

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

Podziękowania

Pragnę podziękować Pani dr hab. Ewie Kłodzińskiej za opiekę promotorską, cenne wskazówki, a także za okazaną wyrozumiałość w trakcie powstawania niniejszej rozprawy doktorskiej

Słowa podziękowania i uznania kieruję w stronę Pani dr hab. n. med. Joanny Czuwary. Szczególnie dziękuję za poświęcony czas i nieocenione wsparcie nie tylko w trakcie powstawania niniejszej rozprawy, lecz również w życiu zawodowym

Pani prof. dr hab. n. med. Lidii Rudnickiej za możliwość rozpoczęcia studiów doktoranckich oraz motywację do nieustannego rozwoju naukowego

Jestem wdzięczna śp. prof. Andrzejowi W. Lipkowskiemu, który powierzył i umożliwił mi realizację tego wyjątkowego zagadnienia

Serdeczne podziękowania dla dr n. med. Anny Laskowskiej i dr n. med. Marka Konopa za przyjaźń narodzoną w ścianach laboratorium oraz za ogromne wsparcie w trudnych dla mnie momentach

Podziękowania kieruję także w stronę Pani prof. dr hab. n. chem. Aleksandry Misickiej-Kęsik oraz Koleżanek i Kolegów z Zakładu Neuropeptydów IMDiK PAN

Mojej Rodzinie za cierpliwość i wiarę we mnie

Niniejsza praca została wykonana w Zakładzie Neuropeptydów Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk.

Badania były współfinansowane ze środków projektu MMRC-KNOW 2013-2017 “The search for new biomarkers of civilization diseases using high-throughput techniques and modern diagnostic imaging”.

Badania biologiczne przeprowadzono w Środowiskowym Laboratorium Badań Toksykologicznych (LBT) Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk.

Hydroliza wełny została wykonana w Środowiskowym Laboratorium Syntez Chemicznych (LSC), utworzonym w ramach projektu współfinansowanego przez UE z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, 2007–2013.

Badania obrazowe przeprowadzono w Środowiskowym Laboratorium Laserowych Technik Mikroskopowych Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk.

Wyniki niniejszej pracy zostały częściowo opublikowane:

Tatsiana Damps, Anna Katarzyna Laskowska, Tomasz Kowalkowski, Monika Prokopowicz, Anna Katarzyna Puszko, Piotr Sosnowski, Joanna Czuwara, Marek Konop, Krzysztof Różycki, Joanna Karolina Borkowska, Aleksandra Misicka, Lidia Rudnicka. *The effect of wool hydrolysates on squamous cell carcinoma cells in vitro. Possible implications for cancer treatment.* PLoS One. 2017 Aug 31;12(8):e0184034.

Tatsiana Damps, Joanna Czuwara, Olga Warszawik-Hendzel, Aleksandra Misicka, Lidia Rudnicka. *The role of drugs and selected dietary factors in cutaneous squamous cell carcinogenesis.* Adv Dermatol Allergol 2021; XXXVIII (2): 198–204 DOI: <https://doi.org/10.5114/ada.2021.106196>

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.

ABSTRACT

Cutaneous squamous cell carcinoma (SCC) is characterized by slow growth, but in cases of late diagnosis or poor differentiation, SCC can destruct the surrounding tissue, form perineural invasion or metastasize. Currently, the most effective treatment is surgical excision *in total*. If surgical treatment is not possible, topical treatment or radio/chemotherapy, as well as immunotherapy, are used. Cutaneous squamous cell carcinoma can develop within initially unchanged skin but also from precancerous lesion such as actinic keratosis (AK). Because of the increasing incidence of precancerous lesions and squamous cell carcinoma of the skin, it is important to search for new agents preventing the development of these disorders.

According to the literature, there are a lot of substances of natural origin which possess anticancer properties. Substances of animal origin with anticancer properties include keratins. Keratins are most often extracted from wool, hair and feathers. It has been hypothesized that hydrolysates obtained from alpaca wool (lat. *Vicugna pacos*) may possess bioactive and anticancer properties. Based on the methodology of obtaining hydrolysates described and patented by Prof. Andrzej W. Lipkowski, samples, which are soluble fractions of alpaca wool hydrolysates, were obtained and used in this study. The method of obtaining wool hydrolysates was based on initial chemical pre-activation of alpaca wool with sodium hydroxide followed by enzymatic digestion with pepsin. The chemical activation was used to remove impurities and fatty compounds from the wool fiber surface. Then, after applying the naturally occurring enzyme pepsin, two fractions of hydrolysates were obtained from alpaca wool: a solid fraction (not used in this research) and the soluble fraction, which was not significantly affected by the low-aggressive enzymatic hydrolysis.

The main aim of this research was to determine physicochemical and biological properties of hydrolysates obtained from alpaca wool and their potential anticancer activity against squamous cell carcinoma cells.

In the first stage of the study, the obtained alpaca wool hydrolysates were evaluated for their composition and then their anticancer properties were tested. It was found that the highest percentage of the composition of the tested alpaca wool hydrolysates were proteins and peptides (from 66 to 85%). The percentages of the elements determined in the samples of the alpaca wool hydrolysates indicated the highest content of carbon (C), oxygen (O) and chlorine (Cl) atoms. The alpaca wool hydrolysates were characterized by antimicrobial properties against Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*.

