek biyohibrit mikrorobotlar oluşturulmuştur (Tablo 1). Hazırlanan mikrorobotlar kanserin teşhis, tedavi, görüntülemesinde ve kanser aşılarının hazırlanmasında kullanılmıştır [77].

Zoaby ve arkadaşları, *S. enterica serovar typhimurium* LT2'ye doksorubisin yüklü lipozomları elektroporasyon yöntemi ile yüklemiştir. Çalışmada Salmonella'ya karşı antibakteriyel etkiye sahip olan doksorubisinin bakterileri konsantrasyona bağlı olarak öldürdüğü anlaşılmıştır. Araştırmacılar, tümör dokusunda salınan lipozomların, hem bakterinin hem de kanserli hücrelerin ölümüne neden olarak yüksek terapötik aktivite gösterdiğini bildirmiştir [78].

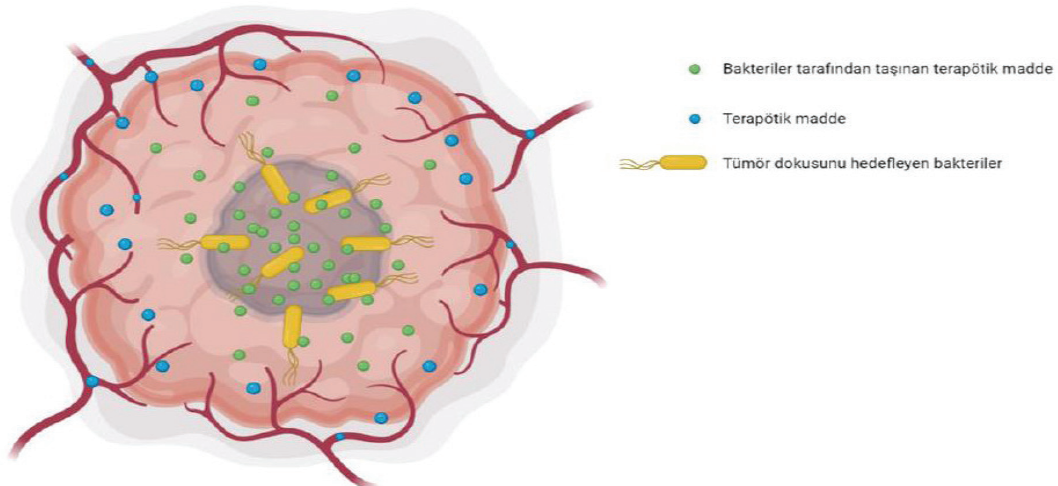
E. coli Nissle 1917 bakterisini kullanan Xie ve arkadaşları, bakteri yüzeyine bağladıkları doksorubisin yüklü amfifilik kopolimerler ile meme kanseri 4T1 hücreleri üzerinde bir araştırma yapmıştır. Çalışmada tümör dokusunun asidik özelliğinden yararlanılarak bakteri yüzeyine konjuge edilmiş etken maddenin salımının gerçekleştiği belirtilmiştir [79].

7.2. Bakteriyel Hayaletler

Bakteriyel hayaletler, Gram-negatif bakterilerin canlı olmayan hücre zarflarıdır. Hücrenin biyoadhezi özellikleri dahil olmak üzere hücre morfolojisi ve doğal yüzey antijenik yapılarını koruyan hayaletlerin sitoplazmik içerikleri bulunmamaktadır. Bakteriyofaj ϕ X174'ten klonlanmış gen E'nin ekspresyonu, Gram-negatif bakterilerde hücre lizisine neden olmaktadır. Bakteri hücrelerinin iç ve dış zarlarının füzyonu ile bakterinin tüm sitoplazmik içeriğinin dışarı atıldığı zarlar arası bir tünel oluşturmasına neden olurken, iç ve dış zar yapıları korunmaktadır. Bakteriyel hayaletlerin patojenik forma dönüş riski bulunmamaktadır [80, 81].

Bakteriyel hayaletler patojen bakteri hücre duvarında lipopolisakkarit, lipoprotein, peptidoglikan ve fimbria gibi moleküler yapıları bulundurmaktadır. Bu nedenle, bakteriyel hayaletler tedavide tek başına bir adjuvan olarak veya ilaç- gen tedavisinde için taşıyıcı sistem olarak kullanılabilir [82, 83].

Bakteriyel hayaletler konağa girdikten sonra, immün hücreler üzerindeki patojenle ilişkili moleküler yapıları tanıyan reseptörler tarafından tespit edilerek immün sistemin aktivasyonuna sebep olmaktadır. Bakteriyel hayaletlerin hedeflenebilmesi ve intrinsik adjuvan özellikleri, geleneksel bakteri aşılara göre daha güvenli ve etkili aşılardan hazırlanmasını sağlamaktadır [83].



Şekil 3. Sistemik olarak enjekte edilen serbest terapötik ve bakteriye bağlı terapötik maddelerin tümör dokusundaki dağılımının şematik gösterimi (BioRender.com ile hazırlanmıştır).

Tablo 1. Bakterilerle hazırlanan çeşitli mikrorobotik sistemler.

