

lek. Tatsiana Damps

**Wpływ hydrolizatów wełny i wybranych
substancji leczniczych na żywotność komórek
raka kolczystokomórkowego skóry *in vitro***

Rozprawa na stopień doktora
nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie: nauki medyczne

Promotor: dr hab. Ewa Kłodzińska prof. IS-PIB

Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Joanna Czuwara



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową

Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej

im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa, 2022

STRESZCZENIE

Rak kolczystokomórkowy skóry (SCC) charakteryzuje się powolnym wzrostem, ale późno zdiagnozowany lub niskozróżnicowany SCC może prowadzić do zniszczenia otaczających tkanek, szerzyć się wzdłuż nerwów i tworzyć przerzuty. Obecnie najskuteczniejszą metodą leczenia jest wczesne chirurgiczne usunięcie ogniska raka skóry. W przypadkach nieoperacyjnych stosuje się leczenie miejscowe lub radioterapię/chemioterapię, a także immunoterapię. Rak kolczystokomórkowy może rozwijać się na skórze pierwotnie niezmięnionej, błonach śluzowych lub na podłożu stanu przedrakowego skóry takiego jak rogowacenie słoneczne (AK). Z powodu rosnącej zachorowalności na stany przedrakowe oraz raka kolczystokomórkowego skóry ważne jest poszukiwanie nowych związków zapobiegających rozwojowi tych zmian.

Według doniesień literaturowych, szereg substancji pochodzenia naturalnego posiada właściwości przeciwnowotworowe. Substancjami pochodzenia zwierzęcego o właściwościach przeciwnowotworowych są m.in. keratyny. Keratyny najczęściej są pozyskiwane z wełny, włosów i piór. Postawiono hipotezę, że hydrolizaty otrzymane z wełny alpaki (łac. *Vicugna pacos*) mogą posiadać właściwości bioaktywne i przeciwnowotworowe. W oparciu o metodykę pozyskiwania hydrolizatów opisaną i opatentowaną przez Prof. Andrzeja W. Lipkowskiego, w niniejszej pracy otrzymano preparaty będące rozpuszczalną frakcją hydrolizatów wełny alpaki. Metodyka otrzymywania hydrolizatów wełny opierała się na wstępnej chemicznej aktywacji wełny za pomocą wodorotlenku sodu, a następnie enzymatycznego trawienia za pomocą pepsyny. Etap chemicznej aktywacji usuwał zanieczyszczenia i związki tłuszczowe z powierzchni włókien wełny. Następnie, po zastosowaniu występującego w warunkach naturalnych enzymu pepsyny, z wełny alpaki otrzymano dwie frakcje hydrolizatów: frakcję stałą (nie badaną w tej pracy) oraz badaną frakcję rozpuszczalną, która nie uległa znaczącemu zniszczeniu przez mało agresywną enzymatyczną hydrolizę.

Głównym celem niniejszej pracy było zbadanie fizykochemicznych i biologicznych właściwości hydrolizatów pozyskanych z wełny alpaki oraz ich potencjalnego działania przeciwnowotworowego wobec komórek raka kolczystokomórkowego.

W pierwszym etapie badań otrzymane hydrolizaty wełny alpaki oceniono pod kątem ich składu, a następnie przebadano ich właściwości przeciwbakteryjne. Stwierdzono, że największą

wartość procentową składu badanych hydrolizatów wełny alpaki stanowią białka i peptydy (od 66 do 85%). Procentowe udziały pierwiastków oznaczonych w próbkach otrzymanych hydrolizatów wełny alpaki wykazały największą zawartość atomów węgla (C), tlenu (O) oraz chloru (Cl). Hydrolizaty wełny alpaki charakteryzowały się właściwościami przeciwbakteryjnymi w stosunku do Gram-ujemnej bakterii *Escherichia coli* oraz Gram-dodatniej bakterii *Staphylococcus aureus*. Potwierdza to zaobserwowanie pojawiających się dodatkowych sygnałów na elektroferogramie, a także zmiana wartości potencjału zeta po inkubacji z hydrolizatami.