This has been confirmed by the observation of additional signals on the electropherogram, as well as by the changes in zeta potential values after incubation with hydrolysates.

The main stage of this research was determining the anticancer activity of the obtained alpaca wool hydrolysates and two substances of proved antitumor activity, tested *in vitro*. Commercially available squamous cell carcinoma cell line SCC-25 was used in the study. Normal human keratinocytes lines - commercially available HEK293 line and sHEK line isolated from clinical material were used as a control. *In vitro* model studies showed that alpaca wool hydrolysates affected cell viability in a time- and concentration-dependent manner. After 24 hours of incubation with presenting the best results MR4 hydrolysate the viability of SCC-25 and sHEK cells was reduced as the concentration of the hydrolysate increased ($p < 0.005$ and $p < 0.05$, respectively). No statistically significant changes were observed in the viability of HEK293 cells treated with the highest concentrations of MR4. MR4 hydrolysate at the greatest concentration reduced the viability of SCC-25 cells up to 70% compared to untreated cells and up to 40% and 60% for isolated sHEK and HEK293 keratinocytes, respectively. Moreover, it was found that the migration of SCC-25 cancer cells was mostly inhibited by the action of wool hydrolysates MR3 and MR4.

The effects on cell viability were also evaluated for commercially available therapeutic formulations: 5-fluorouracil, the control, and diclofenac. The experiments showed that the hydrolysates caused a concentration-dependent greater decrease in cell viability compared to 5-fluorouracil or diclofenac. It was observed that during 24 hours incubation all tested cell lines showed similar low sensitivity to 5-FU and statistically significant decrease in cell viability was observed only for sHEK cells ($p < 0.005$).

In later stage of the research, the combined effect of 5-fluorouracil and MR3 or MR4 alpaca wool hydrolysates as well as 5-fluorouracil with diclofenac on the viability of SCC-25 squamous cell carcinoma cells was also examined. It was observed that only the combination of the highest concentration of 5-FU used with the lowest concentration of MR3 hydrolysate caused a greater decrease in cell viability than 5-FU used alone. This effect was observed only after 72h of incubation. In the other combinations, the interaction of 5-fluorouracil with alpaca wool hydrolysates showed no enhancement of the antiproliferative effect against squamous cell carcinoma cells. Each of the concentrations of diclofenac used in combination with 5-FU resulted in lower cell absorbance results compared to the application of 5-fluorouracil alone.

In summary, the tested alpaca wool hydrolysates showed antibacterial properties and good anticancer activity in concentration and time-dependent manner. The hydrolysates also affected normal keratinocytes, but decreased viability was observed in a smaller extent than in cancer cells. The presented results may provide a background for further studies to modify the method of obtaining protein-peptide compounds derived from the soluble fraction of hydrolyzed wool and to explore research on its anticancer properties.

INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1. Otrzymanie i zastosowanie hydrolizatów wełny alpaki posiadających potencjalne działanie przeciwnowotworowe w stosunku do komórek raka kolczystokomórkowego skóry.
2. Ocena właściwości antybakteryjnych hydrolizatów wełny w doświadczeniach ze szczepami bakterii *Escherichia coli* (Gram „-”) oraz bakterii *Staphylococcus aureus* (Gram „+”).
3. Porównanie działania przeciwnowotworowego otrzymanych hydrolizatów wełny i leków stosowanych w terapii raka kolczystokomórkowego skóry.
4. Ocena interakcji hydrolizatów wełny alpaki z wybranymi lekami wobec komórek raka kolczystokomórkowego.

WYKAZ SKRÓTÓW

5-ALA - kwas 5-aminolewulinowy (ang. *5-aminolevulinic acid*)

5-FU - 5-fluorouracyl (ang. *5-fluorouracil*)

AE1/AE3 – mieszanina przeciwciał AE1 i AE3

Amp – ampicylina

AK - rogowacenie słoneczne (ang. *actinic keratosis*)

Akt - kinaza serynowo-treoninowa, zwana również kinazą białkową B

ATCC - Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych (ang. *american type culture collection*)

BCC - rak podstawnokomórkowy skóry (ang. *basal cell carcinoma*)

BSA – albumina surowicy bydlęcej (ang. *bovine serum albumin*)

CE - elektroforeza kapilarna (ang. *capillary electrophoresis*)

CK 5/6 – cytokeratyna 5/6

DAD – detektor z matrycą diodową (ang. *diod area detector*)

DMEM - pożywka hodowlana wg Dulbecco (ang. *Dulbecco's modified eagle medium*)

DSMZ – Niemiecka Kolekcja Mikroorganizmów i Hodowli Komórkowych (niem. *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*)

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)

EDTA - kwas wersenowy, kwas etylenodiaminotetraoctowy

EDX - spektroskopia rentgenowska z dyspersją energii (ang. *energy dispersive x-ray spectroscopy*)

EGCG - galusan epigallokatechiny (ang. *epigallocatechin gallate*)

EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*)

FBS - cieleńca surowica płodowa (ang. *fetal bovine serum*)

HEK – linia keratynocytów ludzkich (ang. *human epidermal keratinocytes*)

HPV - wirus brodawczaka ludzkiego (ang. *human papillomavirus*)

IgG-4 – ludzka immunoglobulina klasy G

Ki-67 – białko Ki-67, marker proliferacji komórkowej

KRT-17 – keratyna 17

mTOR – kinaza treoninowo-serynowa (ang. *mammalian target of rapamycin*)

MTS - sól tetrazolowa 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

MAL — ester metylowy kwasu 5-aminolewulinowego (ang. *methyl aminolevulinate*)

MRx - hydrolizat wełny alpaki

MRI – rezonans magnetyczny (ang. *magnetic resonance imaging*)

MRSA - gronkowiec złocisty oporny na metycylinę (ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)

MYC – czynnik transkrypcyjny

NADH - zredukowana forma dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide*)

NaOH – wodorotlenek sodu

NCCN - Krajowa Sieć ds. Nowotworów (ang. *National Comprehensive Cancer Network*)

NF- κ B - jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B

NMSC - nieczerniakowe nowotwory skóry (ang. *non-melanoma skin cancers*)

p16 – białko p16

p53 - białko p53

p63 - białko p63

PBS - bufor fosforanowy (ang. *phosphate-buffered saline*)

PD-1 - receptor programowanej śmierci-1 (ang. *programmed death receptor 1*)

PDT – terapia fotodynamiczna (ang. *photodynamic therapy*)

PFA – paraformaldehyd (ang. *paraformaldehyde*)

PVDF - polifluorek winylidenu (ang. *polyvinylidene fluoride*)

RAS - białko należące do rodziny małych białek o aktywności GTPaz

RNA - kwas rybonukleinowy (ang. *ribonucleic acid*)

RT – radioterapia

SD – odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*)

SEM - skaningowy mikroskop elektronowy (ang. *scanning electron microscope*)

SFK - kinaza z rodziny Src

SCC - rak kolczystokomórkowy skóry (ang. *squamous cell carcinoma*)

SCC-25 – linia komórkowa raka kolczystokomórkowego

SDS – dodecylosiarczan sodu (ang. *sodium dodecyl sulfate*)

TBS - sól fizjologiczna buforowana TRISem (trisaminometanem) (ang. *TRIS-buffered saline*)

TK - tomografia komputerowa

TLR-7 - receptor Toll-podobny (ang. *toll-like receptor*)

TNF- α - czynnik martwicy nowotworu α (ang. *tumor necrosis factor*)

TP53 - gen supresorowy p53

UV – promieniowanie ultrafioletowe (ang. *ultraviolet radiation*)

UVA - promieniowanie ultrafioletowe typu A (ang. *ultraviolet radiation type A*)

UVB - promieniowanie ultrafioletowe typu B (ang. *ultraviolet radiation type B*)

XRD - technika dysfrakcji rentgenowskiej (ang. *X-ray diffraction analysis*)

Spis treści

STRESZCZENIE	6
ABSTRACT	9
INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	12
WYKAZ SKRÓTÓW	13
1. WSTĘP.....	19
2. Przegląd piśmiennictwa.....	21
2.1. Etiopatogeneza skórnych zmian nowotworowych: od rogowacenia słonecznego do raka kolczystokomórkowego skóry.....	21
2.2. Epidemiologia i czynniki ryzyka raka kolczystokomórkowego skóry	25
2.3. Diagnostyka raka kolczystokomórkowego skóry	28
2.4. Współczesne metody leczenia raka kolczystokomórkowego skóry	31
2.4.1. Metody leczenia raka kolczystokomórkowego wysokiego ryzyka.....	32
2.4.2. Metody leczenia raka kolczystokomórkowego niskiego ryzyka.....	34
2.4.2.1. Leczenie chirurgiczne	34
2.4.2.2 Farmakologiczne metody leczenia	35
2.4.2.3. Inne metody leczenia raka kolczystokomórkowego skóry niskiego ryzyka	36
2.5. Substancje naturalne o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym	37
2.5.1. Różne źródła pozyskiwania substancji o działaniu przeciwnowotworowym	37
2.5.2. Keratyny	39
3. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	43
4. MATERIAŁY I METODY	44
4.1. Otrzymywanie hydrolizatów z wełny alpaki.....	44
4.2. Badanie zawartości białek i peptydów w hydrolizatach z wełny alpaki	45
4.3. Badanie składu pierwiastkowego hydrolizatów z wełny alpaki.....	45
4.4. Oznaczenie właściwości przeciwbakteryjnych hydrolizatów z wełny alpaki.....	46
4.4.1. Metoda dyfuzji w studni agarowej	46
4.4.2. Elektroforeza kapilarna	46
4.4.3. Wyznaczenie potencjału zeta	47
4.5. Związki chemiczne o uznanym działaniu przeciwnowotworowym.....	47
4.6. Linie komórkowe	47
4.7. Izolacja keratynocytów z materiału klinicznego	48
4.8. Charakterystyka fenotypowa wyizolowanych komórek	48