Bakteri Türü	Terapötik Ajan/ Nanosistem	Hazırlanış Yöntemi	Elde Edilen Çıktılar	Ref.
Bifidobacterium infantis	Paklitaksel/ Polidopamin Kaplı Nanopartikül	Poli(etilen glikol)-poli(ϵ -kaprolakton) kopolimeri ile hazırlanan paklitaksel yüklü nanopartiküller polidopamin ile kaplanmıştır. Nanopartiküller, bakteri süspansiyonu içinde inkübe edilerek bakteri yüzeyine adezyonları sağlanmıştır.	Hazırlanan formülasyon “nude” farelerde A549 ksenogreftlerin büyümesini önemli ölçüde inhibe etmiştir. Sistemik veya lokal toksisite gözlenmemiş ve paklitaksel formülasyonlarına kıyasla farelerin yaşam süresini uzatmıştır.	[84]
E. coli Nissle	Dokсорubisin ve klorin e6, Ce6/ Metal-organik çerçeve	Antikanser bir ilaç olan dokсорubisin ve ışığa duyarlılaştırıcı özellikteki klorin e6, Ce6 maddesi zeolitik imidozalat çerçeve-8 içinde hazırlanmıştır. Bakteri ile bir araya getirilmesinde biyomimetik mineralizasyon yöntemi kullanılmıştır.	4T1 meme tümörü taşıyan farelerde kuyruk veninden enjeksiyonla uygulanan formülasyonun serbest E. coli'ye kıyasla daha çok tümör bölgesinde biriktiği tespit edilmiştir. Formülasyon uygulamasından 24 saat sonra lazer uygulaması gerçekleştirilen deney grubunda tümör büyümesinin daha fazla inhibe edildiği kanıtlanmıştır.	[85]
E. coli MG1655	Dokсорubisin/ Polielektrolit çok tabakalı nanoyapı	Polistiren çekirdek yapısı üzerine polikasyon ve polianyonlarla Fe ₃ O ₄ ve dokсорubisin çok tabakalı kaplama tekniğiyle hazırlanmıştır. Yüzey yükünün ayarlanması ile bakteri yüzeyine kovalent olmayan bir bağlanma gerçekleştirilmiştir.	4T1 meme kanseri hücre hattı üzerinde yapılan çalışmalarda kemotaksi ve harici bir manyetik alan ile yönlendirme yapılabildiği kanıtlanmıştır. Partikülü oluşturan viskoelastik yapının daha sert olmasının bakteriyel bağlanma verimini artırdığı belirtilmiştir. Ortamın asitliğinin artmasının dokсорubisin salımını artırdığı gözlenmiştir.	[86]
S. typhimurium	Paklitaksel/ lipozom	Lipozomlar, ince film hidrasyonu ve sonikasyon yöntemi kullanılarak hazırlanmış, biyotin- streptavidin bağı ile bakteri yüzeyine konjuge edilmiştir.	Sağlıklı hücre (NIH/3T3) ve tümör hücre (4T1) hatları üzerinde yapılan çalışmalarda bakteri hareketliliği ve formülasyonun terapötik etkisi değerlendirilmiştir. Mikrorobotların hızı 3.09 ± 0.44 $\mu\text{m/s}$ iken ilaç yüklü lipozomların hızı 0.40 ± 0.14 $\mu\text{m/s}$ olarak bulunmuştur. IC ₅₀ değeri incelendiğinde mikrorobotların lipozomlara kıyasla yaklaşık % 30 daha fazla sitotoksik olduğu bildirilmiştir.	[87]
S. typhimurium VNP 20009	-/Polimerik Nanopartikül	Poli (laktik-ko-glikolik asit) nanopartikülleri nanopresipitasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Nanopartiküllerin içine görünümlenme amacıyla floresan TIPS pentasen boyası yüklenmiştir. Nanopartiküller biyotin- streptavidin bağı ile bakteri yüzeyine konjuge edilmiştir.	HCT-116 insan kolon karsinomu, U87MG insan glioblastomu veya 4T1 murine meme karsinomu ile hazırlanan tümör sferoidleri üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Penetrasyon, kolonizasyon ve dağılım açısından değerlendirilen formülasyonun, nanopartiküllerin tümör içi iletimini yaklaşık yüz kat artırdığı gözlenmiştir.	[88]
Shewanella oneidensis MR-1	Dokсорubisin/ Metal-organik çerçeve	Bakterinin yüzeyinin pozitif yüklenmesi için poliallilamin hidroklorür, nanopartiküllerin yüzeyinin negatif yüklenmesi için hyalüronik asit kullanılmış ve bu iki yapının entegrasyonu sağlanmıştır.	Dokсорubisine dirençli 4T1 meme tümörü taşıyan fare modelinde formülasyon kuyruk veninden enjeksiyon ile uygulanmıştır. Serbest ilaca oranla % 50,7 daha fazla antitümör aktivite göstermiştir.	[89]

Bakteriyel hayaletler, domuzlarda yüksek ölüm oranına neden olan domuz plöropnömonisine karşı bir aşı olarak araştırılmıştır. Domuzların *A. pleuropneumoniae* ile kas içi aşılması sonucu hastalık için klinik koruma sağlanmıştır. Bakteriyel hayaletler ile aşılamanın klinik yan etkilere neden olmadığı, aşılama sonrası hayvanların akciğer lezyonlarına karşı tamamen korunduğu ve akciğer ile bademciklerde kolonizasyonun önlediği bildirilmiştir. Hayalet aşının

çapraz koruma potansiyeli endikasyonları, tavşan hiperimmün serumları üzerinde yapılan çalışmalarda desteklenmiştir [81].