Główny etap pracy stanowiły badania aktywności przeciwnowotworowej otrzymanych hydrolizatów wełny alpaki oraz dwóch substancji o uznanym działaniu przeciwnowotworowym, prowadzone w warunkach *in vitro*. W badaniach wykorzystano dostępną komercyjnie linię komórkową raka kolczystokomórkowego SCC-25. Jako kontrolę wykorzystano linie prawidłowych keratynocytów ludzkich - komercyjnie dostępną linię HEKa oraz wyizolowaną z materiału klinicznego linię sHEK. Badania w modelu *in vitro* wykazały, że hydrolizaty wełny alpaki wpływają na żywotność komórek w sposób zależny od czasu i stężenia. Żywotność komórek SCC-25 i sHEK poddanych 24 godzinnej inkubacji z przedstawiającym najlepsze wyniki hydrolizatem MR4 spadała wraz ze wzrostem stężenia preparatu ($p < 0,005$ i $p < 0,05$, odpowiednio). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w żywotności komórek HEKa poddanych działaniu najwyższych stężeń MR4. Hydrolizat MR4 w największym stężeniu spowodował obniżenie żywotności komórek SCC-25 o 70% w stosunku do nietraktowanych komórek oraz o 40% i 60% odpowiednio dla izolowanych keratynocytów sHEK i HEKa. Ponadto stwierdzono, że migracja komórek rakowych linii SCC-25 była najbardziej hamowana poprzez działanie hydrolizatów wełny alpaki MR3 i MR4.

Oddziaływanie na żywotność komórek oceniano również dla komercyjnie dostępnych preparatów leczniczych: 5-fluorouracylu, będącego substancją kontrolną, i diklofenaku. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że hydrolizaty powodują zależny od stężenia większy spadek żywotności komórek w porównaniu z 5-fluorouracylem czy diklofenakiem. Zaobserwowano, że w trakcie 24 godzinnej inkubacji wszystkie badane linie komórkowe wykazywały zbliżoną niską wrażliwość na działanie 5-FU, a istotny statystycznie spadek żywotności odnotowano jedynie dla komórek sHEK ($p < 0,005$).

W dalszym etapie pracy przeprowadzono ocenę skojarzonego wpływu 5-fluorouracylu i hydrolizatów wełny alpaki MR3 lub MR4, a także 5-fluorouracylu i diklofenaku na żywotność komórek raka kolczystokomórkowego SCC-25. Zaobserwowano, że tylko kombinacja

najwyższego użytego stężenia 5-FU z najniższym stężeniem hydrolizatu MR3 powodowała większy spadek żywotności komórek niż zastosowanie samego 5-FU. Efekt ten był obserwowany wyłącznie po 72 godz. inkubacji. W pozostałych kombinacjach interakcja 5-fluorouracylu z hydrolizatami wełny alpaki nie wykazała wzmożenia efektu antyproliferacyjnego w stosunku do komórek raka kolczystokomórkowego. Każde z zastosowanych stężeń diklofenaku w połączeniu z 5-FU skutkowało niższymi wynikami absorbancji w porównaniu do izolowanego zastosowania 5-fluorouracylu.

Podsumowując, badane hydrolizaty wykazują właściwości antybakteryjne oraz dobrą aktywność przeciwnowotworową, która jest zależna od stężenia oraz czasu ekspozycji. Hydrolizaty oddziaływały również na prawidłowe keratynocyty, ale obniżały ich żywotność w mniejszym stopniu niż komórek rakowych. Przedstawione wyniki mogą stanowić podstawę do dalszych badań nad zmodyfikowaniem metody otrzymywania związków białkowo-peptydowych wywodzących się z rozpuszczalnej frakcji hydrolizowanej wełny i kontynuacji badań nad ich przeciwnowotworowymi właściwościami.