



Открытие и характеристика противоопухолевой микробиоты кишечника амфибий и рептилий : *Ewingella americana* как новый терапевтический агент с двойными цитотоксическими и иммуномодулирующими свойствами.

Сейго Ивата, Наги Ямасита, Кенсукэ Асукабэ, Матомо Сакари и Эйджиро Мияко

Для цитирования этой статьи: Сейго Ивата, Наги Ямасита, Кенсукэ Асукабэ, Матомо Сакари и Эйджиро Мияко (2025) Открытие и характеристика противоопухолевой микробиоты кишечника амфибий и рептилий: *Ewingella americana* как новый терапевтический агент с двойными цитотоксическими и иммуномодулирующими свойствами, Микробы кишечника, 17:1, 2599562, DOI: 10.1080/19490976.2025.2599562

Ссылка на эту статью: <https://doi.org/10.1080/19490976.2025.2599562>.



© 2025 Автор(ы). Издано с лицензией Группы Тейлора и Франсиса, LLC. Просмотр дополнительного материала Опубликовано онлайн: 10 дек 2025. Отправьте свою статью в этот журнал Просмотры статьи: 21121 Просмотреть связанные статьи Просмотреть данные Crossmark



Открытие и характеристика противоопухолевой кишечной микробиоты амфибий и рептилий: *Ewingella americana* как новый терапевтический агент с двойными цитотоксическими и иммуномодулирующими свойствами

Сейго Ивата, Наги Ямасита⁵, Кенсукэ Асукабе⁵, Матамо Сакари и Эйдзиро Мияко

Высшая школа передовых наук и технологий, Японский передовой институт науки и технологий, 1-1 Asahidai, Nomi, Ishikawa, Япония

АННОТАЦИЯ

Использование кишечной микробиоты в терапии рака привлекло значительное внимание как новая терапевтическая граница. В этом исследовании мы систематически оценили противоопухолевые эффекты девяти бактериальных штаммов, изолированных из кишечника амфибий (*Дриофитес японский* и *Цинопс пиррогастер*) и рептилий (*Тахидромус тахидромидес*). Среди изолятов *Ewingella americana* продемонстрировала исключительно сильную цитотоксическую активность с избирательной способностью нацеливания на опухоли, характерной для факультативных анаэробных бактерий. Механистические исследования показали, что *E. americana* действует через механизм двойного действия: прямое уничтожение опухолевых клеток и активное включение иммунитета хозяина, что приводит к усиленной атаке опухоли со стороны Т-клеток, нейтрофилов и В-клеток. Лечение с использованием *E. americana* значительно превзошло стандартные методы терапии, включая антитело против PD-L1 и доксорубин, в исследованиях регрессии опухолей. Важно, что комплексные оценки безопасности на мышинных моделях продемонстрировали, что кишечный штамм *E. americana* обладает минимальной патогенностью и не оказывает значительного негативного воздействия при терапевтически эффективных дозах, что благоприятно контрастирует с генетически модифицированными бактериальными терапиями. Сравнительный анализ показал более высокую терапевтическую эффективность *E. americana* по сравнению с традиционными методами лечения, сохраняя при этом отличный профиль безопасности. Эти результаты свидетельствуют о том, что кишечные микробиоты низших позвоночных содержат множество нехарактеризованных бактериальных видов с исключительным терапевтическим потенциалом. Наше исследование закладывает основу для разработки естественно встречающихся, непатогенных бактериальных терапий и подчеркивает критическую важность микробного биоразнообразия в продвижении стратегий лечения рака.

ИСТОРИЯ СТАТЬИ

Получено 2 сентября 2025 года, пересмотрено 24 ноября 2025 года, принято 1 декабря 2025 года

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Кишечная микробиота; рак; бактериальная терапия рака; иммунотерапия

Введение

Ландшафт терапий рака был революционизирован благодаря признанию того, что микробные сообщества играют ключевую роль в биологии опухолей, терапевтических ответах и клинических исходах. Исследования и разработки бактериальных терапий для рака быстро расширяются, что обусловлено накапливающимися доказательствами глубоких взаимосвязей между микробиомом и онкологическими процессами. В человеческом организме микробные экосистемы образуют сложные сообщества в различных анатомических нишах, включая дыхательный тракт, integumentary system, полость рта, мочеполовую систему и, что наиболее важно, кишечный тракт, каждая из которых содержит уникальные и высоко разнообразные сборки микробных видов.¹ Среди этих микробиомов кишечная микробиота выделяется как наиболее подробно охарактеризованная и терапевтически значимая, представляя собой плотную и сложную экосистему комменсальных микроорганизмов, которые в совокупности превышают количество человеческих клеток и обладают метаболической способностью, значительно превышающей таковую человеческого генома.^{1,2}

Кишечный микробиом играет многофункциональную роль в поддержании физиологической гомеостаза, его функции выходят далеко за пределы традиционных представлений о микробном обитании. В частности, кишечная микробиота служит критическим посредником в процессах пищеварения и регуляции обмена веществ, организуя сложные

модуляции иммунной системы и обеспечивая важные механизмы защиты от патогенной инвазии.³⁻⁵ Метаболическая универсальность кишечных бактерий позволяет производить множество биоактивных соединений, включая жирные кислоты с короткой цепью, вторичные желчные кислоты и сложные метаболиты, которые глубоко влияют на физиологию хозяина и восприимчивость к заболеваниям. Более того, кишечный микробиом служит основным местом для обучения и калибровки иммунной системы, при этом сигналы, получаемые от микробов, формируют как местный кишечный иммунитет, так и системные иммунные ответы по всему организму хозяина.

Накопленные доказательства установили убедительные связи между составом кишечной микробиоты и онкологической биологией, демонстрируя, что определенные бактериальные виды могут значительно влиять на инициацию рака, траектории прогрессирования,⁶⁻⁹ и терапевтические ответы при различных типах рака.^{6,10,11} Механизмы, лежащие в основе этих взаимодействий между микробиомом и раком, удивительно разнообразны и охватывают прямые генотоксические эффекты, хронические воспалительные процессы, модуляцию иммунной системы и метаболическую перепрограммировку микроокружения опухоли. Например, пионерские исследования выявили специфические виды кишечных микроорганизмов, которые существенно повышают терапевтическую эффективность ингибиторов иммунных контрольных точек, включая ингибиторы программируемой клеточной смерти-1 (PD-1) (антитела против PD-1) и ингибиторы лиганда программируемой клеточной смерти-1 (PD-L1) (антитела против PD-L1), через механизмы, связанные с улучшенной презентацией антигена, активацией Т-клеток и восстановлением иммуносупрессивных микроокружений опухоли.¹²⁻¹⁴ Эти открытия вызвали интенсивный интерес к разработке терапевтических вмешательств на основе микробиома и установили кишечный микробиом как критически важный фактор ответной реакции на иммунотерапию.

Тем не менее, несмотря на эти значительные достижения, существует значительный разрыв между нашим пониманием ассоциаций микробиома и рака и клиническим переводом кишечных бактерий для прямого применения в лечении рака. На сегодняшний день было замечательно мало сообщений, описывающих систематическую изоляцию кишечных бактерий и их последующее внутривенное введение для прямой антитуморной терапии, что представляет собой значительную неосвоенную терапевтическую возможность. Более того, современные знания охватывают лишь ограниченную долю огромного микробного разнообразия, обитающего в экосистемах кишечника, при этом большинство бактериальных видов остается неохарактеризованным с точки зрения их потенциальных полезных или вредных эффектов на здоровье человека. Этот разрыв в знаниях особенно выражен для микробиомов нечеловеческих видов, которые могут содержать уникальные бактериальные сообщества с новыми терапевтическими свойствами.

Основываясь на нашей предыдущей новаторской работе по микробиоте, обитающей в опухолях, которая проявляла исключительные антитуморные эффекты,¹⁵⁻¹⁷ мы разработали инновационный терапевтический подход, при котором бактерии, изолированные непосредственно из опухолевых тканей, культивируются и вводятся внутривенно для использования их врожденной антитуморной активности и естественных способностей к нацеливанию на опухоли. Научное обоснование для исследования кишечной микробиоты как источника антитуморных бактерий многоаспектно и убедительно. Во-первых, известно, что кишечные бактерии оказывают глубокое влияние на системные иммунные ответы и воспалительные процессы через ось кишечник-система, что предполагает их потенциал для удаленных антитуморных эффектов. Во-вторых, кишечные бактерии могут транслоцироваться в системный кровоток и затем колонизировать опухолевые ткани, представляя собой один из основных источников внутриопухолевых бактериальных сообществ. В-третьих, эволюционное давление в среде кишечника могло отобрать бактериальные штаммы с уникальными метаболическими способностями и свойствами взаимодействия с хозяином, которые могут быть терапевтически использованы.

Основываясь на этих соображениях, мы гипотезируем, что кишечный микробиом представляет собой обширный резервуар бактериального разнообразия, охватывающий виды с потенциально исключительными противоопухолевыми свойствами, которые остаются в значительной степени неизученными. Однако клинический перевод кишечных бактерий для системной терапии рака сталкивается с серьезными проблемами, особенно в отношении соображений безопасности при прямом введении бактерий в кровоток. Потенциал бактериальной токсичности, септических осложнений и неконтролируемых воспалительных реакций представляет собой основные препятствия для терапевтической реализации. Кроме того, текущие подходы к терапии рака с использованием генетически модифицированных бактерий (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* и *Salmonella* виды) несут в себе присущие риски безопасности, связанные с потенциальными спонтанными мутациями в бактериальном геноме, которые могут подорвать разработанные функции безопасности и терапевтическую эффективность.^{18,19} Эти опасения ограничили клинический прогресс бактериальных терапевтических средств против рака и подчеркивают критическую необходимость более безопасных альтернативных подходов.

Одной из многообещающих стратегий для решения этих проблем безопасности является идентификация и использование естественно встречающихся непатогенных бактериальных штаммов, которые сочетают в себе мощную противоопухолевую активность с минимальными профилями токсичности. Такие бактерии устраняют необходимость в генетической модификации, при этом потенциально сохраняя или превышая терапевтическую эффективность модифицированных штаммов. Более того, недавние инновационные исследования

показали, что простые методы культивирования бактерий с использованием каркасов могут значительно снизить бактериальную токсичность и повысить биосовместимость,²⁰ тем самым улучшая осуществимость и профиль безопасности бактериальных терапевтических подходов. Кроме того, использование естественно встречающихся бактерий может предоставить преимущества в отношении путей одобрения регуляторов и сроков клинического перевода.²¹

Изучение кишечных микробиомов у филогенетически разнообразных видов позвоночных представляет собой инновационный подход к открытию бактерий, который может привести к получению бактериальных штаммов с уникальными терапевтическими свойствами. Низшие позвоночные, включая амфибий и рептилий, развили отличные микробные сообщества кишечника, адаптированные к их специфическим экологическим нишам, диетическим паттернам и физиологическим требованиям. Эти микробиомы могут содержать бактериальные виды с новыми метаболическими способностями, антимикробной активностью и механизмами взаимодействия с хозяином, которые существенно отличаются от тех, что встречаются в микробиомах кишечника млекопитающих. Более того, эволюционное расхождение этих видов хозяев могло привести к отбору бактериальных штаммов с повышенной стабильностью, сниженной патогенностью и уникальными терапевтическими свойствами.

В этом комплексном исследовании мы систематически изучили противоопухолевый потенциал девяти естественно встречающихся бактериальных штаммов, выделенных из кишечных трактов филогенетически разнообразных амфибий, в частности японской древесной лягушки (*Дриофитес японский*), японской тритоновой огненной ящерицы (*Цинопс пиррогастер*) и японского травяного ящера (*Такидромус такидромидес*), представительного вида рептилий. Эти виды были выбраны на основе их экологического разнообразия, отличительных эволюционных линий и доступности для отбора микробиомов. Наша комплексная оценка охватила несколько терапевтических параметров, включая прямые цитотоксические эффекты, специфичность к опухолям, иммуномодулирующие свойства и профили безопасности. Терапевтическая эффективность выявленных бактериальных кандидатов была строго сопоставлена с установленными методами лечения рака, включая ингибирование иммунных контрольных точек (антитело против PD-L1) и традиционную химиотерапию (доксорубицин). Кроме того, мы провели обширные оценки безопасности для оценки патогенного потенциала и профилей побочных эффектов наиболее перспективных бактериальных изолятов.

Это исследование предоставляет новые данные о терапевтическом потенциале ранее не охарактеризованных кишечных микробов из низших позвоночных и закладывает основу для разработки естественно встречающихся бактериальных терапий в лечении рака. Наши результаты демонстрируют огромный неиспользованный потенциал, находящийся в разнообразных микробных экосистемах, и подчеркивают критическую важность усилий по сохранению биоразнообразия для продвижения медицинской науки и терапевтических инноваций.