4.9. Badanie wpływu hydrolizatów na żywotność komórek.....	49
4.10. Badanie wpływu hydrolizatów na migrację komórek.....	50
4.11. Badanie wzajemnego oddziaływania 5-fluorouracylu i hydrolizatów wełny oraz 5-fluorouracylu i diklofenaku na żywotność komórek.....	50
4.12. Analiza statystyczna.....	51
5. WYNIKI.....	53
5.1. Charakterystyka fizykochemicznych właściwości hydrolizatów wełny alpaki	53
5.1.1. Zawartość białek i peptydów w hydrolizatach.....	53
5.1.2. Skład pierwiastkowy hydrolizatów wełny alpaki.....	53
5.2. Właściwości przeciwbakteryjne hydrolizatów wełny alpaki	56
5.2.1. Metoda dyfuzji w studni agarowej	56
5.2.2. Elektroforeza kapilarna i pomiary potencjału zeta.....	58
5.3. Charakterystyka keratynocytów wyizolowanych z materiału klinicznego	62
5.3.1. Charakterystyka fenotypowa wyizolowanych keratynocytów.....	62
5.3.2. Ekspresja Ki-67	62
5.4. Właściwości badanych hydrolizatów i związków chemicznych o działaniu przeciwnowotworowym	63
5.4.1. Wpływ 5-fluorouracylu na żywotność komórek	63
5.4.2. Wpływ diklofenaku na żywotność komórek	64
5.4.3. Wpływ hydrolizatu MR1 na żywotność komórek.....	65
5.4.4. Wpływ hydrolizatu MR2 na żywotność komórek.....	66
5.4.5. Wpływ hydrolizatu MR3 na żywotność komórek.....	67
5.4.6. Wpływ hydrolizatu MR4 na żywotność komórek.....	68
5.5. Wpływ hydrolizatów na migrację komórek	69
5.6. Wpływ interakcji hydrolizatów z 5-fluorouracylem oraz diklofenaku z 5-fluorouracylem na komórki nowotworowe.....	71
5.7. Podsumowanie otrzymanych wyników.....	74
6. DYSKUSJA	76
6.1. Właściwości fizykochemiczne hydrolizatów wełny	76
6.2. Działanie przeciwbakteryjne hydrolizatów wełny	78
6.3. Wpływ hydrolizatów z wełny alpaki na komórki	81
6.3.1. Wpływ hydrolizatów na żywotność komórek raka koleczystokomórkowego oraz na prawidłowe keratynocyty	81
6.3.2. Wpływ hydrolizatów na migrację komórek raka koleczystokomórkowego.....	83

6.4. Wpływ interakcji 5-fluorouracylu z hydrolizatami wełny alpaki oraz 5-fluorouracylu z diklofenakiem na komórki raka kolczystokomórkowego	84
7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	87
8. LITERATURA.....	89

1. WSTĘP

Do nowotworów złośliwych skóry należą czerniak oraz nieczerniakowe nowotwory skóry (NMSC), do których zalicza się rak podstawnokomórkowy (BCC), rak kolczystokomórkowy skóry (SCC) oraz inne rzadsze postaci raków skóry. Czerniak wywodzi się z komórek barwnikowych skóry (melanocytów). BCC i SCC są nowotworami pochodzenia nabłonkowego (wywodzą się z keratynocytów), dlatego też określa się je terminem "raki skóry". NMSC stanowią około 1/3 wszystkich rejestrowanych raków występujących u ludzi [1]. Z uwagi na zmianę stylu życia oraz wpływ nadmiernego promieniowania słonecznego, tendencje do starzenia się populacji oraz narażenie na inne czynniki rakotwórcze, zachorowalność na nowotwory skóry stale wzrasta.

Rak kolczystokomórkowy skóry wywodzi się z komórek rogowaciejących warstwy kolczystej naskórka. Charakteryzuje się powolnym wzrostem, zdolnością do tworzenia przerzutów, a późno zdiagnozowany może prowadzić do zniszczenia otaczających tkanek. SCC daje przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych oraz narządów odległych, co świadczy o jego wysokiej złośliwości oraz śmiertelności [2]. Obecnie najskuteczniejszą metodą leczenia jest wczesne chirurgiczne usunięcie ogniska raka skóry. W przypadkach nieoperacyjnych stosuje się leczenie miejscowe lub radioterapię/chemioterapię, a także leczenie biologiczne [3,4]. Rak kolczystokomórkowy może rozwijać się w obrębie skóry pierwotnie niez zmienionej, a także na podłożu stanów przedrakowych. Najczęstszym takim stanem przedrakowym jest rogowacenie słoneczne (AK), które w 0,25%-20% przypadków może prowadzić do rozwoju SCC [5]. Z powodu rosnącej zachorowalności na stany przedrakowe oraz raka kolczystokomórkowego skóry ważne jest poszukiwanie nowych preparatów zapobiegających rozwojowi tych zmian.