Bakteriyel hayaletler nükleik asitler, proteinler ve etken maddelerin taşınmasında etkili bir taşıyıcı sistem olarak bildirilmiştir. Kemoterapötik ilaçları, tümör hücresi çoğalmasını engellemeye yetecek seviyelerde doğrudan hedef hücrelerin sitozolüne taşıyan bakteriyel hayaletlerin, kullanılan ilaç dozunun

azaltılmasını sağlayarak yan etki profilini düşürdüğü gösterilmiştir [90].

Kolorektal kanser hücre hattı (CaCo-2) üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, doksorubisin yüklü bakteriyel hayaletler ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmıştır. Bakteriyel hayaletler *Mannheimia haemolytica* türünden hazırlanmıştır. Doksorubisin yüklü hayaletlerin *in vitro* salım profili değerlendirildiğinde yüklenen ilacın yavaş bir salım gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Sitotoksikite deneylerinde doksorubisin hayaletlerinin aynı konsantrasyonda serbest doksorubisinden iki kat daha fazla sitotoksik olduğu belirtilerek Caco-2 hücreleri üzerinde güçlü antiproliferatif aktivite gösterdiği bildirilmiştir [91].

Doğal bir biyoaktif taşıyıcı sistem olarak bakteriyel hayaletler, mukozal uygulama (burun boşluğu, gastrointestinal sistem ve oküler uygulama) ve intravenöz enjeksiyon dahil olmak üzere çeşitli şekillerde uygulanabilmektedir [80]. *E. coli K12*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Erwinia cypripedii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutropha*, *S. typhimurium* ve *Vibrio cholerae* gibi birçok bakteri türünden bakteriyel hayalet oluşturulmuştur [81].

8. Klinik Denemeler

Son yıllarda birçoğu hayvan modellerinde olmak üzere, bakterilerin terapötik amaçla kullanılmasına yönelik olarak yapılan çalışmalardan umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, bakteriyel terapötiklerin klinik aşamalara taşınması için regülasyon ve standardizasyon gibi önemli problemlerin çözülmesi gerekmektedir.

William B. Coley'in 1891'de canlı bakterileri insan üzerinde ilk kez uygulamasından bugüne kadar birçok bakteri suşu çeşitli solid tümöre sahip kanser hastalarında değerlendirilmiştir. *S. Typhimurium*, *C. novyi-NT* ve *L. monocytogenes* klinik çalışmaları bulunan bakteri türlerinden bazılarıdır. Metastatik melanoma, baş ve boyun kanserleri, karaciğer kanseri, pankreas kanseri, kolorektal kanseri, servikal kanser gibi solid tümör yapısındaki kanser türlerinde Faz I, II ve III klinik denemeleri tamamlanmış çalışmalar bulunmaktadır [92].

Faz I klinik sonuçları yayımlanan bir çalışmada genetiği değiştirilmiş *L. monocytogenes* bakterileri kullanılmıştır. Çalışmada Listeriolisin O ile bağlı

HPV16 E7 antijenini salgılayan canlı zayıflatılmış *L. monocytogenes*'in rahim ağzı kanserli hastalara intravenöz enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda, uygulanan tedavinin tümörle ilişkili antijenlerin immünojenitesini artırdığı ve bunun yerleşik tümörlere karşı daha iyi bir terapötik etki ile sonuçlandığı gösterilmiştir [93, 94].

9. Bakteri Destekli Sistem

Araştırmalarında Karşılaşılan Zorluklar

Bakterilerin kullanılması ile kanser tedavisinde önemli gelişmeler sağlanmış olsa da klinikte kullanılabilmesi için birçok zorluk bulunmaktadır. İmmünojenik yapıları ve bakteriyel toksisitenin kontrol altında tutulması gerekliliği gibi nedenler bakterilerin tedavide kullanılmasını biyogüvenlik açısından sakıncalı hale getirebilmektedir. Hayvan ve insan araştırmalarında çeşitli bakterilerin patojenik olmadığı gösterilmiş olsa da, olası bir toksisite, bağışıklığı baskılanmış ileri evre kanser hastalarının hayatını tehdit edebilmektedir. Bu problem, sentetik biyolojik teknikler kullanılarak bakteriyel virülans genlerinin modifikasyonu ile çözülebilmektedir. Bakterilerin güvenliği, bakterilerin bağışıklık sistemi tarafından hızla temizlenmesini önleyen yüksek oranda biyouyumlu nanomalzemelerle kaplanarak da artırılabilir [92]. Biyogüvenliği artıran yaklaşımlardan biri de bakterilerin genetik modifikasyonu ile toksisite ve immünojenitesinin azaltılmasıdır. Bununla birlikte, aşırı değişikliklerin yapılması bakterinin girişimsel özelliğini azaltabileceği için bu strateji kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmelidir [31, 95].

Tedavide karşılaşılabilecek diğer zorluklar *in vivo* uygulama engelleri ve doz belirlenmesi olarak sayılabilir. Bakteri aracılı bir ilaç taşıyıcı sistemin, oral, intravenöz, subkutan ve intratümöral enjeksiyon gibi çoklu uygulama yolları bulunmaktadır. Canlı zayıflatılmış bakterilerin kan dolaşımına doğrudan enjekte edilmesi ciddi yan etkilere ve hatta ölüme neden olabilmektedir. Oral uygulamada ise bakterinin mide asidinden korunması, bağırsak mikroçevresinden geçmesi gibi sınırlamalar bulunmaktadır. Bu zorlukların üstesinden gelebilmek için sofistike bir sistem geliştirme işleminin gerçekleştirilmesi gerekmektedir [96]. Zayıflatılmış *S. typhimurium* ile yapılan çalışmalarda çoklu dozlamının tek doz tedaviden daha etkili olduğu bulunurken uygulanan bakteri sayısının artması nedeniyle oluşabilecek biyogüvenlik sorunlarının önüne geçilmesi gerektiği bildirilmiştir [97-100].