Результаты

Изоляция и характеристика кишечной микробиоты амфибий и рептилий

Состав и разнообразие кишечной микробиоты демонстрируют замечательные вариации между видами хозяев, при этом многочисленные факторы, включая диетические привычки, воздействие антигенов окружающей среды, историю инфекционных заболеваний, фармакологические вмешательства, генетический фон, возраст хозяев и гигиенические практики, значительно влияют на структуру и функции микробных сообществ.²²⁻²⁴ Более того, филогенетически отличающиеся виды хозяев часто содержат совершенно уникальные и в значительной степени не охарактеризованные кишечные микробные сообщества, которые эволюционировали вместе со своими хозяевами на протяжении эволюционных временных масштабов. Сложные взаимодействия между хозяином и микробиотой, возникающие из этих отношений, играют ключевую роль в определении исходов здоровья и восприимчивости к заболеваниям. Особенно интересно эпидемиологическое наблюдение, что спонтанное образование опухолей в диких популяциях амфибий происходит с remarkably низкой частотой и, как правило, ограничено конкретными популяциями или видами, что резко контрастирует с паттернами распространенности новообразований, наблюдаемыми у других позвоночных таксонов.²⁵ Этот поразительный феномен предполагает, что амфибии могут обладать врожденными механизмами сопротивления к канцерогенезу, хотя молекулярные и клеточные механизмы, ответственные за это очевидное сопротивление раку, остаются не полностью изученными и представляют собой область значительного научного интереса.²³

В настоящем исследовании мы систематически изолировали кишечные бактерии от филогенетически разнообразных низших позвоночных, включая два вида амфибий (*Дриофитес японский* и *Цинопс пиррогастер*) и один вид рептилий (*Такидромус такидромидес*). Рисунок 1а представляет собой полное схематическое изображение методологии изоляции бактерий, использованной для отбора кишечной микробиоты амфибий и рептилий. С помощью систематических протоколов культивирования и изоляции было получено в общей сложности 45 различных бактериальных штаммов

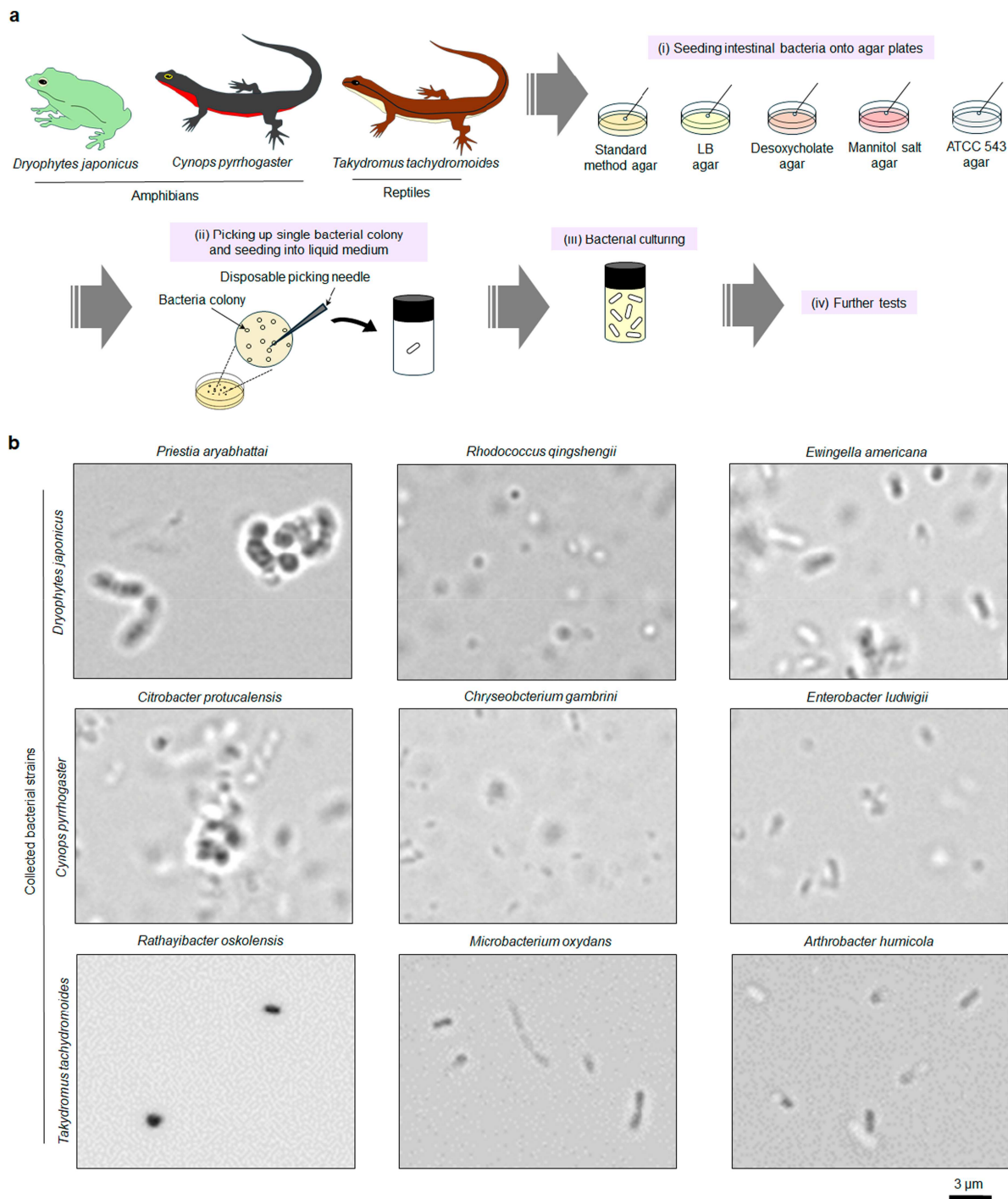


Рисунок 1. Изоляция кишечной микробиоты от амфибий и рептилий. (a) Процесс изоляции кишечных бактерий от *Дриофитес японский*, *Цинопс пиррогастер* и *Такидромус тахидромоидес*. (b) Представительные оптические микроскопические изображения изолированных бактериальных штаммов кишечника.

успешно получены и впоследствии подвергнуты предварительной оценке биосовместимости путем внутривенного введения в мыши BALB/c (200 μ L через инъекцию в хвостовую вену при 5×10^9 КФУ/мл) для оценки острой токсичности и общих профилей переносимости (Дополнительная таблица S1).

После строгих процедур скрининга биосовместимости были отобраны девять бактериальных штаммов, демонстрирующих приемлемые профили безопасности, для комплексной оценки противоопухолевой активности: *Priestia aryabhatai* (Бактериальный № 1), *Rhodococcus qingshengii* (Бактериальный № 2) и несколько изолятов *Ewingella americana* (Бактериальный № 3, 6, 7, 9, 10 и 11), полученных от *Dryophytes japonicus*; *Citrobacter portucalensis* (Бактериальный №



16), *Хризобактериум гамбрини* (бактериальный № 22), и *Энтеробактер людвигии* (бактериальный № 24), изолированные из *Цинопс пиррогастер*; и *Ратаябактер осколенсис* (бактериальный № 28, 42), *Микробактерий оксидан* (бактериальный № 29, 32 и 43), и *Архробактер гумикола* (бактериальный № 30), полученные из *Такидромус такидромоидес* (Рисунок 1b). Идентификация бактериальных видов была подтверждена с помощью секвенирования гена 16S рРНК и последующего анализа Инструмента базового локального выравнивания (BLAST) для обеспечения таксономической точности (Дополнительная таблица S2–S10).

Морфологические и ростовые характеристики выявили различные фенотипические свойства среди изолированных штаммов. На твердых агаровых средах *R. oskolensis* и *M. oxydans* образовали характерные колонии с желтой пигментацией, в то время как остальные бактериальные штаммы производили белые или кремовые колонии. Исследования оптимизации роста показали, что *E. americana*, *R. oskolensis* и *M. oxydans* демонстрировали устойчивый рост на нескольких формулировках культуры сред. Однако, чтобы максимизировать выход и жизнеспособность бактерий, LB среда была выбрана в качестве оптимальной среды для роста *R. oskolensis* и *M. oxydans*, в то время как среда Pearl Core обеспечивала лучшие условия для роста *E. americana*. Все девять выбранных бактериальных штаммов впоследствии были размножены в жидкой культуре при комнатной температуре (25 °C) в контролируемых условиях и подготовлены для последующих экспериментальных приложений.

Терапевтическая эффективность кишечных бактерий, изолированных in vivo

Для систематической оценки in vivo антиморфологического потенциала девяти выбранных изолятов кишечных бактерий мы использовали хорошо зарекомендовавшую себя модель сингенного опухолевого карциномы Colon-26 на мышах, которая воспроизводит ключевые особенности человеческого колоректального рака, сохраняя при этом иммунокомпетентность (Рисунок 2a). Этот экспериментальный подход позволяет оценить как прямую бактериальную цитотоксичность, так и иммуномодулирующие антиморфологические ответы хозяина в физиологически значимом контексте. Когда установленные опухоли Colon-26 достигли примерно 200 мм³ в объеме, мыши с опухолями, обладающие иммунной компетентностью, получили одноразовые внутривенные инъекции через хвостовое вено 200 μL бактериальных суспензий (5×10^9 КФУ/мл) или фосфатно-солевого буфера (PBS) в качестве отрицательных контролей. Динамику роста опухоли мониторили в течение 40 дней после лечения, чтобы зафиксировать как острые, так и устойчивые терапевтические ответы. Мы провели пилотные эксперименты, тестируя диапазон доз 2×10^7 до 1×10^9 КФУ и обнаружили, что 1×10^9 КФУ обеспечили оптимальную терапевтическую эффективность, сохраняя при этом отличные профили безопасности (Дополнительный рисунок S1).

Администрирование PBS служило подходящим негативным контролем и не оказало заметного влияния на кинетику роста опухоли, подтверждая, что сама процедура инъекции не повлияла на прогрессию опухоли. Среди бактериальных штаммов, изолированных от *Дриофитес японский*, *P. ариабхаттай* не продемонстрировала измеримой противоопухолевой активности по сравнению с контролем, обработанным PBS, что указывает на то, что не все кишечные бактерии обладают внутренними противораковыми свойствами. В отличие от этого, как *R. qingshengii*, так и *E. americana* достигли значительного подавления роста опухоли по сравнению с контрольными обработками (Рисунок 2b и Дополнительный рисунок S2). Наиболее примечательно, что *E. americana* продемонстрировала исключительную терапевтическую эффективность, обеспечив мощное подавление опухоли и полную регрессию опухоли (полный ответ, КР) после одной бактериальной инъекции. Терапевтическая кинетика показала, что мыши, обработанные *R. qingshengii* показали начальное подавление опухоли до дня 5 после инъекции; однако затем было замечено повторное рост опухол и, что предполагает, что, хотя этот штамм обладает противоопухолевой активностью, его терапевтические эффекты не сохраняются в долгосрочной перспективе.

Оценка бактериальных штаммов, изолированных от *Цинопс пиррогастер* показала, что *C. portucalensis*, *C. gambrii* и *E. ludwigii* все значительно подавили рост опухоли по сравнению с контролем PBS (Рисунок 2c и Дополнительный рисунок S3). Примечательно, что лечение *C. portucalensis* и *E. ludwigii* вызвало полную регрессию опухоли к дню 3 после лечения, продемонстрировав быструю и мощную противоопухолевую эффективность. Однако повторное возникновение опухоли было замечено после дня 8 в обеих группах лечения, что указывает на то, что, хотя эти штаммы могут достичь начального устранения опухоли, они могут не обеспечить долгосрочный контроль опухоли. Аналогичным образом, администрирование бактериальных штаммов, изолированных от *Такидромус такидромоидес*, включая *R. осколенсис*, *M. оксиданс* и *A. хумикола*, привело к значительному ингибированию роста опухоли по сравнению с контрольными обработками (Рисунок 2d и Дополнительный рисунок S4).

Комплексный анализ терапевтических результатов выявил различные паттерны противоопухолевой активности среди девяти изолятов кишечных бактерий. В частности, один штамм (*P. ариабхаттай*) не продемонстрировал обнаруживаемую

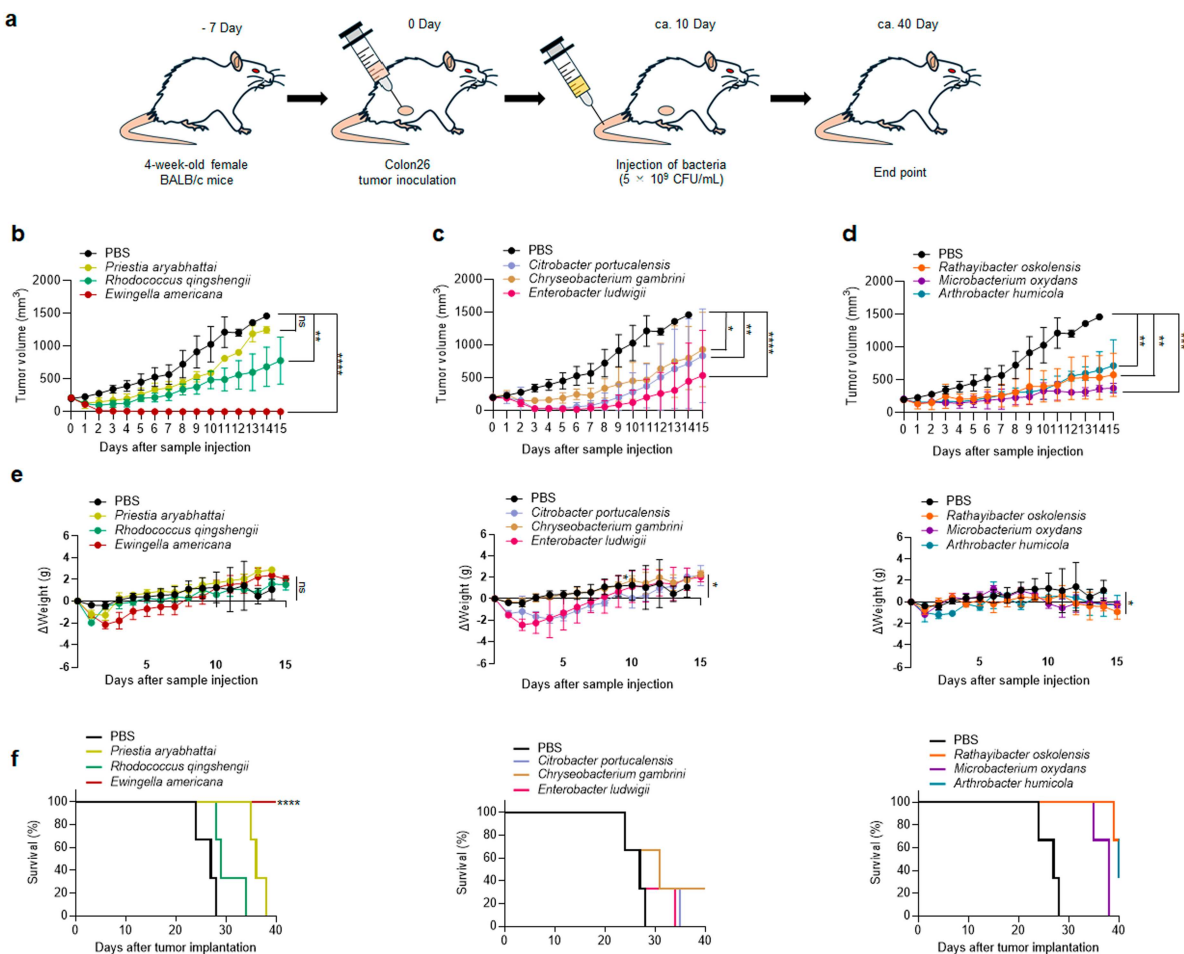


Рисунок 2. Противоопухолевая активность кишечной микробиоты у мышей BALB/c с опухолью Colon26. (a) Экспериментальная временная шкала: инокуляция опухоли, за которой следует однократное внутривенное (i.v.) введение кишечных бактериальных штаммов. (b) Противоопухолевая эффективность бактерий, изолированных от *D. jaronicus*. Каждый штамм вводился через однократную инъекцию в вену хвоста (200 μ L, 5×10^8 КФУ/мл); PBS использовался в качестве контроля. Данные представлены как среднее \pm SEM (n = 3). Статистическое сравнение с PBS: ns, незначительно; **, p < 0.01; ****, p < 0.0001 (двусторонний t-тест Стьюдента). (c) Эффективность бактерий из *S. purthogaster* (200 μ L, 5×10^8 КФУ/мл). Данные: среднее \pm SEM (n = 3). *, p < 0.05; **, p < 0.01; ****, p < 0.0001 (двусторонний t-тест Стьюдента). (d) Эффективность бактерий из *T. tachydromoides* (200 μ L, 5×10^8 КФУ/мл). Данные: среднее \pm SEM (n = 3). **, p < 0.01; ****, p < 0.0001 (двусторонний t-тест Стьюдента). (e) Мониторинг массы тела после лечения. Данные: среднее \pm SEM (n = 3). ns, незначительно; *, p < 0.05 (двусторонний t-тест Стьюдента). Изменения массы тела контролировались ежедневно на протяжении всего периода лечения. Все бактериальные обработки поддерживали массу тела в пределах допустимых значений, при этом ни одно животное не испытало потерю веса, превышающую 20% от исходного (предопределенный критерий гуманного конца, как описано в Методах). (f) Кривые выживаемости Каплана–Мейера до 40-го дня после имплантации опухоли (n = 3). ****, p < 0.0001 (логарифмический ранг [Mantel–Cox] тест).