Według doniesień literaturowych, szereg substancji pochodzenia naturalnego, zarówno roślinnego jak i zwierzęcego, posiada właściwości przeciwnowotworowe [6-9]. W stosunku do raka kolczystokomórkowego skóry właściwości przeciwnowotworowe wykazały substancje wyizolowane z różnych gatunków roślin, takie jak kapsaicyna, kofeina, kurkumina, galusan epigallokatechiny i inne flawonoidy oraz polifenole [10-13]. Substancjami pochodzenia zwierzęcego o właściwościach przeciwnowotworowych są m.in. keratyny, będące zarówno komponentami cytoszkieletu keratynocytów, jak i pozakomórkowymi włóknami strukturalnymi. Keratyny najczęściej są pozyskiwane z wełny, włosów, piór itd. [14]. W niniejszych publikacjach opisano właściwości apoptotyczne i antyoksydacyjne hydrolizatów białkowych otrzymanych z piór kurczaka [15,16]. Keratyny są związane z patofizjologicznymi procesami różnego typu nowotworów, między innymi raka okrężnicy, płuc oraz piersi, a także są stosowane jako biomarkery w diagnostyce czerniaka (np. nadmierna ekspresja keratyny 8 w zaawansowanym czerniaku) [17]. Markowicz i wsp. przedstawili przeciwnowotworowe właściwości peptydów,

będących fragmentem białek otrzymanych z hydrolizatów włosów człowieka, w stosunku do komórek czerniaka [18].

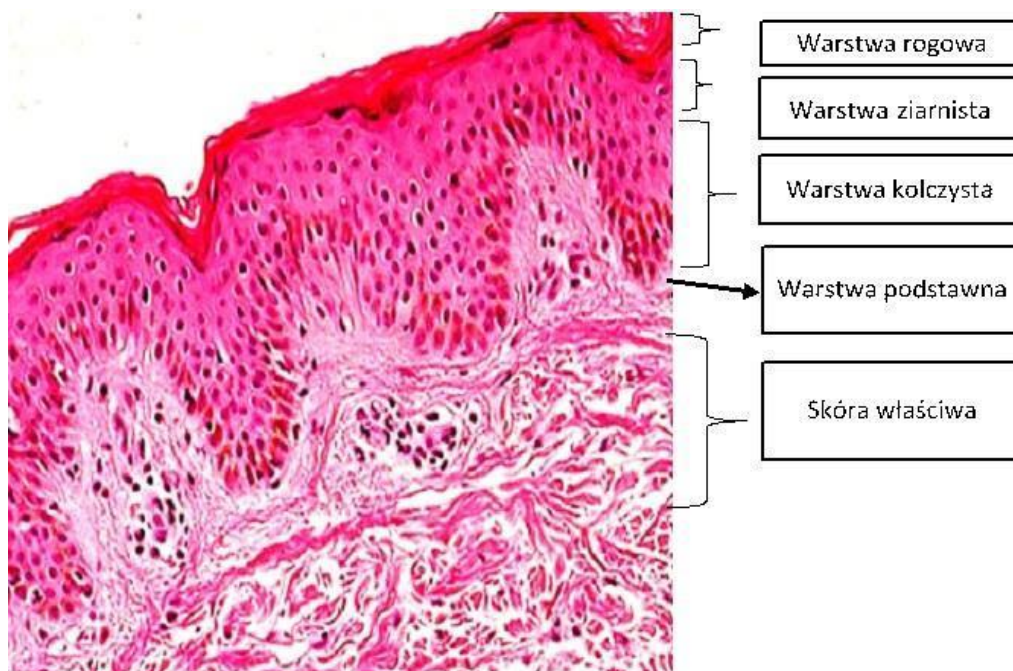
Na podstawie powyższych informacji postawiono hipotezę, że hydrolizaty otrzymane z wełny alpaki (łac. *Vicugna pacos*) mogą posiadać właściwości bioaktywne i przeciwnowotworowe. W oparciu o metodykę pozyskiwania hydrolizatów opisaną przez Prof. Andrzeja W. Lipkowskiego, otrzymano preparaty będące rozpuszczalną frakcją hydrolizatów wełny alpaki [19]. Ocenie poddano wpływ otrzymanych hydrolizatów na komórki raka kolczystokomórkowego oraz na prawidłowe keratynocyty *in vitro*.

Celem niniejszej pracy było zbadanie właściwości fizykochemicznych i biologicznych hydrolizatów pozyskanych z wełny alpaki oraz ich potencjalnego działania przeciwnowotworowego w stosunku do komórek raka kolczystokomórkowego.

2. Przegląd piśmiennictwa

2.1. Etiopatogeneza skórnych zmian nowotworowych: od rogowacenia słonecznego do raka kolczystokomórkowego skóry

Rak kolczystokomórkowy skóry wywodzi się z komórek rogowaciejących warstwy kolczystej naskórka i należy do grupy nieczerniakowych nowotworów skóry (Ryc. 1) [2].