İlaç taşıyıcı bir bakteriyel sistem hazırlanmasında değerlendirilmesi gereken birçok parametre bulunmaktadır. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin büyük bir çoğunluğu küresel bir şekilde bulunmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda küresel olmayan partikülleri taşıyan bakterilerin daha hızlı bir şekilde hareket ettiği gözlenmiştir. Nanopartiküllerin şekilleri haricinde hacmi ve miktarının da bakterinin hızını etkileyeceği gösterilmiştir [96].

Bakterilerin kanser tedavisinde kullanılmasında yukarıda sunulan zorluklar dışında çözümlenememiş bilimsel sorular da bulunmaktadır. Bakterilerin *in vivo* farmakokinetiği, saklama/nakliye sırasında stabilitenin sağlanması, canlı yapıda bulunan bakterilerle hazırlanan formülasyonun sterilizasyonu, toksik ve yan etkiler gibi konular üzerinde çalışmalar hala devam etmektedir.

10. Sonuç

Kanser tedavisinde birçok yeni tedavi yöntemi ve terapötiklerin geliştirilmesine rağmen, hastalık dünya çapında öldürücü olmaya devam etmektedir. Bu nedenle araştırmacılar sürekli olarak daha etkin tedavinin sağlanması için yeni yaklaşımlar geliştirmekte ve bilimsel araştırmalarında bütün seçenekleri değerlendirmektedir. Bu seçeneklerden biri olan bakterilerin kanser tedavisinde kullanılması yaklaşımı 1800'lü yıllardan beri üzerinde çalışılan bir konudur ve bu alanda başarılı tedavilerin yanında sakıncalı sonuçların da elde edildiği bildirilmiştir.

Günümüzde araştırmacılar bakterilerle elde edilen tedavilerdeki sakıncaları ortadan kaldırmak ve üstünlükleri ön plana çıkarmak için yeni stratejiler geliştirmektedir. Bu kapsamda ilaç/ilaç taşıyıcı sistem ve bakterileri bir arada içeren robotik sistemler üzerinde yoğunlaşmıştır ve biyolojik materyallerle yapılan çalışmalar ile ümit verici sonuçlar elde edilmiştir.

İlaçların hedef tümör bölgesine yönlendirilmesinde bakteriler, tümör seçiciliği, kolay modifikasyon özelliği, doğal immün yanıt oluşturma ve farmasötik bileşen yükleme kapasitelerinin yüksekliğiyle diğer ilaç taşıyıcı sistemlerden daha üstündür. Bakteriler, tümörün heterojen yapısına rağmen ilacın dokunun tümüne ulaşmasını sağlamaktadır. İlaç yüklemesine ek olarak bazı doğal veya modifiye edilmiş bakteri suşlarının, tümör içinde neden oldukları bakteriyel enfeksiyon, T hücresi aktivasyonuna

neden olabilmekte, böylece sitotoksik ajanlarla birlikte kullanımında sinerjik bir etki elde etmeyi sağlamaktadır.

Bakteri destekli sistemlerle prelinik ve klinik çalışmalarda ümit verici sonuçlar elde edilse de olası biyogüvenlik problemlerinin çözülmesi ve endüstriyel çapta üretim için öngörülen zorlukların aşılması için araştırmaların gelecekte de yoğun şekilde devam edeceği düşünülmektedir.

Finansal Kaynak

Herhangi bir finansal kaynak bulunmamaktadır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar arasında herhangi bir konuda çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Araştırmacıların Katkı Beyanı

Fikir, Tasarım ve Dizayn, Denetleme - S.B.P., M.Ö.; Literatür tarama - M.Ö.; Yazma - M.Ö., S.B.P.; Yorumlama, Eleştirel inceleme, Düzenleme - S.B.P., M.Ö.

Kaynaklar

1. Baran Deniz E. Kanser Epidemiyolojisi. Türkiye Sağlık Okuryazarlığı Dergisi. 2022;3(2): 102-111. <https://doi.org/10.54247/soyd.2022.49>
2. Arruebo M, Vilaboa N, Saez-Gutierrez B, Lambea J, Tres A, Valladares M, et al. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers (Basel)*. 2011;3(3):3279-330. <https://doi.org/10.3390/cancers3033279>
3. Sedighi M, Zahedi Bialvaei A, Hamblin MR, Ohadi E, Asadi A, Halajzadeh M, et al. Therapeutic bacteria to combat cancer; current advances, challenges, and opportunities. *Cancer Med*. 2019;8(6):3167-81. <https://doi.org/10.1002/cam4.2148>
4. Padma VV. An overview of targeted cancer therapy. *Biomedicine (Taipei)*. 2015;5(4):19. <https://doi.org/10.7603/s40681-015-0019-4>
5. Forbes NS. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(11):785-94. <https://doi.org/10.1038/nrc2934>
6. Cronin M, Stanton RM, Francis KP, Tangney M. Bacterial vectors for imaging and cancer gene therapy: a review. *Cancer Gene Ther*. 2012;19(11):731-40. <https://doi.org/10.1038/cgt.2012.59>