противоопухолевую активность, пять штаммов (*R. qingshengii*, *C. gambrii*, *R. oskolensis*, *M. oxydans* и *A. humicola*) продемонстрировали значительное подавление роста опухоли, а три штамма (*E. americana*, *C. portucalensis* и *E. ludwigii*) достигли как подавления роста опухоли, так и активной регрессии опухоли. Важно отметить, что мониторинг безопасности на протяжении всего периода лечения показал, что ни одно из бактериальных лечений не вызвало значительной потери массы тела (Рисунок 2e), изменения массы тела оставались в пределах $\pm 20\%$ от базовых значений, что указывает на отсутствие серьезных негативных последствий для здоровья хозяина и физиологической гомеостаза. Более того, *E. americana* значительно продлило общую выживаемость по сравнению с контролем PBS, при этом обработанные мыши достигли 100% выживаемости и полного ответа (CR) (Рисунок 2f).

Эксперименты по повторному вызову опухоли продемонстрировали полное отторжение опухоли у всех *E. americana*-излеченных мышей (0/10 развили опухоли) по сравнению с равномерным ростом опухолей у наивных контролей (10/10), что подтверждает наличие стойкого антитуморного иммунитета с иммунологической памятью, сохраняющейся более 60 дней (Дополнительная фигура S5). Это отличает бактериальную иммунотерапию от традиционных методов лечения, которые не обладают памятью.

поколение, предлагая применения в качестве адъювантной терапии для предотвращения рецидива или консолидационной терапии после первоначального уменьшения опухоли.

Особенно интересное наблюдение возникло в результате анализа характеристик бактерий, связанных с способностью к регрессии опухолей. Три бактериальных штамма, которые успешно индуцировали регрессию опухолей (*E. americana*, *C. portucalensis* и *E. ludwigii*), были идентифицированы как факультативные анаэробные бактерии. Эта находка согласуется с установленными принципами бактериальной терапии рака, поскольку анаэробные бактерии обладают уникальной способностью селективно накапливаться и колонизировать твердые опухоли из-за характерного гипоксического и иммуносупрессивного микроокружения опухоли.^{26,27} Эта селективная колонизация опухоли, вероятно, обеспечила эффективную интритуморальную пролиферацию бактерий и, в сочетании с активированными иммунными клеточными ответами, значительно способствовала наблюдаемым явлениям регрессии опухолей.

E. americana, изолированная от *Dryophytes japonicus*, является Грамм-отрицательной факультативной анаэробной бактерией, принадлежащей к семейству *Enterobacteriaceae*. Хотя этот вид иногда ассоциируется с оппортунистическими инфекциями у новорожденных и иммунокомпрометированных пациентов в клинических условиях, он обычно признается имеющим низкий патогенный потенциал, с оппортунистическими, а не обязательными характеристиками вирулентности.^{28,29} Кроме того, *E. americana* обычно демонстрирует ограниченные профили антибиотикорезистентности и остается чувствительной к множеству клинически доступных антимикробных средств,^{28,29} что предполагает, что потенциальные побочные эффекты могут быть эффективно контролируемы с помощью целенаправленного антибиотикотерапевтического вмешательства при необходимости, тем самым уменьшая вероятность серьезных токсических осложнений. Насколько нам известно, это первое зарегистрированное демонстрационное исследование, в котором естественно встречающаяся кишечная бактерия, изолированная от дикого хозяина, достигла полной регрессии опухоли после однократного внутривенного введения. Учитывая ее исключительную противоопухолевую эффективность в сочетании с благоприятными характеристиками безопасности, *E. americana* была выбрана в качестве основного кандидата для последующих подробных механистических исследований и всесторонней терапевтической оценки.

Сравнительный анализ противоопухолевой эффективности *E. americana* по сравнению с традиционными терапевтическими агентами

ts

Чтобы тщательно оценить терапевтический потенциал *E. americana* и определить его эффективность в контексте установленных методов лечения рака, мы провели обширные сравнительные исследования, оценивающие его противоопухолевую активность по сравнению с традиционными терапевтическими агентами. В частности, мы сравнили *E. americana* с ингибитором иммунного контрольного пункта антителом против PD-L1 (Anti-PD-L1) и широко используемым химиотерапевтическим нано-медицинским препаратом на основе липосом доxorубицином (DOX), используя ту же модель мышей с опухолью Colon-26 (Рисунок 3а). Экспериментальный дизайн использовал клинически актуальные схемы дозирования: *E. americana* был введен в виде одной внутривенной инъекции через хвостовую вену в дозе 200 μ L (5×10^9 КФУ/мл), в то время как Anti-PD-L1 и DOX вводились внутривенно через день в течение четырех инъекций по 2,5 мг/кг, что соответствует стандартным терапевтическим протоколам.

Сравнительный анализ эффективности показал, что как Anti-PD-L1, так и DOX достигли значительного подавления роста опухоли по сравнению с контролем, получавшим PBS, что подтверждает противоопухолевую активность этих установленных терапий в нашей экспериментальной модели. Однако *E. americana* показал значительно более выраженные противоопухолевые эффекты, значительно превосходя оба традиционных лечения (Рисунок 3б, с). В то время как Anti-PD-L1 и DOX эффективно подавляли прогрессию опухоли и задерживали рост опухоли, только один полный ответ (КР) был отмечен в группе, получавшей Anti-PD-L1, и ни одна из терапий не достигла постоянной эрадикации опухоли в группе. В резком контрасте, *E. americana* полностью уничтожил опухолевые клетки и достиг 100% уровня КР среди всех обработанных животных (Рисунок 3д). Более того, одно введение *E. americana* увеличило выживаемость мышей как минимум на 30 дней по сравнению с контролем, получавшим PBS, демонстрируя как превосходную эффективность, так и устойчивую терапевтическую пользу (Рисунок 3е).

Наблюдаемое превосходство *E. americana* над традиционными терапиями можно объяснить фундаментальными различиями в их механизмах действия и способностях нацеливания на опухоли. PD-L1 является критически важным белком иммунных контрольных точек, который связывается с рецептором PD-1 на Т-клетках, тем самым подавляя активность Т-клеток и служа основным механизмом, с помощью которого опухоли уклоняются от противоопухолевого иммунитета.³⁰⁻³² Опухолевые клетки часто используют переизбыток PD-L1 для уклонения от иммунного надзора, что способствует прогрессии опухоли и метастазам. Хотя ингибиторы PD-L1 играют все более важную роль в современной иммунотерапии рака, у них отсутствует врожденная способность нацеливаться на опухоли, что приводит к системному распределению и потенциально

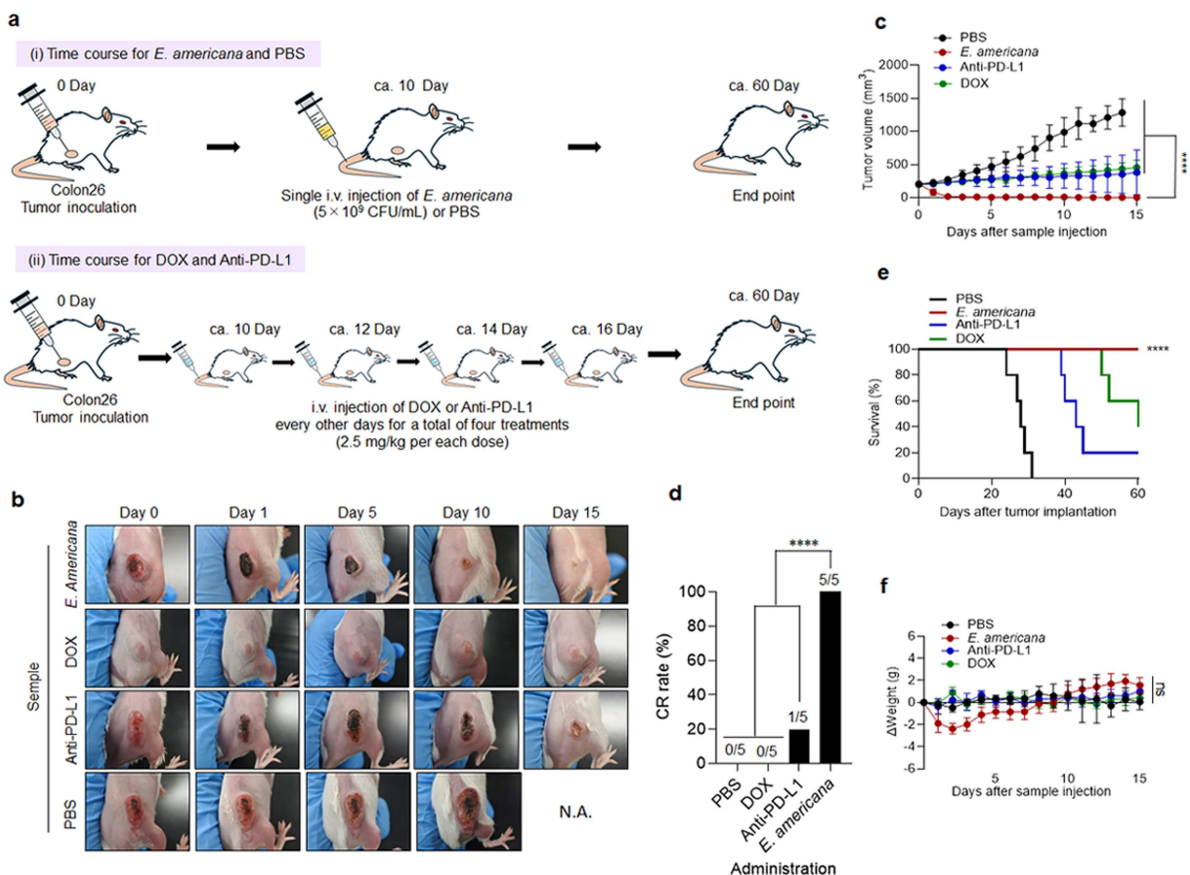


Рисунок 3. Противоопухолевая эффективность: *Ewingella americana* против традиционных терапий. (a) Экспериментальный дизайн, показывающий графики лечения для *E. americana* (однократная внутривенная инъекция), антитела против PD-L1 (четыре внутривенные инъекции через день) и доксорубицина (четыре внутривенные инъекции через день). Все группы лечения на панелях (b-f) оценивались одновременно, используя общую контрольную группу PBS, чтобы минимизировать межэкспериментальную изменчивость и обеспечить строгие сравнения в идентичных условиях. (b) Представительные изображения мышей после лечения; Н.Д., недоступно. (c) Ответ опухоли: однократная внутривенная доза *E. americana* (200 μ Л, 5×10^9 КФУ/мл); четыре дозы доксорубицина или анти-PD-L1 (200 μ Л, 2.5 мг/кг на дозу); PBS в качестве контроля. Данные: среднее \pm SEM (n = 5). ****, p < 0.0001 (двусторонний t-тест Стьюдента). (d) Уровень полного ответа на 30-й день после лечения. Данные: среднее \pm SEM (n = 5). ****, p < 0.0001 (двусторонний t-тест Стьюдента). (e) Кривые выживаемости Каплан–Мейер до 60-го дня (n = 5). ****, p < 0.0001 (тест логарифмического ранга). (f) Мониторинг массы тела: однократная доза *E. americana*, четыре дозы традиционного препарата или однократная доза PBS. Данные: среднее \pm SEM (n = 5). ns, незначительно (двусторонний t-тест Стьюдента).

подоптимальной терапевтической эффективности. Более того, значительная часть пациентов с раком не реагирует на лечение антителами против PD-L1, что подчеркивает настоятельную необходимость в более эффективных терапевтических стратегиях.³³

ДОКС представляет собой краеугольный камень химиотерапевтического вмешательства с множеством хорошо охарактеризованных механизмов действия, включая интеркалирование ДНК и образование аддуктов, отравление топоизомеразой II (ТорII), генерацию свободных радикалов и индукцию окислительного стресса, а также повреждение клеточной мембраны через измененный метаболизм сфинголипидов.³⁴ В этом исследовании мы использовали формулировку липосомального доксорубицина, которая представляет собой усовершенствованную систему доставки лекарств, предназначенную для повышения терапевтической эффективности при снижении системной токсичности. Липосомальная инкапсуляция позволяет улучшить накопление в опухоли благодаря эффекту повышенной проницаемости и удержания (EPR), что позволяет предпочитать высвобождение препарата в опухолевой микроокружении.^{35,36} Несмотря на эти фармакокинетические преимущества, липосомальный ДОКС все еще имеет ограничения в отношении специфического таргетирования опухоли по сравнению с естественными бактериями, нацеливающимися на опухоли, и его терапевтическая эффективность остается зависимой от механизмов пассивного накопления, а не активной колонизации опухоли.

В отличие от этих традиционных подходов, *E. americana* как факультативная анаэробная бактерия обладает врожденными свойствами нацеливания на опухоли, которые позволяют ей специфически накапливаться в опухолевых тканях, избегая здоровых органов. Эта селективная колонизация опухолей позволяет *E. americana* оказывать мощные локализованные терапевтические эффекты непосредственно в микроокружении опухоли, что объясняет, почему одно единственное введение бактерии было достаточным для достижения драматической и устойчивой регрессии опухоли. Мониторинг безопасности показал

что хотя небольшое снижение массы тела наблюдалось вскоре после *E. americana* инъекции, что соответствует легким острым воспалительным реакциям, значительных различий в массе тела среди групп лечения не было отмечено к 15 дню после лечения, что указывает на то, что бактериальная терапия не оказала негативного влияния на общее состояние здоровья мышей или физиологическую гомеостазу (Рисунок 3f).