Ryc. 1. Obraz histopatologiczny przekroju górnych warstw skóry niezmiętej chorobowo. Powiększenie 200 x. (dzięki uprzejmości dr hab. n. med. Joanny Czuwary)

SCC powstaje w okolicach narażonych na nadmierne promieniowanie ultrafioletowe (UV) u osób z jasną karnacją skóry, niebieskim lub zielonym kolorem oczu [20]. Punktem wyjścia zmian o morfologii raka kolczystokomórkowego może być skóra pierwotnie niezmięta, a także skóra w bliznach poparzeniowych, bliznach spowodowanych przewlekłym stanem zapalnym skóry, oraz ze stanów przedrakowych skóry. Stanem przedrakowym, na podłożu którego najczęściej rozwija się SCC jest rogowacenie słoneczne (AK, ang. *actinic keratosis*). Chociaż AK jest najczęstszym prekursorem inwazyjnego SCC, wiele ognisk rogowacenia słonecznego pozostaje w tym samym stadium lub ulega regresji (od 15% do 63% po 1 roku) [21], podczas gdy tylko nieliczne z nich ulegają progresji do nowotworu (od 0,25% do 20% przypadków) [5,22].

W zależności od stopnia zaawansowania, rogowacenie słoneczne najczęściej prezentuje się klinicznie jako zmiana rumieniowo-złuszczająca, bardziej wyczuwalna palpacyjnie niż widoczna gołym okiem. Zmiany występują na skórze przewlekle zmienionej promieniowaniem ultrafioletowym. Warte uwagi jest określenie kliniczne „*field of cancerization*”, które charakteryzuje się obszarami fotouszkodzonej skóry, na których obok licznych ognisk

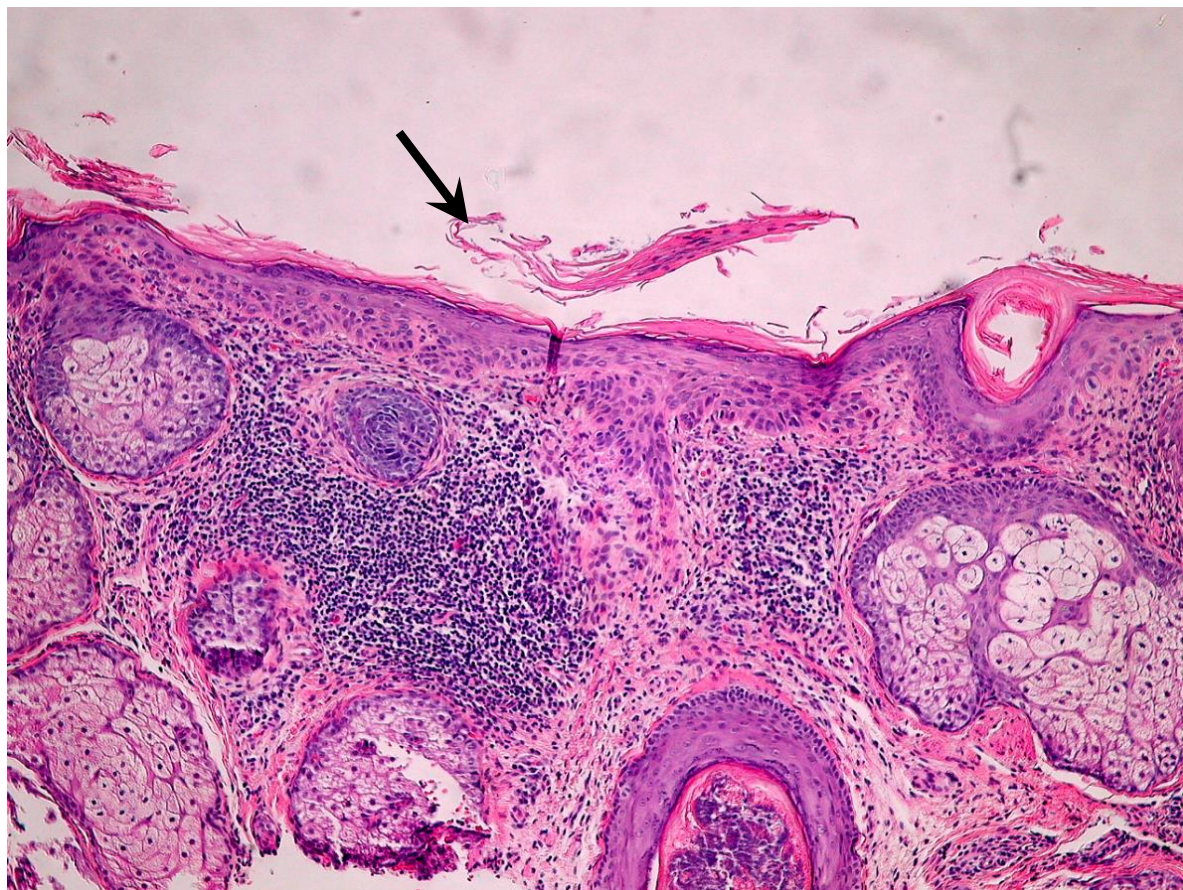
rogowacenia słonecznego obecne są niewidoczne gołym okiem subkliniczne ogniska atypii komórek warstwy ponadpodstawnej, będące późniejszym punktem wyjścia nowych ognisk chorobowych (Ryc. 2) [23].