7. Bidram E, Esmacili Y, Ranji-Burachaloo H, Al-Zaubai N, Zarrabi A, Stewart A, et al. A concise review on cancer treatment methods and delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019;54:101350. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101350>
8. Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(5):363-85. <https://doi.org/10.3322/caac.21565>
9. Dearnaley DP, Khoo VS, Norman AR, Meyer L, Nahum A, Tait D, et al. Comparison of radiation side-effects of conformal and conventional radiotherapy in prostate cancer: a randomised trial. *Lancet*. 1999;353(9149):267-72. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)05180-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)05180-0)
10. Tredan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(19):1441-54. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm135>
11. Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(8):583-92. <https://doi.org/10.1038/nrc1893>
12. Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC, Moretta L. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol*. 2014;44(6):1582-92. <https://doi.org/10.1002/eji.201344272>
13. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med*. 2018;24(5):541-50. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0014-x>
14. Wang J, Lei K, Han F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2018;22(12):3855-64. https://doi.org/10.26355/eurrev_201806_15270
15. Riley RS, June CH, Langer R, Mitchell MJ. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(3):175-96. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0006-z>
16. Ventola CL. Cancer immunotherapy, part 3: challenges and future trends. *Pharmacy and Therapeutics*. 2017;42(8):514.
17. Yu MK, Park J, Jon S. Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy. *Theranostics*. 2012;2(1):3-44. <https://doi.org/10.7150/thno.3463>
18. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;66:2-25. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.009>
19. Erkoç P, Yasa IC, Ceylan H, Yasa O, Alapan Y, Sitti M. Mobile microrobots for active therapeutic delivery. *Advanced Therapeutics*. 2019;2(1):1800064. <https://doi.org/10.1002/adtp.201800064>
20. Krischke M, Hempel G, Völler S, André N, D'Incalci M, Bisogno G, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of doxorubicin in children with cancer: results of a "European Pediatric Oncology Off-patents Medicines Consortium" trial. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2016;78:1175-84. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3174-8>
21. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney international*. 2008;73(9):994-1007. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002786>
22. Wilhelm S, Tavares AJ, Dai Q, Ohta S, Audet J, Dvorak HF, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature reviews materials*. 2016;1(5):1-12. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14>
23. Nallar SC, Xu DQ, Kalvakolanu DV. Bacteria and genetically modified bacteria as cancer therapeutics: Current advances and challenges. *Cytokine*. 2017;89:160-72. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.01.002>
24. Duong MT, Qin Y, You SH, Min JJ. Bacteria-cancer interactions: bacteria-based cancer therapy. *Exp Mol Med*. 2019;51(12):1-15. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0297-0>
25. St Jean AT, Zhang M, Forbes NS. Bacterial therapies: completing the cancer treatment toolbox. *Curr Opin Biotechnol*. 2008;19(5):511-7. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.08.004>
26. Kasinskas RW, Forbes NS. Salmonella typhimurium lacking ribose chemoreceptors localize in tumor quiescence and induce apoptosis. *Cancer Res*. 2007;67(7):3201-9. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2618>
27. Karmakar R. State of the art of bacterial chemotaxis. *J Basic Microbiol*. 2021;61(5):366-79. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000661>
28. Chen Y, Du M, Yu J, Rao L, Chen X, Chen Z. Nanobiohybrids: A Synergistic Integration of Bacteria and Nanomaterials in Cancer Therapy. *BIO Integration*. 2020;1(1):25-36. <https://doi.org/10.15212/bioi-2020-0008>
29. Felgner S, Kocijancic D, Frahm M, Weiss S. Bacteria in Cancer Therapy: Renaissance of an Old Concept. *Int J Microbiol*. 2016;2016:8451728. <https://doi.org/10.1155/2016/8451728>
30. McCarthy EF. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *The Iowa orthopaedic journal*. 2006;26:154. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1888599/>
31. Patyar S, Joshi R, Byrav D, Prakash A, Medhi B, Das B. Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *Journal of biomedical science*. 2010;17(1):1-9. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-21>
32. Kramer MG, Masner M, Ferreira FA, Hoffman RM. Bacterial Therapy of Cancer: Promises, Limitations, and Insights