Механистическое исследование противоопухолевой активности *E. americana*

Учитывая исключительную противораковую эффективность, продемонстрированную *E. americana* в модели мышей с опухолью Colon-26, мы провели всесторонние механистические исследования, чтобы прояснить биологические процессы, отвечающие за ее терапевтическую активность. Наш механистический анализ охватывал несколько дополнительных подходов для характеристики как прямых бактериальных эффектов, так и косвенных ответов, опосредованных хозяином.

Сначала, чтобы оценить способность к нацеливанию на опухоль и динамику колонизации *E. americana*, были проведены внутритуморальные бактериальные колониальные испытания для количественной оценки накопления и пролиферации бактерий в опухолевых тканях (Рисунок 4a). Эти исследования показали, что бактериальная нагрузка в опухолях увеличилась примерно в 3000 раз между 3 и 24 часами после внутритуморального введения, что демонстрирует высокоэффективное накопление в опухоли и быструю внутритуморальную пролиферацию. Это резкое увеличение плотности бактерий в опухолевых тканях подтверждает селективные свойства нацеливания на опухоль *E. americana* и предполагает, что гипоксическое микроокружение опухоли создает благоприятные условия для роста бактерий и терапевтической активности.

Чтобы оценить прямые цитотоксические эффекты *E. americana* против раковых клеток, мы использовали трехмерные модели опухолевых сфероидов Colon-26, которые лучше воспроизводят структурную организацию и клеточные взаимодействия, присутствующие в солидных опухолях, по сравнению с традиционными монослойными культурами. Эксперименты по совместной культуре, включающие опухолевые сфероиды с *E. americana* при различных концентрациях бактерий (5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 , 5×10^1 , и 5×10^0 КФУ),

показали зависимость разрушения сфероидов и гибели раковых клеток от дозы и времени. Сфероиды, обработанные наивысшей концентрацией бактерий (5×10^8 КФУ), были в значительной степени разрушены в течение 24 часов, при этом большинство раковых клеток было уничтожено за счет цитотоксичности, опосредованной бактериями (Рисунок 4b, c и Дополнительные данные 1). Примечательно, что даже при относительно низких концентрациях бактерий *E. americana* сохраняла достаточную цитотоксическую силу, чтобы достичь значительного разрушения раковых клеток благодаря бактериальным секретиремым цитолизинам, таким как гемолизин и экзотоксин (Дополнительный рисунок S6). Эти результаты были подтверждены *in vitro* испытаниями цитотоксичности с использованием методологии Cell Counting Kit-8 (ССК-8), примененной к мышинным колоректальным раковым клеткам (Colon-26), которые продемонстрировали эффективное уничтожение раковых клеток при всех протестированных концентрациях бактерий (Дополнительный рисунок S7).

Для характеристики внутриопухолевых иммунных ответов после введения бактерий мы провели комплексные гистопатологические и иммуногистохимические анализы срезов опухолевых тканей (Рисунок 4d, e). Для оценки архитектуры тканей и паттернов инфильтрации иммунными клетками использовались протоколы окраски гематоксилином и эозином (H&E) и иммуногистохимической (ИГХ) окраски. ИГХ-анализ показал, что опухолевые ткани от *E. americana*-обработанных мышей демонстрировали выраженную экспрессию множества иммунологических биомаркеров, включая CD19 (маркер В-клеток), CD3 (маркер Т-клеток) и CXCR4 (маркер нейтрофилов). Количественный анализ продемонстрировал значительное увеличение популяций иммунных клеток по сравнению с контрольными обработками: В-клетки (CD19⁺) увеличились на 3%, Т-клетки (CD3⁺) на 5%, и нейтрофилы (CXCR4⁺) на 30%. Эти результаты указывают на активное привлечение и активацию множества популяций иммунных клеток в микроокружении опухоли после *E. americana* лечения.

Кинетика рекрутирования иммунных клеток была дополнительно охарактеризована с помощью анализа количественной ПЦР (qPCR), который подтвердил, что В-клетки, Т-клетки и нейтрофилы были рекрутированы в опухолевые ткани уже через 6 часов после *E. americana* администрации (Рисунок 4f). Эта быстрая мобилизация иммунных клеток свидетельствует о том, что бактериальное лечение вызывает немедленные воспалительные реакции, которые способствуют последующим противоопухолевым эффектам. Нейтрофилы, которые представляют собой наиболее существенно увеличенную популяцию иммунных клеток, обладают множеством эффекторов, включая формирование внеклеточной ловушки нейтрофилов (NET), прямую фагоцитоз опухолевых клеток и секрецию провоспалительных цитокинов и хемокинов, которые могут рекрутировать дополнительные иммунные эффекторные клетки.³⁷

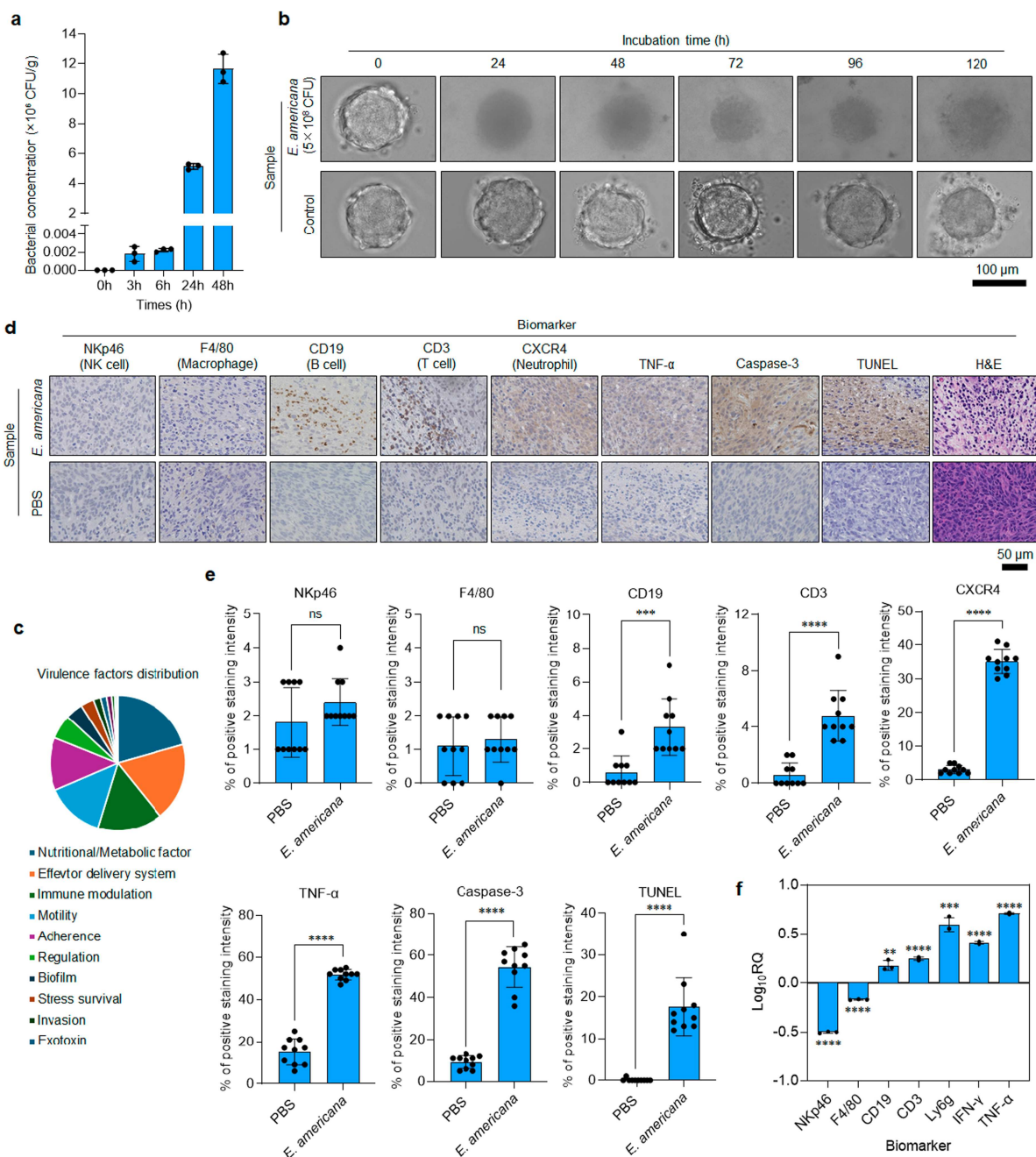


Рисунок 4. Механизмы, лежащие в основе противоопухолевых эффектов *Ewingella americana*. (a) Подсчет колоний в опухолях Colon26 после однократного внутривенного введения *E. americana* (5×10^9 КФУ/мл). Данные: среднее \pm SEM ($n = 3$ экспериментов). (b) Оптическая микроскопия сфероидов Colon26, инкубированных с *E. americana* или без него (5×10^8 КФУ). (c) Распределение факторов вирулентности *E. americana*. (d) Гистология опухоли на 1-й день после лечения: H&E, TUNEL и ИГХ для NKp46, F4/80, CD19, CD3, CXCR4, TNF- α , каспаза-3. (e) Квантификация клеток, положительных по маркерам (10 независимых полей на опухоль). Данные: среднее \pm SEM. ns, незначительно; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$ (двусторонний t-тест Стьюдента). (f) qPCR (6 ч после внутривенного введения): экспрессия NKp46, F4/80, CD19, CD3, Ly6G, IFN- γ , TNF- α (логарифм по основанию 10 изменения в несколько раз по сравнению с контрольной группой без лечения; АСТВ как внутренний контроль). Данные: среднее \pm SEM ($n = 3$). **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$ (двусторонний t-тест Стьюдента).

Согласно улучшенной активации иммунных клеток, опухолевые ткани, обработанные *E. americana*, продемонстрировали повышенное выражение ключевых провоспалительных цитокинов, включая интерферон- γ (IFN- γ) и фактор некроза опухоли- α (TNF- α), по сравнению с контрольными обработками. Эти цитокины играют решающую роль в противоопухолевом иммунитете: IFN- γ усиливает презентацию антигенов и способствует иммунным ответам типа Th1, в то время как TNF- α способствует активации и пролиферации Т-клеток,³⁸ тем самым усиливая иммуно-опосредованное разрушение опухоли.

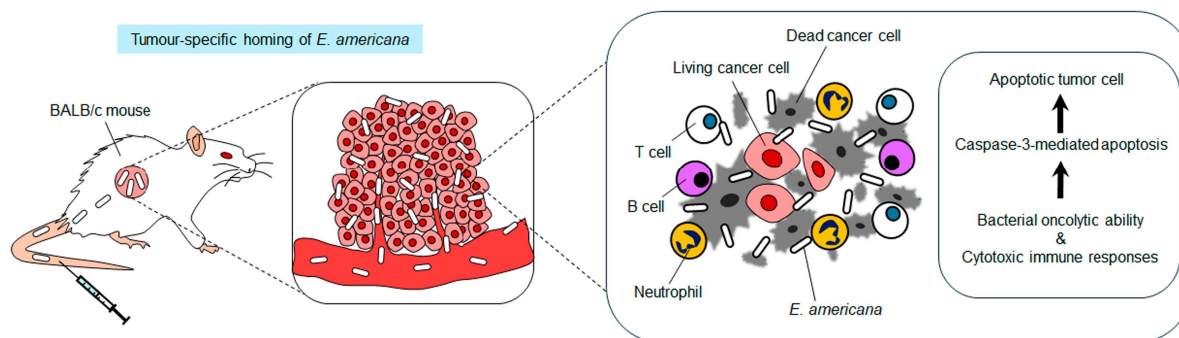


Рисунок 5. Схематическая иллюстрация предложенного механизма.

Чтобы подтвердить индукцию гибели опухолевых клеток, мы использовали дополнительные методы обнаружения апоптоза, включая иммунное окрашивание каспазы-3 и анализы метки концов дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (TUNEL). Оба метода показали широкое распространение апоптоза в опухолевых тканях, обработанных *E. americana*, подтверждая обширную гибель опухолевых клеток. Кроме того, окрашивание H&E продемонстрировало значительное разрушение тканей и архитектурные нарушения в обработанных опухолях по сравнению со свежими опухолевыми тканями, полученными от контрольных мышей, обработанных PBS.

В совокупности, эти механистические исследования демонстрируют, что *E. americana* использует многофасетный подход для достижения уничтожения опухоли, сочетая прямую бактериально-опосредованную цитотоксичность с активизацией иммунных ответов хозяина (Рисунок 5). Бактерия эффективно проникает и размножается в опухолях, где она оказывает прямые цитотоксические эффекты, одновременно активируя иммунные клетки (в частности, Т-клетки, В-клетки и нейтрофилы) для эффективного уничтожения раковых клеток с помощью дополнительных механизмов.

Биосовместимость и оценка безопасности *E. americana*

Учитывая критическую важность терапевтической безопасности в бактериальной терапии рака, мы провели всесторонние оценки системных эффектов и биосовместимости введения *E. americana*. Эти оценки безопасности были разработаны для выявления потенциальных неблагоприятных эффектов на основные органы и физиологические параметры, которые могут ограничить клинический перевод.

Гематологические и биохимические анализы были проведены через 7 дней после введения бактерий для оценки системной токсичности. Образцы крови мышей были собраны для определения общего анализа крови (CBC), включая количество лейкоцитов (WBC), количество тромбоцитов (PLT), гематокрит (HCT), концентрацию гемоглобина (HGB), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC), средний объем эритроцитов (MCV) и количество эритроцитов (RBC). Кроме того, образцы плазмы были проанализированы на предмет комплексных биохимических параметров для оценки функции печени, функции почек и метаболического состояния (Рисунок 6а и Дополнительная таблица S11).

Комплексный анализ гематологических и биохимических параметров не выявил значительных различий между *E. americana*-обработанными мышами и контрольными группами, получавшими PBS, по всем измеренным параметрам. Эти результаты указывают на то, что бактериальная обработка не вызвала обнаруживаемой гематологической токсичности, гепатотоксичности, нефротоксичности или метаболической дисфункции, что свидетельствует о отличной системной биосовместимости.