Ryc. 2. Liczne ogniska zmian skórnych o morfologii rogowacenia słonecznego na fotouszkodzonej skórze owłosionej głowy, trzy z nich są zaznaczone pomarańczowymi strzałkami. (zdjęcia własne Tatsiany Damps)

W patogenezie rogowacenia słonecznego oraz raka kolczystokomórkowego skóry najważniejszą rolę odgrywa promieniowanie ultrafioletowe, prowadzące do niestabilności genomowej w keratynocytach. Jest to proces wieloetapowy, który łączy aktywację protoonkogenów oraz unieczynnienie genu supresorowego p53 (TP53) w komórkach naskórka, keratynocytach [24,33]. Opisano dwa szlaki, na których dochodzi do uszkodzenia DNA indukowanego promieniowaniem UV: poprzez bezpośrednie uszkodzenie DNA (tworzenie dimerów), wywołane przeważnie energią promieniowania UVB lub poprzez pośrednie działanie fotosensybilizatorów (endogennych i egzogennych), stymulowane głównie promieniowaniem UVA [25]. Inne czynniki molekularne również są zaangażowane w proces kancerogenezy SCC. W raku kolczystokomórkowym skóry pod wpływem promieniowania UV dochodzi do nieprawidłowej aktywacji receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) oraz szeregu kinaz tyrozynowych [26-30]. W odpowiedzi na uszkodzenie DNA, białko p53 gromadzi się w komórkach, aktywuje mechanizmy naprawy DNA lub indukuje apoptozę, uniemożliwiając replikację nieprawidłowych komórek [31].

Oceniając ryzyko nowotworzenia w nieprawidłowo złuszczających się ogniskach skóry uszkodzonej słońcem, należy pobrać wycinek do oceny histopatologicznej. W obrazie histopatologicznym rogowacenie słoneczne charakteryzuje się występowaniem atypowych tzw. dysplastycznych keratynocytów z różnej wielkości i kształtu jądrami tzw. pleomorficznych i hiperchromatycznych (Ryc. 3).



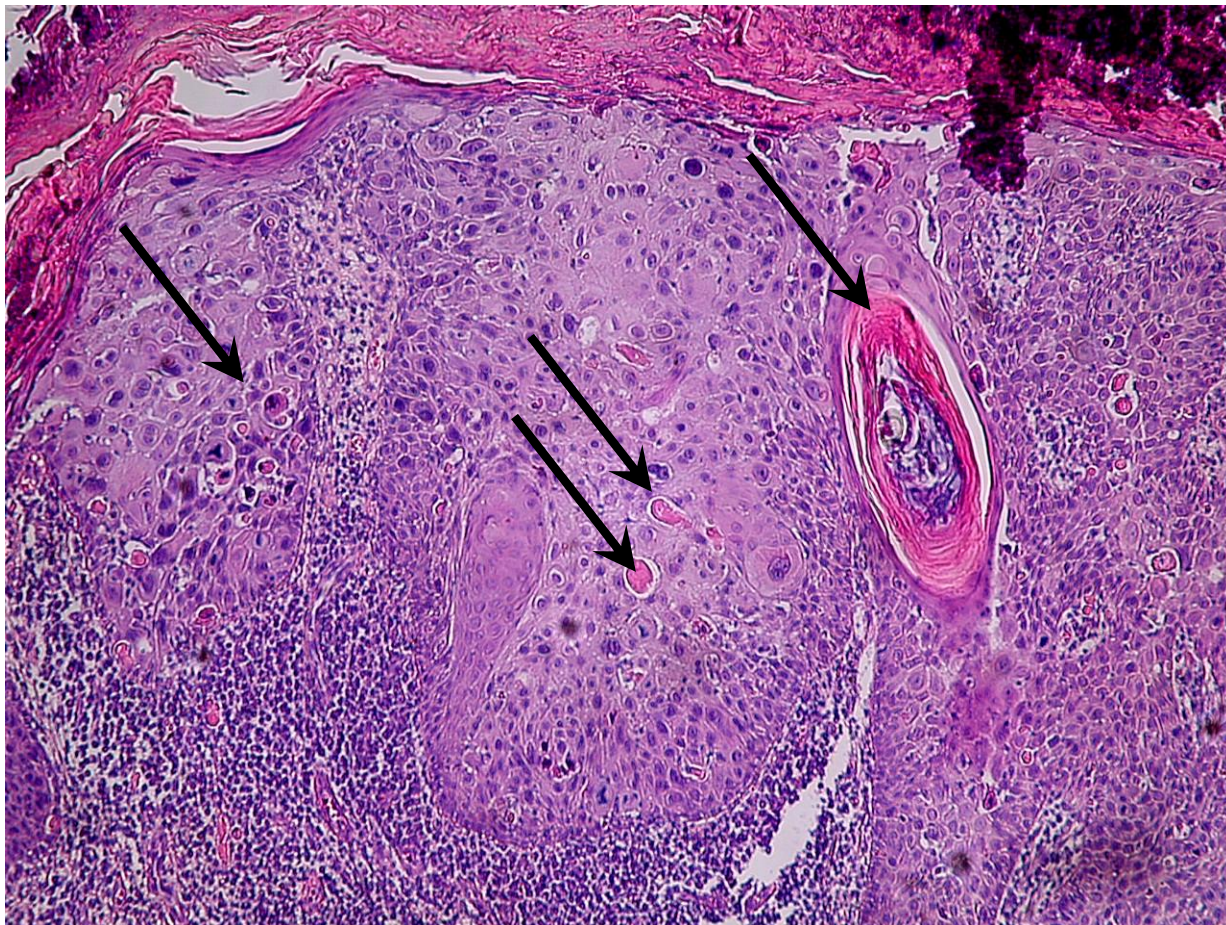
Ryc. 3. Obraz histopatologiczny naskórka zmienionego w przebiegu rogowacenia słonecznego wykazuje atypię komórek warstwy ponadpodstawnej. Komórki te nieprawidłowo dojrzewają i rogowacieją wykazując parakeratozę na powierzchni zaznaczonej czarną strzałką. Powiększenie 100x. (zdjęcie dzięki uprzejmości dr hab. n. med. Joanny Czuwary)