- for Future Directions. *Front Microbiol.* 2018;9:16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00016>
33. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, et al. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. *New England journal of medicine.* 2001;345(11):784-9. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa001999>
 34. Cummins J, Tangney M. Bacteria and tumours: causative agents or opportunistic inhabitants? *Infectious agents and cancer.* 2013;8(1):1-8. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-8-11>
 35. Liong M-T. Safety of probiotics: translocation and infection. *Nutrition reviews.* 2008;66(4):192-202. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2008.00024.x>
 36. Zhao M, Yang M, Ma H, Li X, Tan X, Li S, et al. Targeted therapy with a Salmonella typhimurium leucine-arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice. *Cancer Res.* 2006;66(15):7647-52. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0716>
 37. Suh S, Jo A, Traore MA, Zhan Y, Coutermarsh-Ott SL, Ringel-Scaia VM, et al. Nanoscale bacteria-enabled autonomous drug delivery system (NanoBEADS) enhances intratumoral transport of nanomedicine. *Advanced Science.* 2019;6(3):1801309. <https://doi.org/10.1002/advs.201801309>
 38. Jiang SN, Phan TX, Nam TK, Nguyen VH, Kim HS, Bom HS, et al. Inhibition of tumor growth and metastasis by a combination of Escherichia coli-mediated cytolytic therapy and radiotherapy. *Mol Ther.* 2010;18(3):635-42. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.295>
 39. Yang H, Jiang F, Ji X, Wang L, Wang Y, Zhang L, et al. Genetically Engineered Bacterial Protein Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:105-17. <https://doi.org/10.2147/IJN.S292432>
 40. Stern C, Kasnitz N, Kocijancic D, Trittel S, Riese P, Guzman CA, et al. Induction of CD4(+) and CD8(+) anti-tumor effector T cell responses by bacteria mediated tumor therapy. *Int J Cancer.* 2015;137(8):2019-28. <https://doi.org/10.1002/ijc.29567>
 41. Morrissey D, O'Sullivan GC, Tangney M. Tumor targeting with systemically administered bacteria. *Current gene therapy.* 2010;10(1):3-14. <https://doi.org/10.2174/156652310790945575>
 42. Ding L, Lu Z, Lu Q, Chen YH. The claudin family of proteins in human malignancy: a clinical perspective. *Cancer Manag Res.* 2013;5:367-75. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S38294>
 43. Luo Y, Xu D, Gao X, Xiong J, Jiang B, Zhang Y, et al. Nanoparticles conjugated with bacteria targeting tumors for precision imaging and therapy. *Biochemical and biophysical research communications.* 2019;514(4):1147-53. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.05.074>
 44. Shahabi V, Maciag PC, Rivera S, Wallecha A. Live, attenuated strains of Listeria and Salmonella as vaccine vectors in cancer treatment. *Bioeng Bugs.* 2010;1(4):235-43. <https://doi.org/10.4161/bbug.1.4.11243>
 45. Rong L, Lei Q, Zhang XZ. Engineering Living Bacteria for Cancer Therapy. *ACS Appl Bio Mater.* 2020;3(12):8136-45. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01286>
 46. Yin T, Diao Z, Blum NT, Qiu L, Ma A, Huang P. Engineering Bacteria and Bionic Bacterial Derivatives with Nanoparticles for Cancer Therapy. *Small.* 2022;18(12):e2104643. <https://doi.org/10.1002/sml.202104643>
 47. Friedlos F, Lehouritis P, Ogilvie L, Hedley D, Davies L, Bermudes D, et al. Attenuated Salmonella targets prodrug activating enzyme carboxypeptidase G2 to mouse melanoma and human breast and colon carcinomas for effective suicide gene therapy. *Clinical Cancer Research.* 2008;14(13):4259-66. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-4800>
 48. Cheng C, Lu Y, Chuang K, Hung W, Shiea J, Su Y, et al. Tumor-targeting prodrug-activating bacteria for cancer therapy. *Cancer gene therapy.* 2008;15(6):393-401. <https://doi.org/10.1038/cgt.2008.10>
 49. Durrer KE, Allen MS, Hunt von Herbing I. Genetically engineered probiotic for the treatment of phenylketonuria (PKU); assessment of a novel treatment in vitro and in the PAHenu2 mouse model of PKU. *PloS one.* 2017;12(5):e0176286. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176286>
 50. Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryneck S, Obermeier F, Falk W, et al. Treatment of murine colitis by Lactococcus lactis secreting interleukin-10. *Science.* 2000;289(5483):1352-5. <https://doi.org/10.1126/science.289.5483.1352>
 51. Vågesjö E, Öhnstedt E, Mortier A, Lofton H, Huss F, Probst P, et al. Accelerated wound healing in mice by on-site production and delivery of CXCL12 by transformed lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2018;115(8):1895-900. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716580115>
 52. Shen H, Aggarwal N, Wun KS, Lee YS, Hwang IY, Chang MW. Engineered microbial systems for advanced drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2022;187:114364. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114364>
 53. Borghaei H, Smith MR, Campbell KS. Immunotherapy of cancer. *Eur J Pharmacol.* 2009;625(1-3):41-54. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.09.067>
 54. Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, Sharpe AH. Coinhibitory pathways in immunotherapy for cancer. *Annual review of immunology.* 2016;34:539-73. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112049>
 55. Felgner S, Kocijancic D, Frahm M, Heise U, Rohde M, Zimmermann K, et al. Engineered Salmonella enterica serovar