Для оценки потенциальной органоспецифической токсичности основные органы, включая печень, селезенку, сердце, легкие и почки, были собраны через 30 дней после лечения и подвергнуты детальному гистопатологическому анализу с использованием протоколов окраски гематоксилином и эозином (Рисунок 6b). Микроскопическое исследование тканевых срезов не выявило признаков наличия бактерий, повреждения тканей, воспалительной инфильтрации, некроза или других патологических изменений, связанных с введением бактерий в каком-либо из исследованных органов. Эти гистологические данные подтверждают, что *E. americana* лечение не вызывает обнаружимой органной токсичности или структурного повреждения жизненно важных органов.

Мы провели исследования острой токсичности с забором крови в нескольких ранних временных точках (24 часа, 48 часов, 72 часа и 240 часов после инъекции) (Дополнительная таблица S14–S17). Эти анализы подтверждают

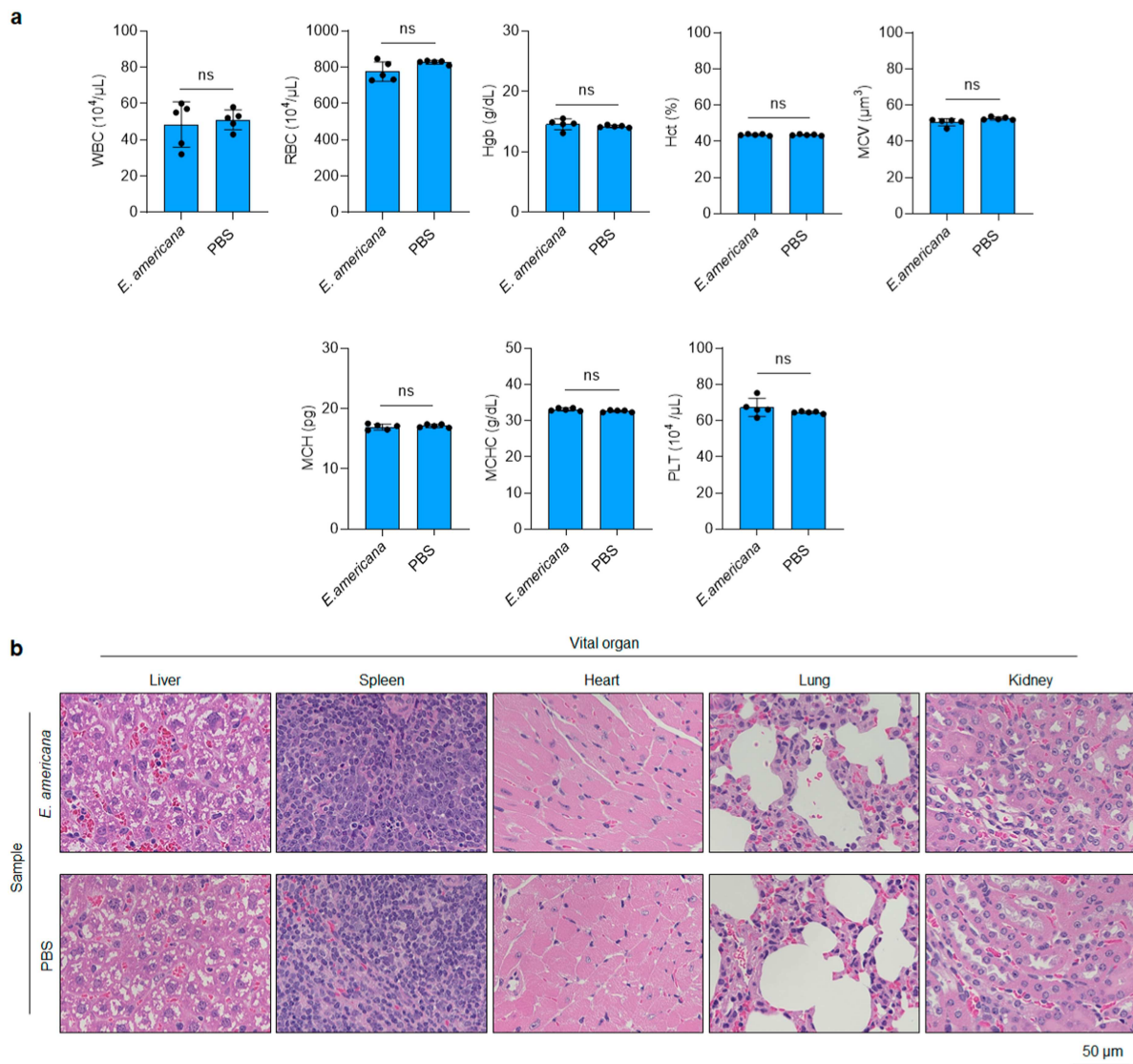


Рисунок 6. Биосовместимость *Ewingella americana*. (а) Общий анализ крови на 30 день (5×10^9 КФУ/мл *E. americana* или PBS). Данные: среднее \pm SEM ($n = 5$). Определения: WBC, лейкоциты; RBC, эритроциты; HGB, гемоглобин; HCT, гематокрит; MCV, средний объем эритроцитов; MCH, среднее содержание гемоглобина в эритроците; MCHC, средняя концентрация гемоглобина в эритроците; PLT, тромбоциты. ns, незначительно (двусторонний t-тест Стюдента). Все значения находятся в пределах нормальных физиологических диапазонов для мышей BALB/c (данные производителя). (б) Гистопатология (H&E) основных органов на 30 день после лечения *E. americana* или PBS.

что *E. americana* вызывает только временные, легкие реакции, которые проходят в течение 240 часов. Продленное наблюдение (60 дней) подтвердило устойчивую безопасность без хронической токсичности. Как естественно встречающаяся, чувствительная к антибиотикам линия, ²⁸ *E. americana* предлагает преимущества по сравнению с генетически модифицированными бактериями в отношении регуляторных путей и возможностей вмешательства по безопасности.

Анализы бактериальных колоний крови, проведенные через 0,08 (5 минут), 3, 24 и 48 часов после инъекции, продемонстрировали быструю кинетику очистки, при этом бактерии стали полностью недетектируемыми к 24 часам (Дополнительная фигура S8). Эта быстрая системная очистка, в сочетании с колонизацией, эксклюзивной для опухоли, объясняет благоприятный профиль безопасности. Эти результаты указывают на то, что *E. americana* эффективно очищается иммунными клетками после устранения опухоли и не оказывает негативного влияния на физиологию хозяина.

Отличный профиль безопасности, наблюдаемый в наших исследованиях, можно объяснить несколькими факторами. Во-первых, естественно встречающиеся, непатогенные характеристики кишечного штамма *E. americana* вероятно способствуют его биосовместимости. Во-вторых, очевидное эффективное удаление бактерий иммунными клетками хозяина

после устранения опухоли предотвращает бактериальную устойчивость и потенциальные долгосрочные осложнения. Эти результаты предполагают, что *E. americana* представляет собой многообещающего терапевтического кандидата с приемлемым профилем безопасности, подходящим для потенциальной клинической разработки.

Обсуждение

В этом всестороннем исследовании мы продемонстрировали, что бактериальные штаммы, изолированные из кишечных микробиомов амфибий и рептилий, обладают замечательной противораковой активностью с значительным терапевтическим потенциалом. Среди девяти систематически оцененных бактериальных штаммов восемь показали значительные антитуморные эффекты после однократного внутривенного введения, подчеркивая терапевтическое богатство этих неизученных микробных сообществ. Особенно примечательна *E. americana*, изолированная от японской древесной лягушки *Dryophytes japonicus*, которая достигла исключительных терапевтических результатов, включая полное ремиссию опухоли (КР) благодаря своей мощной и устойчивой противораковой эффективности.

Наши механистические исследования показали, что *E. americana* использует сложный терапевтический механизм двойного действия, включающий как прямые, так и непрямые антитуморные эффекты. Основной терапевтический механизм охватывает селективную колонизацию и пролиферацию опухоли этим факультативным анаэробным бактерием, в сочетании с мощными прямыми цитотоксическими эффектами против раковых клеток и комплексным иммуномодулирующим подавлением опухоли через согласованную активацию нейтрофилов, Т-клеток и В-клеток. Привлеченные популяции иммунных клеток выделяют провоспалительные цитокины, особенно TNF- α и IFN- γ , которые дополнительно усиливают иммунную активацию и вызывают значительную апоптозу в опухолевых тканях. Важно отметить, что *E. americana*, будучи изолированной от природного хозяина, продемонстрировала исключительную биосовместимость без признаков системной токсичности или неблагоприятных эффектов на основные органы, тем самым подтверждая свои обещания как с точки зрения эффективности, так и безопасности.

Наша подкожная модель Colon-26, хотя и отличается от ортотопических моделей колоректального рака, предоставляет критически важные преимущества для исследований бактериальной терапии в качестве доказательства концепции. Эта модель позволяет однозначно продемонстрировать опухолевую специфичность через циркуляцию в кровеносной системе, независимо от анатомической близости к кишечному тракту. Важно отметить, что наши результаты имеют прямое клиническое значение для метастатического заболевания, когда опухоли анатомически удалены от кишечной микробиоты (печень, легкие, перитонеум). Сингенный иммунокомпетентный модель сохраняет важные взаимодействия между хозяином, бактериями и опухолью, что имеет решающее значение для оценки иммуномодулирующих механизмов. Будущие ортотопические исследования предоставят дополнительные данные о взаимодействиях между бактериями и кишечной микробиотой.

E. americana обладает исключительной опухолевой специфичностью, вероятно, благодаря множеству синергетических механизмов, выходящих за рамки гипоксии. Опухолевые клетки чрезмерно экспрессируют CD47 (сигнал "не ешь меня"),^{39,40} создавая локально иммуносупрессивные микроокружения, позволяющие бактериям сохраняться, в то время как неповрежденный иммунный надзор в здоровых органах быстро удаляет бактерии. Дополнительные опухолевые специфические особенности — некротические области, аномальная васкулятура, способствующая экстравазации бактерий,⁴¹ измененные метаболические побочные продукты и нарушенная внеклеточная матрица — синергетически поддерживают селективную колонизацию. Наши колониальные анализы и гистопатологические исследования демонстрируют восстановление бактерий исключительно из опухолей, без обнаруживаемой колонизации в легких, печени, селезенке, почках или сердце. Поскольку физиологическая гипоксия существует в некоторых нормальных тканях (кишечные крипты, почечная мозговая область), полное отсутствие бактериальной колонизации в этих участках подтверждает, что гипоксия необходима, но недостаточна, и уникальная конstellация микроокружения опухоли создает благоприятную нишу для *E. americana*.

E. americana достигла лучших результатов (100% КР) по сравнению с анти-PD-L1 (только подавление опухоли), что отражает принципиально разные механизмы активации иммунной системы. Анти-PD-L1 пассивно устраняет ингибирующие сигналы на существующих Т-клетках ("освобождая тормоза"), в то время как *E. americana* активно стимулирует иммунитет через RAMPs (молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами), вызывая мощную активацию врожденного иммунитета через рецепторы распознавания паттернов, включая рецепторы, подобные Toll (TLRs) и рецепторы, подобные NOD (NLRs)⁴², которые привлекают нейтрофилы, макрофаги и NK-клетки, инициируя при этом новые воспалительные каскады. Эта механистическая ортогональность подтверждается различными паттернами инфильтрации иммунных клеток — *E. americana* вызывает резкое привлечение нейтрофилов⁴³, что непосредственно способствует разрушению опухоли, в то время как ингибиторы контрольных точек минимально влияют на популяции нейтрофилов. Эти различия предполагают потенциальный синергизм в комбинированной терапии и указывают на то, что бактериальная терапия может быть полезна для резистентных к ингибиторам контрольных точек.

пациенты, особенно те, у кого есть «холодные» опухоли, не имеющие инфильтрации Т-клетками,⁴⁴ которые составляют значительную часть пациентов, у которых не удастся традиционная иммунотерапия.

Наш выбор сравнителей был стратегическим: анти-PD-L1 представляет собой иммунотерапию лучшего класса с широким клиническим применением, что позволяет оценить преимущества бактериальной терапии по сравнению с текущими стандартами иммунотерапии. Липосомальный доксорубин (наноформуляция, одобренная FDA) представляет собой передовую технологию доставки лекарств; демонстрация превосходства подтверждает, что биологическая нацеленность на опухоль превосходит сложные фармацевтические системы доставки. Эти сравнители способствуют механистическим инсайтам (иммунный vs. цитотоксический) и сравнению с литературой. Будущие исследования будут включать колоректально-специфические схемы (5-ФУ, FOLFUX) для комплексного бенчмаркинга.

Фармакокинетические исследования показали благоприятные кинетические характеристики: быстрое выведение из крови в сочетании с эффективным накоплением в опухоли. Этот профиль объясняет как отличную безопасность, так и мощную эффективность при однократном введении. Анализ биораспределения подтвердил локализацию, эксклюзивную для опухоли. Эти характеристики благоприятно сравниваются с химиотерапевтическими агентами, демонстрирующими длительное системное воздействие и накопление в нормальных тканях. Пиковая в нутритуморная бактериальная нагрузка (48 часов) обеспечивает разумное время для комбинированной терапии.

Терапевтический механизм — колонизация, вызванная гипоксией, и иммунная активация, опосредованная RAMP, основан на характеристиках, общих для большинства солидных опухолей, что предполагает широкую применимость. Литература поддерживает это: бактерии, нацеленные на опухоли, демонстрируют эффективность в различных моделях рака.^{15,17,20} Гипоксические, иммунологически «холодные» опухоли (рак поджелудочной железы, тройной негативный рак груди) могут быть особенно отзывчивыми. Наши эксперименты со сферами демонстрируют прямую цитотоксичность, действующую через универсальные клеточные мишени. Будущие исследования в других моделях рака окончательно установят широкоспектровую активность.

Наши исследования определения дозы выявили 1×10^9 КФУ как оптимальную терапевтическую дозу и максимальную переносимую дозу, что указывает на узкое терапевтическое окно, требующее внимательного рассмотрения для клинического перевода. Тем не менее, комплексная оценка безопасности при этой дозе показала только временные, самопроизвольные воспалительные реакции с полным разрешением через 72 часа и отсутствием токсичности для органов. Фармакокинетический анализ продемонстрировал быстрое выведение бактерий из крови (неопределяемое через 24 часа) с селективным накоплением в опухоли, что объясняет приемлемый профиль безопасности, несмотря на узкие границы. Для клинической разработки несколько стратегий могут оптимизировать терапевтический индекс: фракционирование дозы для избежания пикового системного бремени, инъекции в опухоли для доступных опухолей, комбинация с более низкими дозами бактерий плюс ингибиторы контрольных точек и интенсивный мониторинг с возможностью антибиотикотерапии как механизма резервирования. Различия между видами в иммунных реакциях и аллометрическое масштабирование с соответствующими факторами безопасности будут направлять безопасные стартовые дозы для клинических испытаний.