- Typhimurium overcomes limitations of anti-bacterial immunity in bacteria-mediated tumor therapy. *Oncoimmunology*. 2018;7(2):e1382791. <https://doi.org/10.1080/2162402x.2017.1382791>
56. Hu Q, Wu M, Fang C, Cheng C, Zhao M, Fang W, et al. Engineering nanoparticle-coated bacteria as oral DNA vaccines for cancer immunotherapy. *Nano Lett*. 2015;15(4):2732-9. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b00570>
57. Weerakkody LR, Witharana C. The role of bacterial toxins and spores in cancer therapy. *Life Sci*. 2019;235:116839. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116839>
58. Barbe S, Van Mellaert L, Anne J. The use of clostridial spores for cancer treatment. *J Appl Microbiol*. 2006;101(3):571-8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02886.x>
59. Umer B, Good D, Anne J, Duan W, Wei MQ. Clostridial spores for cancer therapy: targeting solid tumour microenvironment. *J Toxicol*. 2012;2012:862764. <https://doi.org/10.1155/2012/862764>
60. Janku F, Zhang HH, Pezeshki A, Goel S, Murthy R, Wang-Gillam A, et al. Intratumoral Injection of Clostridium novyi-NT Spores in Patients with Treatment-refractory Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2021;27(1):96-106. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-2065>
61. Kaparakis-Liaskos M, Ferrero RL. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(6):375-87. <https://doi.org/10.1038/nri3837>
62. Li M, Zhou H, Yang C, Wu Y, Zhou X, Liu H, et al. Bacterial outer membrane vesicles as a platform for biomedical applications: An update. *Journal of Controlled Release*. 2020;323:253-68.
63. Gujrati V, Kim S, Kim S-H, Min JJ, Choy HE, Kim SC, et al. Bioengineered bacterial outer membrane vesicles as cell-specific drug-delivery vehicles for cancer therapy. *ACS nano*. 2014;8(2):1525-37. <https://doi.org/10.1021/nn405724x>
64. Qing S, Lyu C, Zhu L, Pan C, Wang S, Li F, et al. Biomimetic bacterial outer membrane vesicles potentiate safe and efficient tumor microenvironment reprogramming for anticancer therapy. *Advanced Materials*. 2020;32(47):2002085. <https://doi.org/10.1002/adma.202002085>
65. Kim OY, Park HT, Dinh NTH, Choi SJ, Lee J, Kim JH, et al. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- γ -mediated antitumor response. *Nature communications*. 2017;8(1):626. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00729-8>
66. Lubran MM. Bacterial toxins. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 1988;18(1):58-71.
67. Kreitman RJ, Wilson WH, White JD, Stetler-Stevenson M, Jaffe ES, Giardina S, et al. Phase I trial of recombinant immunotoxin anti-Tac (Fv)-PE38 (LMB-2) in patients with hematologic malignancies. *Journal of Clinical Oncology*. 2000;18(8):1622-36. <https://doi.org/10.1200/jco.2000.18.8.1622>
68. Pahle J, Menzel L, Niesler N, Kobelt D, Aumann J, Rivera M, et al. Rapid eradication of colon carcinoma by Clostridium perfringens Enterotoxin suicidal gene therapy. *BMC cancer*. 2017;17:1-14.
69. Sitti M, Ceylan H, Hu W, Giltinan J, Turan M, Yim S, et al. Biomedical Applications of Untethered Mobile Milli/Microrobots. *Proc IEEE Inst Electr Electron Eng*. 2015;103(2):205-24. <https://doi.org/10.1109/JPROC.2014.2385105>
70. Ceylan H, Giltinan J, Kozielski K, Sitti M. Mobile microrobots for bioengineering applications. *Lab on a Chip*. 2017;17(10):1705-24. <https://doi.org/10.1039/c7lc00064b>
71. Erkoç P, Yasa IC, Ceylan H, Yasa O, Alapan Y, Sitti M. Mobile Microrobots for Active Therapeutic Delivery. *Advanced Therapeutics*. 2019;2(1). <https://doi.org/10.1002/adtp.201800064>
72. Mostaghaci B, Yasa O, Zhuang J, Sitti M. Bioadhesive bacterial microswimmers for targeted drug delivery in the urinary and gastrointestinal tracts. *Advanced Science*. 2017;4(6):1700058. <https://doi.org/10.1002/advs.201700058>
73. Darnton N, Turner L, Breuer K, Berg HC. Moving fluid with bacterial carpets. *Biophysical journal*. 2004;86(3):1863-70. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2004.04.044>
74. Sanna V, Pala N, Sechi M. Targeted therapy using nanotechnology: focus on cancer. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:467-83. <https://doi.org/10.2147/IJN.S36654>
75. Magennis EP, Fernandez-Trillo F, Sui C, Spain SG, Bradshaw DJ, Churchley D, et al. Bacteria-instructed synthesis of polymers for self-selective microbial binding and labelling. *Nat Mater*. 2014;13(7):748-55. <https://doi.org/10.1038/nmat3949>
76. Hosseini Z, Mostaghaci B, Yasa O, Park BW, Singh AV, Sitti M. Bioengineered and biohybrid bacteria-based systems for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;106(Pt A):27-44. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.09.007>
77. Cao Z, Liu J. Bacteria and bacterial derivatives as drug carriers for cancer therapy. *J Control Release*. 2020;326:396-407. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.009>
78. Zoaby N, Shainsky-Roitman J, Badarneh S, Abumanhal H, Leshansky A, Yaron S, et al. Autonomous bacterial nanoswimmers target cancer. *J Control Release*. 2017;257:68-75. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.10.006>
79. Xie S, Chen M, Song X, Zhang Z, Zhang Z, Chen Z, et al. Bacterial microbots for acid-labile release of hybrid micelles to promote the synergistic antitumor efficacy. *Acta Biomater*. 2018;78:198-210. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.07.041>
80. Shi H, Chen L, Liu Y, Wen Q, Lin S, Wen Q, et al. Bacteria-Driven Tumor Microenvironment-Sensitive Nanoparticles

- Targeting Hypoxic Regions Enhances the Chemotherapy Outcome of Lung Cancer. *Int J Nanomedicine*. 2023;18:1299-315. <https://doi.org/10.2147/IJN.S396863>
81. Yan S, Zeng X, Wang Y, Liu BF. Biomineralization of Bacteria by a Metal-Organic Framework for Therapeutic Delivery. *Adv Healthc Mater*. 2020;9(12):e2000046. <https://doi.org/10.1002/adhm.202000046>
 82. Park BW, Zhuang J, Yasa O, Sitti M. Multifunctional Bacteria-Driven Microswimmers for Targeted Active Drug Delivery. *ACS Nano*. 2017;11(9):8910-23. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b03207>
 83. Nguyen VD, Han J-W, Choi YJ, Cho S, Zheng S, Ko SY, et al. Active tumor-therapeutic liposomal bacteriobot combining a drug (paclitaxel)-encapsulated liposome with targeting bacteria (*Salmonella Typhimurium*). *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2016;224:217-24. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.09.034>
 84. Suh S, Jo A, Traore MA, Zhan Y, Coutermarsh-Ott SL, Ringel-Scaia VM, et al. Nanoscale Bacteria-Enabled Autonomous Drug Delivery System (NanoBEADS) Enhances Intratumoral Transport of Nanomedicine. *Adv Sci (Weinh)*. 2019;6(3):1801309. <https://doi.org/10.1002/advs.201801309>
 85. Wang JW, Chen QW, Luo GF, Han ZY, Song WF, Yang J, et al. A Self-Driven Bioreactor Based on Bacterium-Metal-Organic Framework Biohybrids for Boosting Chemotherapy via Cyclic Lactate Catabolism. *ACS Nano*. 2021;15(11):17870-84. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c06123>
 86. Pandey M, Choudhury H, Vijayagomaran PA, Lian PNP, Ning TJ, Wai NZ, et al. Recent Update on Bacteria as a Delivery Carrier in Cancer Therapy: From Evil to Allies. *Pharm Res*. 2022;39(6):1115-34. <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03240-y>
 87. Paukner S, Kohl G, Lubitz W. Bacterial ghosts as novel advanced drug delivery systems: antiproliferative activity of loaded doxorubicin in human Caco-2 cells. *Journal of Controlled Release*. 2004;94(1):63-74. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.09.010>
 88. Shi H, Chen L, Liu Y, Wen Q, Lin S, Wen Q, et al. Bacteria-Driven Tumor Microenvironment-Sensitive Nanoparticles Targeting Hypoxic Regions Enhances the Chemotherapy Outcome of Lung Cancer. *Int J Nanomedicine*. 2023;18:1299-315. <https://doi.org/10.2147/IJN.S396863>
 89. Yan S, Zeng X, Wang Y, Liu BF. Biomineralization of Bacteria by a Metal-Organic Framework for Therapeutic Delivery. *Adv Healthc Mater*. 2020;9(12):e2000046. <https://doi.org/10.1002/adhm.202000046>
 90. Park BW, Zhuang J, Yasa O, Sitti M. Multifunctional Bacteria-Driven Microswimmers for Targeted Active Drug Delivery. *ACS Nano*. 2017;11(9):8910-23. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b03207>
 91. Nguyen VD, Han J-W, Choi YJ, Cho S, Zheng S, Ko SY, et al. Active tumor-therapeutic liposomal bacteriobot combining a drug (paclitaxel)-encapsulated liposome with targeting bacteria (*Salmonella Typhimurium*). *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2016;224:217-24. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.09.034>
 92. Yang M, Yang F, Chen W, Liu S, Qiu L, Chen J. Bacteria-mediated cancer therapies: opportunities and challenges. *Biomaterials Science*. 2021;9(17):5732-44.
 93. Maciag PC, Radulovic S, Rothman J. The first clinical use of a live-attenuated *Listeria monocytogenes* vaccine: a Phase I safety study of Lm-LLO-E7 in patients with advanced carcinoma of the cervix. *Vaccine*. 2009;27(30):3975-83. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.04.041>
 94. Gardlik R, Behuliak M, Palffy R, Celec P, Li CJ. Gene therapy for cancer: bacteria-mediated anti-angiogenesis therapy. *Gene Ther*. 2011;18(5):425-31. <https://doi.org/10.1038/gt.2010.176>
 95. Neubi GMN, Opoku-Damoah Y, Gu X, Han Y, Zhou J, Ding Y. Bio-inspired drug delivery systems: an emerging platform for targeted cancer therapy. *Biomaterials science*. 2018;6(5):958-73. <https://doi.org/10.1039/c8bm00175h>
 96. Yang M, Yang F, Chen W, Liu S, Qiu L, Chen J. Bacteria-mediated cancer therapies: opportunities and challenges. *Biomater Sci*. 2021;9(17):5732-44. <https://doi.org/10.1039/d1bm00634g>
 97. Hayashi K, Zhao M, Yamauchi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, Tomita K, et al. Systemic targeting of primary bone tumor and lung metastasis of high-grade osteosarcoma in nude mice with a tumor-selective strain of *Salmonella typhimurium*. *Cell Cycle*. 2009;8(6):870-5. <https://doi.org/10.4161/cc.8.6.7891>
 98. Nagakura C, Hayashi K, Zhao M, Yamauchi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, et al. Efficacy of a genetically-modified *Salmonella typhimurium* in an orthotopic human pancreatic cancer in nude mice. *Anticancer research*. 2009;29(6):1873-8.
 99. Zhao M, Yang M, Ma H, Li X, Tan X, Li S, et al. Targeted therapy with a *Salmonella typhimurium* leucine-arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice. *Cancer research*. 2006;66(15):7647-52. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-0716>
 100. Kramer MG, Masner M, Ferreira FA, Hoffman RM. Bacterial therapy of cancer: promises, limitations, and insights for future directions. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00016>