Для клинического перевода ключевыми аспектами являются: протоколы GMP для обеспечения консистентности партий;⁴⁵ отбор пациентов, сосредоточенный на продвинутих солидных опухолях с документированной гипоксией; испытания с эскалацией дозы с интенсивным мониторингом безопасности; и исследование стратегий комбинации с ингибиторами контрольных точек (потенциально синергистическими), химиотерапией (улучшенная доставка препаратов) и радиацией (сенсбилизация опухоли). Исследование различных схем дозирования, инъекции в опухоли для доступных опухолей и скрининг аутохтонного микробиома представляют собой многообещающие направления для персонализированной бактериальной терапии.

Будущие исследования должны изучить альтернативные способы введения, особенно пероральное применение, которое может предложить преимущества в удобстве для пациентов и доступности. Однако пероральное введение *E. americana* потребует разработки стратегий защитных формуляций (кишечная оболочка, капсулы, устойчивые к кислоте), чтобы обеспечить выживание бактерий в условиях желудочной кислоты и успешную транслокацию из кишечника в опухолевые участки. Такие подходы на основе формуляций будут особенно актуальны для лечения первичных колоректальных опухолей или метастазов в печени, где анатомическая близость облегчает транслокацию бактерий. Хотя это технически сложно, стратегии перорального введения могут расширить клиническую применимость и позволить исследовать взаимодействия вводимых бактерий с микробиотой хозяина, что представляет собой многообещающее направление для будущих исследований, выходящее за рамки внутривенного подхода, подтвержденного в текущем исследовании.

Современные подходы к терапии рака, использующие кишечную микробиоту, в основном сосредоточены на стратегиях модификации микробиома или протоколах трансплантации фекальной микробиоты, а не на прямом введении бактерий. Тем не менее, кишечный тракт представляет собой обширный резервуар бактериального разнообразия, содержащий множество видов, которые остаются недостаточно охарактеризованными, несмотря на наличие уникальных метаболических путей, возможностей производства биоактивных соединений и иммуномодулирующих свойств с потенциальными терапевтическими приложениями. Настоящее исследование подчеркивает огромный потенциал систематического изучения и использования этих недостаточно исследованных микробных ресурсов для инновационных подходов к антитуморной терапии.

Наши результаты подчеркивают критическую необходимость расширенных исследовательских усилий, сосредоточенных на комплексной характеристике бактериальных штаммов, детальных механистических исследованиях взаимодействий бактерий и хозяев, а также систематической разработке новых терапевтических стратегий для клинического применения. Изучение разнообразных бактериальных сообществ от филогенетически различных видов хозяев может привести к выявлению дополнительных терапевтических кандидатов с комплементарными или улучшенными противораковыми свойствами. Более того, разработка оптимизированных систем доставки бактерий, комбинированных терапевтических подходов и персонализированных протоколов лечения на основе микробиомов отдельных пациентов представляет собой многообещающие направления для будущих исследований.

Успешная идентификация *E. americana* как мощного, естественно встречающегося противоракового агента устанавливает доказательство концепции для микробиомных бактериальных терапий и предоставляет основу для разработки нового класса лечения рака. Эти открытия могут в конечном итоге привести к трансформационным достижениям в прецизионной онкологии и предложить новую надежду для пациентов с раком, устойчивым к лечению. Будущие направления исследований должны сосредоточиться на расширении программ открытия бактерий, оптимизации терапевтических протоколов, исследовании комбинированной терапии и продвижении многообещающих кандидатов к клиническому переводу, чтобы в полной мере реализовать терапевтический потенциал микробиомных противораковых терапий.

Это исследование предоставляет новые идеи о терапевтическом потенциале ранее не охарактеризованных микробов кишечника от низших позвоночных и устанавливает основу для разработки естественно встречающихся бактериальных терапий в лечении рака. Наши результаты демонстрируют огромный неиспользованный потенциал, находящийся в разнообразных микробных экосистемах, и подчеркивают критическую важность усилий по охране биоразнообразия в продвижении медицинской науки и терапевтических инноваций.

Методы

Экспериментальные животные и этическое одобрение

Все эксперименты с животными проводились строго в соответствии с протоколами, одобренными Комитетом по уходу за животными и их использованию Японского передового института науки и технологий (номер одобрения 07-001), и выполнялись в соответствии с Руководящими принципами по экспериментам с животными, установленными Японской ассоциацией науки о лабораторных животных. Самки мышей BALB/c (штамм BALB/cCrSlc) в возрасте 5 недель и весом 18-21 г были получены от Japan SLC (Сидзуока, Япония). Животные содержались в среде, свободной от патогенов, в контролируемых условиях с 12-часовым циклом свет/темнота, при температуре 22 ± 2 °C, влажности $55 \pm 10\%$, и имели неограниченный доступ к стандартному лабораторному корму и стерильной воде. Мыши акклиматизировались в течение минимум 7 дней перед экспериментальными процедурами, чтобы минимизировать физиологические вариации, вызванные стрессом.

Сбор и изоляция кишечной микробиоты у амфибий и рептилий

Полевые выборки проводились с соответствующими экологическими разрешениями из определенных мест в Японии. *Дриофитес японский* (японская древесная лягушка) и *Такидромус такидромидес* (японский травяной ящер) были собраны из естественных мест обитания в префектуре Исикава, Япония, в то время как образцы *Цинопс пиррогастер* (японская огненная тритон) были получены из префектуры Окаяма, Япония. Все процедуры сбора животных проводились в соответствии с местными правилами охраны дикой природы и институциональными рекомендациями для полевых исследований.

Фор бактериальной изоляции животные были гуманно эвтаназированы с использованием соответствующих методов для минимизации страданий, и немедленно была проведена кишечная выборка в стерильных условиях. Стерильная инокуляционная петля была осторожно введена в кишечный тракт каждого образца для сбора бактерий, прилипших к кишечной поверхности. Собранный материал был суспендирован в стерильном фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7.4) для создания бактериальных суспензий. Впоследствии 100 μ L аллиquot этих суспензий были инокулированы на пять различных селективных и дифференциальных агаровых сред, чтобы максимизировать восстановление и разнообразие бактерий: (1) деоксихолатный агар, содержащий натрий деоксихолат, железо аммонийный цитрат, натрий хлорид, дигидрофосфат, лактозу, пептон и нейтральный красный (Фармацевтическая компания Ниссуи, Токио, Япония); (2) агар с маннитолом и солью, содержащий маннитол, натрий хлорид, фенол красный, мясной экстракт и пептон (Ниссуи

Фармацевтическая компания, ООД); (3) агар стандартного метода, содержащий экстракт дрожжей, пептон и глюкозу (Фармацевтическая компания Ниссуи); (4) агар Лурия-Бертани (LB), содержащий триптон, хлорид натрия и экстракт дрожжей (Nacalai Tesque, Киото, Япония); и (5) агар ATCC 543, содержащий натриевый сукцинат (Nacalai Tesque), дигидрофосфат калия (Nacalai Tesque), моногидрофосфат калия (Nacalai Tesque), сульфат магния гептагидрат (Nacalai Tesque), сульфат аммония (Nacalai Tesque), хлорид кальция (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Осака, Япония), цитрат железа(III) аммония (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation), EDTA (Dojindo, Кумамото, Япония), экстракт дрожжей (Becton, Dickinson and Company, Франклин-Лейкс, NJ, США) и порошок агара (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation).

Инокулированные пластины инкубировались анаэробно в течение 3 дней при комнатной температуре (25 °C) под освещением вольфрамовой лампы для стимуляции роста бактерий при поддержании физиологически релевантных условий. Индивидуальные бактериальные колонии с различными морфологическими характеристиками были тщательно изолированы с использованием стерильных игл для шприцев под стереомикроскопическим руководством для обеспечения чистоты колонии. Выбранные колонии подвергались нескольким раундам посева и подсева для получения чистых бактериальных изолятов. В результате этого систематического подхода было успешно изолировано 45 различных бактериальных штаммов. Факторы вирулентности *E. americana* были идентифицированы путем анализа общедоступного генома типового штамма ATCC 33852 (NCBI RefSeq: GCF_000735345.1) с использованием Базы данных геномов типовых штаммов,⁴⁶ а не путем секвенирования изолята, полученного в этом исследовании.

Идентификация и характеристика бактерий

Идентификация бактериальных видов проводилась с помощью анализа секвенирования гена 16S рибосомной РНК, выполненного компанией VEX Co., Ltd. (Токио, Япония) с использованием установленных молекулярных филогенетических методов. Кратко, геномная ДНК была извлечена из чистых бактериальных культур, и ген 16S рРНК был амплифицирован с использованием универсальных бактериальных праймеров. Продукты ПЦР были секвенированы с использованием методологии секвенирования Сангера, а полученные последовательности были сопоставлены с базой данных NCBI GenBank с использованием анализа Инструмента базового локального выравнивания (BLAST) для достижения идентификации на уровне видов. В результате этого комплексного анализа были идентифицированы и выбраны для дальнейшего исследования девять бактериальных штаммов, представляющих различные виды: *Priestia aryabhatai*, *Rhodococcus qingshengii*, *Ewingella americana*, *Citrobacter portucalensis*, *Chryseobacterium gambrini*, *Enterobacter ludwigii*, *Rathayibacter oskolensis*, *Microbacterium oxydans* и *Arthrobacter humicola*.

Оптимизация культивирования и роста бактерий

Протоколы культивирования бактерий были оптимизированы для каждого штамма с целью достижения максимального роста и жизнеспособности. Все бактериальные штаммы изначально тестировались на четырех различных агаровых средах для определения оптимальных условий роста: деоксихолатный агар, агар с маннитолом и солью, агар стандартного метода и агар LB (все получены от Фармацевтической компании Ниссуи и Nacalai Tesque). На основе оценок производительности роста были установлены специфические для штаммов условия культивирования.

E. americana, *C. gambrini* и *E. ludwigii* продемонстрировали оптимальные характеристики роста в среде Pearl Core E-MC64 (Eiken Chemical Co., Ltd., Токио, Япония), которая обеспечивала более высокий выход и жизнеспособность бактерий по сравнению с альтернативными средами. Эти штаммы были культивированы в среде Pearl Core при комнатной температуре (25 °C) в течение 5-10 дней с регулярным мониторингом для достижения оптимальной плотности бактерий. Оставшиеся бактериальные штаммы (*P. aryabhatai*, *R. qingshengii*, *C. portucalensis*, *R. oskolensis*, *M. oxydans* и *A. humicola*) демонстрировали превосходный рост в бульоне Лурia-Бертани (LB) (Nacalai Tesque) и поддерживались при идентичных температурных и временных условиях.

Для *in vivo* применения бактерии использовались непосредственно в соответствующих культурах, а не были ресуспендированы в PBS, чтобы поддерживать оптимальную жизнеспособность бактерий и метаболическую активность. В частности, *E. americana*, *C. gambrini* и *E. ludwigii* были введены в среду Pearl Core E-MC64, в то время как *P. aryabhatai*, *R. qingshengii*, *C. portucalensis*, *R. oskolensis*, *M. oxydans* и *A. humicola* были введены в бульон LB. Такой подход сохраняет фитнес бактерий, предотвращая осмотический стресс, который может возникнуть во время ресуспензии в PBS.

Жизнеспособность и концентрация бактерий подтверждались незадолго до каждого введения с помощью следующих процедур: (1) измерение числа клеток с использованием счетчика бактерий (CASY Cell Counter & Analyzer; OMNI Life Science, Базель, Швейцария); (2) измерения оптической плотности при 600 нм (OD600) для оценки концентрации бактерий; (3) серийное разведение и подсчет колониеобразующих единиц (КФУ) на агаровых пластинах для определения количества жизнеспособных бактерий; и (4) микроскопическое исследование для подтверждения морфологии бактерий и отсутствия загрязнений. Бактериальные суспензии готовились свежими для каждого эксперимента и использовались в течение 2 часов после подготовки. Оценки жизнеспособности последовательно показывали >95% жизнеспособности бактерий в момент введения, при этом концентрации бактерий поддерживались на уровне 5×10^9 КФУ/мл ($\pm 10\%$) во всех экспериментах для обеспечения воспроизводимости.

Все бактериальные культуры выращивались в жидкой среде с легким перемешиванием для обеспечения достаточной аэрации и распределения питательных веществ. Рост бактерий контролировался путем измерения оптической плотности и определения колониеобразующих единиц (КФУ), чтобы достичь стабильных концентраций бактерий для экспериментальных применений. Все реагенты для бактериального культивирования были получены от сертифицированных поставщиков (Nacalai Tesque, Киото, Япония; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Осака, Япония) для обеспечения воспроизводимости и контроля качества.

Предварительный скрининг биосовместимости

Перед комплексной оценкой противоопухолевой активности все 45 изолированных бактериальных штаммов прошли систематический скрининг биосовместимости для выявления штаммов с приемлемыми профилями безопасности для *in vivo* применения. Самки мышей BALB/c (7 недель, средний вес 20 г, $n = 3$ на группу) были введены *intravenously* через хвостовую вену с 200 μ L культуры, содержащей отдельные бактериальные штаммы при стандартизированных концентрациях 5×10^9 КФУ/мл.

Критерии оценки биосовместимости включали: (1) выживание животных в течение минимум 7 дней после инъекции, (2) поддержание массы тела с потерей менее 20%, (3) отсутствие серьезных клинических признаков, включая вялость, респираторные расстройства или неврологические симптомы, и (4) нормальные поведенческие реакции и активность в кормлении. Мыши наблюдались непрерывно в течение первых 24 часов после инъекции, а затем ежедневно оценивались в течение 7 дней. Измерения массы тела фиксировались ежедневно для количественной оценки потенциальных системных токсических эффектов.

На основе этих всесторонних оценок безопасности были отобраны девять бактериальных штаммов, демонстрирующих приемлемые профили биосовместимости, для последующих детальных исследований противоопухолевой эффективности. Этот строгий подход к отбору гарантировал, что только бактериальные штаммы с благоприятными характеристиками безопасности переходили к этапам терапевтической оценки.

Культивирование клеток и их поддержание

Клетки колоректального рака мышей (Colon-26) были получены из Японского коллекционного банка биоресурсов (JCRB Cell Bank, Токио, Япония) и поддерживались в соответствии с установленными протоколами для обеспечения подлинности клеточной линии и воспроизводимости экспериментов. Клетки Colon-26 культивировались в среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco, Гранд-Айленд, NY, США), обогащенной 10% сывороткой плода крупного рогатого скота (FBS), 2 mM L-глутамин, 1 mM натриевого пирувата и антибиотиками, включая гентамицин и пенициллин-стрептомицин (по 100 МЕ/мл каждый), для предотвращения бактериального загрязнения при поддержании оптимальных условий роста клеток.

Клетки поддерживались в увлажненной инкубаторе при 37 °C с атмосферой 5% CO₂ для воспроизведения физиологических условий. Чтобы избежать генетических нестабильностей, связанных с чрезмерным количеством проходов, клетки регулярно восстанавливались из ранних проходов, криоконсервированных в жидком азоте. Жизнеспособность клеток и их морфология регулярно оценивались с использованием тестов на исключение трипанового синего и микроскопического исследования для обеспечения качества культуры и экспериментальной согласованности.

Приготовление терапевтического агента

Конвенциональные терапевтические агенты были подготовлены в соответствии с клиническими протоколами для обеспечения значимых сравнительных исследований. Липосомальный доксорубин (ДОКС), продвинутая наноформуляция широко используемого

антрациклинового химиотерапевтического агента, был получен в виде клинической формулы (2 мг/мл, Baxter K.K., Токио, Япония) и хранился при 4 °С для поддержания стабильности и сохранения целостности липосом. Антитело против PD-L1, представляющее собой ингибитор иммунных контрольных точек, характерный для современных подходов к иммунотерапии, было получено от Leinco Technologies (Сент-Луис, Миссури, США) в концентрации 6 мг/мл и хранилось при -80 °С для сохранения биологической активности. Перед введением оба агента были разбавлены в стерильном физиологическом растворе для достижения желаемых концентраций дозировки в соответствии с установленными протоколами, при этом особое внимание уделялось поддержанию структурной целостности формулы липосомального ДОКС в процессе разбавления.

Оптимизация дозы

Для определения оптимальной бактериальной дозы для терапевтической эффективности и безопасности были проведены предварительные исследования по определению дозы с использованием *E. americana*. Самки мышей BALB/c с опухолями Colon-26 (примерно 200 мм³, $n = 5$ в группе доз) получили однократные внутривенные инъекции *E. americana* в различных концентрациях: 2×10^7 , 2×10^8 и 1×10^9 КФУ в 200 µL объема. Рост опухоли, выживаемость и масса тела контролировались в течение 8 дней после лечения. На основе этих исследований 1×10^9 КФУ (5×10^9 КФУ/мл) была определена как оптимальная доза, достигающая максимальной терапевтической эффективности (полная регрессия опухоли) при сохранении приемлемых профилей безопасности. Дозы, превышающие 1×10^9 КФУ, приводили к острой смертности, что установило эту дозу как максимальную переносимую для последующих экспериментов.

Оценка терапевтической эффективности *in vivo*

Комплексные исследования терапевтической эффективности против опухолей были проведены с использованием хорошо установленной сингенной модели опухоли Colon-26, которая сохраняет иммунокомпетентность и воссоздает ключевые характеристики человеческого колоректального рака. Самки мышей BALB/c (6 недель, средний вес 20 г, $n = 5$ в группе лечения) были подсажены подкожно 1×10^6 клеток Colon-26, суспендированных в 100 µL свежего RPMI1640 в области правого бока. Установление опухоли контролировалось ежедневно с помощью пальпации и измерений штангенциркулем.

Когда опухоли достигли примерно 200 мм³ в объеме (обычно через 7-10 дней после инокуляции), мыши были случайным образом распределены по группам лечения, чтобы минимизировать предвзятость выбора. Бактериальные препараты вводились в виде однократных внутривенных инъекций через хвостовую вену с использованием 200 µL культуры с каждым бактериальным штаммом при 5×10^9 КФУ/мл. Контрольные группы получали эквивалентные объемы стерильного PBS. Проведение лечения осуществлялось в стерильных условиях с использованием игл 29-го калибра, чтобы минимизировать травму тканей и обеспечить точную доставку.

Мониторинг роста опухоли проводился ежедневно с использованием цифровых штангенциркулей, а объемы опухолей рассчитывались по стандартной эллипсоидной формуле: $V = L \times W^2/2$, где L обозначает самый длинный диаметр, а W - перпендикулярную ширину. Измерения массы тела проводились ежедневно для оценки потенциальной системной токсичности. Общий статус здоровья оценивался через анализ поведенческих паттернов, активности кормления и клинических признаков.

Анализ выживаемости проводился в течение 60-дневного наблюдательного периода, с гуманными конечными точками, установленными в соответствии с институциональными рекомендациями. Мыши подвергались эвтаназии, когда объемы опухолей превышали 1,500 мм³, когда потеря массы тела превышала 20 %, или когда наблюдались признаки сильного стресса, в соответствии с утвержденными протоколами по благополучию животных.

Для оценки индукции долгосрочного антитуморного иммунитета мыши, свободные от опухолей и достигшие полной регрессии после лечения *E. americana*, были повторно подвергнуты испытанию на 30-й день после лечения путем подкожной инъекции клеток 1×10^6 Colon-26 в контралатеральный бок. В качестве контроля использовались мыши BALB/c того же возраста. Рост опухоли контролировался в течение дополнительных 30 дней.

Сравнительные исследования терапевтической эффективности

Для оценки терапевтического потенциала *E. americana* по сравнению с установленными методами лечения рака были проведены сравнительные исследования эффективности с использованием идентичных экспериментальных условий. Самки мышей BALB/c, несущих

Опухоли Colon-26 (примерно 200 мм³) лечили либо с помощью одной внутривенной инъекции *E. americana* (200 μL, 5 × 10⁹ КФУ/мл), либо с использованием традиционных терапий, проводимых в соответствии со стандартными клиническими протоколами.

Группы традиционной терапии получали либо доксорубин (2,5 мг/кг массы тела), либо антитело против PD-L1 (2,5 мг/кг массы тела), вводимые внутривенно через день на протяжении четырех общих доз, что соответствует клинически значимым схемам дозирования. Все препараты были разбавлены в стерильном физиологическом растворе для достижения соответствующих концентраций и вводились через инъекцию в хвостовую вену в стерильных условиях.

Терапевтические ответы оценивались путем измерения объема опухоли, анализа выживаемости и определения частоты полного ответа (КР). Полный ответ определялся как отсутствие прощупываемой опухолевой массы, сохраняющейся в течение минимум 30 дней после начала лечения. Частичный ответ, стабильная болезнь и прогрессирующая болезнь были определены в соответствии с установленными предклиническими онкологическими критериями. Все группы лечения оценивались одновременно с использованием общей контрольной группы PBS для минимизации межэкспериментальной изменчивости и обеспечения строгого сравнения в идентичных условиях.

Оценка интратуморной бактериальной колонизации

Для исследования способностей *E. americana* к таргетированию опухолей были проведены количественные бактериальные колониальные анализы для оценки накопления и динамики пролиферации бактерий в опухоли. Самки мышей BALB/c с опухолями Colon-26 (примерно 200 мм³) получали внутривенные инъекции *E. americana* (200 μL, 5 × 10⁹ КФУ/мл). В заранее определенные моменты времени (3, 6, 24 и 48 часов после инъекции) мыши были эвтаназированы, опухоли были асептически удалены и взвешены.

Опухолевые ткани обрабатывались в стерильных условиях для количественной оценки бактериальной нагрузки. Вырезанные опухоли были гомогенизированы в 1 мл стерильного PBS с использованием стерильных пестиков в ламинарном шкафу для предотвращения загрязнения. Гомогенаты подвергались механическому перемешиванию при 380 об/мин в течение 20 минут при 15 °C, чтобы обеспечить полное высвобождение бактерий из матриц ткани. Супернатанты были собраны и последовательно разведены (100, 10⁻¹, 10⁻² и 10⁻³) в стерильном PBS.

Для подсчета бактерий 5 μL алиготы каждого разведения были засеяны на соответствующие агаровые среды и инкубированы в течение 5 дней при комнатной температуре для развития колоний. Бактериальные колонии были подсчитаны вручную с использованием установленных микробиологических техник, а КФУ/г опухолевой ткани были рассчитаны для определения эффективности бактериальной колонизации и кинетики пролиферации в опухолевых тканях.

Анализ колоний в крови

Анализы бактериальных колоний в образцах крови проводились для оценки бактериальной фармакокинетики. Самкам мышей BALB/c вводили внутривенные инъекции *E. americana* (200 μL, 5 × 10⁹ КФУ/мл). Образцы крови собирали из нижней полой вены мышей через 5 мин, 3 ч, 24 ч и 48 ч. Каждый образец крови (100 μL) был засеян на агаровую пластину. После анаэробной инкубации в течение 1 дня были получены бактериальные колонии, которые были зафиксированы. Для подсчета бактериальных колоний супернатант был разведен 0, 10, 100 и 1000 раз с PBS, после чего образец (5 μL) был засеян на агаровую пластину, как упоминалось выше. В конечном итоге бактериальные колонии были подсчитаны вручную.

Ассайи цитотоксичности трехмерных опухолевых сфероидов

Для оценки прямых цитотоксических эффектов *E. americana* против раковых клеток в более физиологически релевантной модели использовались ассайи трехмерных опухолевых сфероидов. Клетки Colon-26 были посеяны по 1 × 10⁴ клеток на лунку в специализированных 3D культурах сфероидов (Cell-able® BP-96-R800; Toyo Gosei Co., Ltd., Токио, Япония) в соответствии с рекомендациями производителя, оптимизированными для формирования и поддержания сфероидов.

Сфероиды культивировались в течение 5 дней при 37 °C в увлажненном инкубаторе с 5% CO₂ для достижения однородной формы и созревания сфероидов. Культивирующая среда заменялась каждые 48 часов для поддержания оптимальных условий питания и удаления продуктов метаболизма. При достижении соответствующего размера и плотности,

сфероиды подвергались воздействию различных концентраций *E. americana* (5×10^4 , 5×10^5 , 5×10^6 , 5×10^7 и 5×10^8 КФУ) для установления зависимостей между дозой и ответом.

После бактериального воздействия сфероиды были тщательно промыты стерильным PBS для удаления неадгезивных бактерий и выращивались в стандартных условиях. Морфология, целостность и жизнеспособность сфероидов оценивались с использованием флуоресцентной микроскопии (система IX73, Корпорация Олимпус, Токио, Япония), оснащенной соответствующими зеркальными блоками (IRDYE800-33LP-A-U01; Semrock Inc.) и высококорректируемыми объективами ($20 \times$ увеличение, численная апертура 0.75; UPLSAPO20X, Олимпус). Выполнялась съемка в режиме таймлапса для документирования кинетики разрушения сфероидов и цитотоксических эффектов, вызванных бактериями, в течение 24-120 часов наблюдения.

Количественный анализ ПЦР иммунных ответов

Для характеристики механизмов иммунного ответа, лежащих в основе *противоопухолевой активности E. americana* было проведено комплексное количественное исследование ПЦР (qPCR) для оценки инфильтрации иммунных клеток и профилей экспрессии цитокинов в опухолевых тканях. Самки мышей BALB/c, имеющие опухоли Colon-26 (примерно 200 мм^3), получили *E. americana* ($200 \mu\text{L}$, 1×10^9 КФУ) или контроль PBS путем внутривенной инъекции.

Через 6 часов после лечения, в момент, выбранном для захвата ранних событий активации иммунной системы, мыши были гуманно эвтаназированы, и опухолевые ткани были немедленно собраны и быстро заморожены в жидком азоте для сохранения целостности РНК. Экстракция общего РНК проводилась с использованием установленных протоколов с ручными гомогенизаторами (Thermo Fisher Scientific Inc., Уолтем, Массачусетс, США), после чего применялись методы очистки на основе колонок для обеспечения высококачественной РНК, подходящей для количественного анализа.

Анализ qPCR проводился с использованием Системы количественной ПЦР в реальном времени QuantStudio 1 (Thermo Fisher Scientific) с наборами праймеров-проб TaqMan, специфичных для генов, разработанных для оптимальной специфичности и эффективности (Дополнительная таблица S12). Целевые гены включали маркеры для популяций иммунных клеток: CD3 (Т-клетки), CD19 (В-клетки), Ly6G (нейтрофилы), F4/80 (макрофаги) и маркеры NK-клеток, а также воспалительные цитокины IFN- γ и TNF- α . АСТВ (β -актин) служил в качестве эндогенного контрольного гена, измеряемого с использованием пластин TaqMan Array Mouse Endogenous Control (Thermo Fisher Scientific).

Все реакции проводились в тройном экземпляре для обеспечения статистической надежности, при этом условия термоциклирования были оптимизированы для химии TaqMan: 50°C в течение 2 минут (активация AmpErase UNG), 95°C в течение 2 минут (активация полимеразы ДНК AmpliTaq Gold), за которыми следовали 40 циклов денатурации при 95°C в течение 1 секунды и отжига/удлинения при 60°C в течение 20 секунд. Валидация эффективности ПЦР проводилась с использованием 10-кратных серийных разведений, достигая эффективности в диапазоне от 90-100% для всех наборов праймеров. Данные экспрессии генов анализировались с использованием метода сравнительного Ct и представляются как изменение в несколько раз (\log_{10} относительная количественная оценка) по сравнению с контрольными группами.

Имуногистохимический анализ опухолевых тканей

Комплексный иммуногистохимический (ИГХ) анализ был проведен для визуализации и количественной оценки паттернов инфильтрации иммунных клеток в опухолевых тканях после *E. americana* лечения. Самки мышей BALB/c с опухолями Colon-26 (примерно 200 мм^3) были подвергнуты лечению *E. americana* ($200 \mu\text{L}$, 1×10^9 КФУ) или контролем PBS и были эвтаназированы через 24 часа после лечения для захвата пика инфильтрации иммунных клеток.

Опухолевые ткани были немедленно зафиксированы в 10% нейтральном буферном формалине на 24-48 часов, после чего были выполнены стандартные процедуры парафинового встраивания, проведенные Институтом биопатологии, ООО (Оита, Япония) в соответствии с установленными гистопатологическими протоколами. Срезы тканей были нарезаны толщиной 3-4 μm с использованием прецизионных микротомов и смонтированы на заряженных стеклянных слайдах для процедур иммуноокрашивания.

Протоколы окраски ИГХ использовали первичные антитела, специфичные к маркерам иммунных клеток, включая CD3 (Т-клетки), CD19 (В-клетки) и CXCR4 (нейтрофилы), а также маркеры апоптоза, включая активированную каспазу-3 (Дополнительная таблица S13). Инкубации с первичными антителами проводились в соответствии с оптимизированными протоколами с соответствующими положительными и отрицательными контролями для обеспечения специфичности окраски и воспроизводимости. Срезы были контрастированы гематоксилином для обеспечения клеточного контекста и исследованы с использованием высококорректирующей световой микроскопии (система BX-X800, Корпорация Keyence, Осака, Япония).

Количественный анализ положительных окрашенных областей проводился с использованием цифровых микроскопических систем, оборудованных специализированным программным обеспечением для анализа изображений (Анализатор BZ-X800 V1.1.2.4, Корпорация Keyence). Для каждого образца анализировались несколько репрезентативных полей, чтобы обеспечить статистическую достоверность, при этом количественная оценка проводилась подготовленным персоналом, не знающим условий лечения, чтобы минимизировать аналитический bias.

Тест на детекцию апоптоза TUNEL

Для обнаружения и количественной оценки апоптотической гибели клеток в опухолевых тканях после лечения *E. americana* были проведены тесты на маркировку концов с помощью терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы dUTP (TUNEL). Срезы опухолевых тканей, инкапсулированные в парафин, были подготовлены, как описано выше, и подвергнуты окрашиванию TUNEL с использованием установленных протоколов с соответствующими положительными и отрицательными контролями. Количество положительных по TUNEL клеток было оценено с использованием цифровой микроскопии и систем анализа изображений для определения степени апоптоза, индуцированного лечением.

Комплексная оценка безопасности и токсичности

Проведены обширные оценки безопасности для оценки системных эффектов и потенциальной токсичности введения *E. americana*. Самкам мышей BALB/c (7 недель, средний вес 20 г, $n = 5$ на группу) вводили внутривенно либо *E. americana* (200 μ мл, 1×10^9 КФУ), либо контрольный PBS через инъекцию в хвостовую вену.

Гематологические и биохимические анализы проводились через 1 день, 2 дня, 3 дня, 10 дней и 30 дней после лечения в сертифицированных лабораториях (Japan SLC Inc. и Oriental Yeast Co., Ltd., Токио, Япония) в соответствии со стандартными протоколами. Образцы крови собирали из нижней полой вены под терминальной анестезией для получения достаточных объемов образцов для комплексного анализа.

Параметры общего анализа крови (СВС) включали количество лейкоцитов (WBC), количество эритроцитов (RBC), количество тромбоцитов (PLT), гематокрит (HCT), концентрацию гемоглобина (HGB), средний объем эритроцитов (MCV), среднюю массу гемоглобина (MCH) и среднюю концентрацию гемоглобина в эритроцитах (MCHC). Биохимический анализ охватывал маркеры функции печени (АЛТ, АСТ, ЩФ, общий билирубин), показатели функции почек (мочевина, креатинин), метаболические параметры (глюкоза, общий белок, альбумин) и электролитный баланс (натрий, калий, хлор).

Гистопатологическое исследование

Для комплексной оценки токсичности органов основные органы, включая печень, селезенку, сердце, легкие и почки, были извлечены через 30 дней после лечения и подвергнуты детальному гистопатологическому исследованию. Органы фиксировались в 10% нейтральном буферном формалине, обрабатывались с использованием стандартных гистологических техник и нарезались на срезы толщиной 4-5 μ м. Окраска гематоксилином и эозином (H&E) проводилась в соответствии с установленными протоколами, а срезы исследовались квалифицированными ветеринарными патологоанатомами на наличие признаков повреждения тканей, воспалительной инфильтрации, некроза или других патологических изменений, связанных с лечением.

Статистический анализ и представление данных

Все эксперименты проводились с соответствующей статистической мощностью на основе предварительных исследований и установленных эффектов. Каждый эксперимент включал минимум три биологических репликата ($n \geq 3$) и повторялся независимо как минимум три раза для обеспечения воспроизводимости и статистической валидности. Для *in vivo* исследований использовались размеры групп $n = 5$ на основе расчетов мощности анализа для выявления клинически значимых различий с мощностью 80% при $\alpha = 0.05$.

Количественные данные представлены в виде среднего \pm стандартной ошибки среднего (SEM), если не указано иное. Статистические анализы проводились с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (версия 9.4.0; GraphPad Software Inc., Бостон, МА, США). Сравнения между двумя группами анализировались с использованием непарных *t*-тестов Стьюдента с коррекцией Уэлча для неравных дисперсий, когда это было уместно. Сравнения между несколькими группами анализировались с использованием однофакторного анализа дисперсии (ANOVA), за которым следовал пост-хок тест Тьюки для парных сравнений.

сравнения. Данные о выживаемости анализировались с использованием кривых выживаемости Каплан-Майер, а статистическая значимость определялась с помощью тестов логарифмического ранга (Мантель-Кокс).

Для всех анализов значения $P < 0.05$ считались статистически значимыми, уровни значимости обозначались следующим образом: $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ и $****P < 0.0001$. Все статистические тесты были двусторонними, если не указано иное, и предположения о нормальности и равенстве дисперсий были проверены с использованием соответствующих диагностических тестов перед применением параметрических статистических методов.

Раскрытие потенциальных конфликтов интересов

Авторы заявляют, что у них нет конкурирующих интересов.

Благодарности

Мы благодарим мистера Мицуру Кавахара (JAIST) и мисс Марико Дегучи (JAIST) за их преданную поддержку в проведении экспериментов на животных.

Вклад авторов

CRedit: **Сейго Ивата:** Исследование, Формальный анализ, Курирование данных, Валидация, Написание – оригинальный черновик; **Наги Ямасита:** Исследование, Формальный анализ, Курирование данных, Валидация; **Кенсуке Асукабе:** Исследование, Формальный анализ, Курирование данных, Валидация; **Матамо Сакари:** Программное обеспечение, Формальный анализ; **Эйдзиро Мияко:** Концептуализация, Методология, Программное обеспечение, Формальный анализ, Ресурсы, Курирование данных, Написание – оригинальный черновик, Администрирование проекта, Привлечение финансирования, Написание – рецензирование и редактирование, Визуализация, Надзор.

Финансирование

Эта работа была финансово поддержана Японским обществом содействия науке (JSPS) грантом KAKENHI на научные исследования (А) (номер гранта 23Н00551), грантом JSPS KAKENHI на исследование с вызовом (пионерский) (номер гранта 25К21827), программой JSPS по формированию ведущих исследовательских университетов Японии (J-PEAKS) (номер гранта JPJS00420230006) и Программой Японского агентства науки и технологий (JST) по совместному созданию экосистемы стартапов (номер гранта JPMJSF2318). S. I. благодарит JST SPRING (номер гранта JPMJSP2102).

Заявление о доступности данных и кода

Все данные, необходимые для оценки выводов в статье, представлены в статье и/или в дополнительных материалах. Дополнительные данные, относящиеся к этой статье, доступны у соответствующего автора по разумному запросу.

ORCID

Эйдзиро Мияко 0000-0002-1157-6174

Ссылки

1. Michaudel C, Sokol H. Кишечная микробиота на службе иммунометаболизма. *Cell Metab.* 2020;32(4):514–523. doi: 10.1016/j.cmet.2020.09.004.
2. Quaglio AEV, Grillo TG, Oliveira ECS, Stasi LC, Sasaki LY. Кишечная микробиота, воспалительное заболевание кишечника и рак толстой кишки. *World J Gastroenterol.* 2022;28(30):4053–4060. doi: 10.3748/wjg.v28.i30.4053.
3. Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL, Blumberg RS. Как колонизация микробиотой в раннем возрасте формирует иммунную систему. *Science.* 2016;352:539–544. doi: 10.1126/science.aad9378.
4. Ting NL, Lau HC, Yu J. Фармакомикробиомика рака: нацеливание на микробиоту для оптимизации результатов терапии рака. *Gut.* 2022;71:1412–1425. doi: 10.1136/gutjnl-2021-326264.
5. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Взаимодействие между микробиотой и иммунитетом при здоровье и болезни. *Cell Res.* 2020;30:492–506. doi: 10.1038/s41422-020-0332-7.
6. Dutta D, Lim SH. Двухнаправленное взаимодействие между кишечным микробиомом и раком: возможности для терапевтических вмешательств. *Biomark Res.* 2020;8:31. doi: 10.1186/s40364-020-00211-6.

7. Karwowska Z, Szemraj J, Karwowski B. Изменения микробиоты при раках желудочно-кишечного тракта. *Appl Sci.* 2020;10:585. doi: 10.3390/app10020585. 8. Cullin N, Antunes CA, Straussman R, Stein-Thoeringer CK, Elinav E. Микробиом и рак. *Cancer Cell.* 2021;39:1317–1341. doi: 10.1016/j.ccell.2021.08.006. 9. Kaźmierczak-Siedlecka K, Daca A, Fic M, van de Wetering T, Folwarski M, Makarewicz W. Терапевтические методы модификации кишечной микробиоты в управлении колоректальным раком – трансплантация фекальной микробиоты, пребиотики, пробиотики и синбиотики. *Gut Microbes.* 2020;11(6):1518–1530. doi: 10.1080/19490976.2020.1764309. 10. Zitvogel L, Daillère R, Roberti M, Routy B, Kroemer G. Противораковые эффекты микробиома и его продуктов. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15:465–478. doi: 10.1038/nrmicro.2017.44. 11. Nobels A, van Marcke C, Jordan BF, Hul MV, Cani PD. Кишечный микробиом и рак: от туморогенеза до терапии. *Nat. Metab.* 2025;7:895–917. doi: 10.1038/s42255-025-01287-w. 12. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, Fluckiger A, Messaoudene M, Rauber C, Roberti MP и др. Кишечный микробиом влияет на эффективность иммунотерапии на основе PD-1 против эпителиальных опухолей. *Science.* 2018;359:91–97. 13. Mao J, Wang D, Long J, Yang X, Lin J, Song Y, Xie F, Xun Z, Wang Y, Wang Y и др. Кишечный микробиом связан с клиническим ответом на иммунотерапию на основе анти-PD-1 при гепатобилиарных раках. *J Immunother Cancer.* 2021;9(12):e003334. doi: 10.1136/jitc-2021-003334. 14. Zheng Y, Wang T, Tu X, Huang Y, Zhang H, Tan D, Jiang W, Cai S, Zhao P, Song R и др. Кишечный микробиом влияет на ответ на иммунотерапию анти-PD-1 у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой. *J Immunotherapy Cancer.* 2019;7(1):193. doi: 10.1186/s40425-019-0650-9. 15. Goto Y, Iwata S, Miyahara M, Miyako E. Открытие внутритуморальных онколитических бактерий как целевых агентов для противораковой терапевтической диагностики. *Adv Sci.* 2023;10:23016. 16. Iwata S, Nishiyama T, Sakari M, Doi Y, Takaya N, Ogitani Y, Nagano H, Fukuchi K, Miyako E. Туморорезидентные онколитические бактерии вызывают мощные противораковые эффекты через селективный внутритуморальный тромбоз и некроз. *Nat Biomed Eng.* 2025:1459. doi: 10.1038/s41551-025-01459-9. 17. Chintalapati SSVV, Iwata S, Miyahara M, Miyako E. Изолированный опухолью *Cutibacterium acnes* как эффективный подавляющий опухоль живой препарат. *Biomed Pharmacother.* 2024;170:116041. doi: 10.1016/j.biopha.2023.116041. 18. Rommasi F. Методы лечения рака на основе бактерий: что мы знаем и где находимся. *Oncol. Ther.* 2022;10:23–54. doi: 10.1007/s40487-021-00177-x. 19. Sarotra

35. Suzuki F, Hashimoto K, Kikuchi H, Nishikawa H, Matsumoto H, Shimada J, Kawase M, Sunaga K, Tsuda T, Satoh K и др. Индукция опухоли-специфической цитотоксичности и апоптоза при помощи доксорубина. *Anticancer Res.* 2005;25:887–893.
36. Xu L, Xu S, Wang H, Zhang J, Chen Z, Pan L, Wang J, Wei X, Xie H, Zhou L и др. Увеличение эффективности и безопасности доксорубина против гепатоцеллюлярной карциномы с помощью модульного подхода сборки: комбинация дизайна полимерного пролекарства, инкапсуляции наночастиц и целевой доставки препарата к опухолевым клеткам. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018;10(4):3229–3240. doi: 10.1021/acsami.7b14496.
37. Chen J, Bai Y, Xue K, Li Z, Zhu Z, Yu C, Shen S, Qiao P, Luo Y, Dang E и др. CREB1-опосредованные CXCR4hi нейтрофилы способствуют воспалению кожи в моделях на мышах и у пациентов. *Nat Commun.* 2023;14:5894. doi: 10.1038/s41467-023-41484-3.
38. Aspalter RM, Eibl MM, Wolf HM. Регуляция активации Т-клеток, опосредованной TCR, при помощи TNF-RII. *J Leukoc Biol.* 2003;74(4):572–582. doi: 10.1189/jlb.0303112.
39. Liu Y, Wang Y, Yang Y, Weng L, Wu Q, Zhang J, Zhao P, Fang L, Shi Y, Wang P. Новые контрольные точки фагоцитоза в иммунотерапии рака. *Sig Transduct Target Ther.* 2023;8:104. doi: 10.1038/s41392-023-01365-z.
40. Huang C-Y, Ye Z-H, Huang M-Y, Lu J-J. Регуляция экспрессии CD47 в раковых клетках. *Transl Oncol.* 2020;13:100862. doi: 10.1016/j.tranon.2020.100862.
41. Dang LH, Bettegowda C, Huso DL, Kinzler KW, Vogelstein B. Комбинированная бактериолитическая терапия для лечения экспериментальных опухолей. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(2010):15155–15160. doi: 10.1073/pnas.251543698.
42. Kawai T, Akira S. Роль рецепторов, распознающих паттерны, в врожденном иммунитете: обновление по рецепторам, подобным Toll. *Nat Immunol.* 2010;11(2010):373–384. doi: 10.1038/ni.1863.
43. Coffelt SB, Wellenstein MD, de Visser KE. Нейтрофилы в раке: больше не нейтральные. *Nat Rev Cancer.* 2026;16:431–446. doi: 10.1038/nrc.2016.52.
44. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Первичное, адаптивное и приобретенное сопротивление к иммунотерапии рака. *Cell.* 2017;168(2017):707–723. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.017.
45. Zheng JH, Nguyen VH, Jiang S, Park S, Tan W, Hong SH, Shin MG, Chung I, Bom H, Choу HE и др. Двухступенчатая усиленная иммунотерапия рака с использованием инженерного *Salmonella typhimurium*, секретирующего гетерологичный флагеллин. *Sci Transl Med.* 2017;9 eaak9537. doi: 10.1126/scitranslmed.aak9537.
46. База данных геномов типовых штаммов. Доступно по адресу: <https://gctype.wdcm.org/>.