Najbardziej uznawana klasyfikacja histologiczna dzieli AK na trzy podgrupy w zależności od rozmieszczenia atypowych keratynocytów w naskórku: od dolnej jednej trzeciej (AK I), przez dolne dwie trzecie (AK II) oraz do pełnej atypii na pełnej grubości naskórka (AK III) (Ryc. 4) [32]. Nagromadzenie atypowych keratynocytów na całej grubości naskórka bez przekroczenia błony podstawnej nazwane jest rakiem kolczystokomórkowym *in situ* [24].

Rozległość i liczba ognisk rogowacenia słonecznego (AK)	Obraz histopatologiczny	Obraz kliniczny
Pojedyncze ogniska AK ≥ 1 i ≤ 5 palpacyjnie lub wizualnie widocznych ognisk na danym obszarze lub okolicy ciała	I typ AK = wczesny SCC <i>in situ</i> Obecność atypowych keratynocytów w warstwie podstawnej naskórka i w dolnej 1/3 naskórka	Stopień I — łagodne Ogniska bardziej wyczuwalne palpacyjnie niż widoczne gołym okiem
Liczne ogniska AK ≥ 6 palpacyjnie lub wizualnie widocznych ognisk na danym obszarze lub okolicy ciała	II typ AK = wczesny SCC <i>in situ</i> Obecność atypowych keratynocytów w dolnych 2/3 naskórka	Stopień II — umiarkowane Ogniska są zarówno widoczne, jak i wyczuwalne palpacyjnie
Pole kanceryzacji ≥ 6 ognisk AK na danym obszarze lub okolicy ciała i rozległe ciągnące się obszary skóry przewlekłe uszkodzonej przez słońce z objawami hiperkeratozy	III typ AK — Bowenoid AK/SCC <i>in situ</i> Obecność atypowych keratynocytów obejmujących dolne 2/3 do całej grubości naskórka	Stopień III — ciężkie Ogniska są pokryte grubą hiperkeratyczną łuską i są ewidentne
Pacjenci w trakcie immunosupresji z objawami AK Dowolna liczba i rozległość ognisk AK, immunosupresja	Inwazyjny SCC Gniazda keratynocytów wnikają do skóry właściwej Komórki nowotworowe są duże, posiadają obfitą, kwasochłoną cytoplazmę i wyraźnie powiększone jądra komórkowe Obecny jest różny stopień rogowacenia, mogą być widoczne perły rakowe Zależnie od stopnia zróżnicowania SCC różnie nasilone są pleomorfizm komórkowy, aktywność mitotyczna i cechy typowe dla nabłonka płaskiego Zależnie od odmiany histologicznej różnie wyrażony stan zapalny i odczyn ze strony podścieliska	Podejrzanie inwazyjnego SCC Przy wystąpieniu objawów: — kryteria większe: owrzodzenie, naciek, krwawienie, wielkość > 1 cm, szybkie powiększanie się zmiany, rumień — kryteria mniejsze: ból, świąd, zabarwienie, hiperkeratoza, wyczuwalność palpacyjna

Ryc.4. Klasyfikacja histologiczna rogowacenia słonecznego [1].

We wczesnej fazie naciekania rak kolczystokomórkowy charakteryzuje się wnikaniem atypowych keratynocytów w skórę właściwą językami i gniazdami nabłonka, które w zależności od stopnia zróżnicowania mają mniej lub bardziej wyrażone cechy rogowacenia (Ryc. 5). Niezróżnicowane lub niskozróżnicowane typy SCC nie wykazują cech rogowacenia, charakteryzują się agresywniejszym przebiegiem oraz trudnościami diagnostycznymi [25].



Ryc.5. Obraz histopatologiczny wycinka skóry przedstawiający zmiany charakterystyczne dla raka kolczystokomórkowego skóry, w tym perła rakowa i dyskeratoza, zaznaczone strzałkami, przy licznie obecnych atypowych keratynocytach z cechami hiperchromazji i pleomorfizmu jądrowego. W skórze właściwej nasilony odczyn zapalny. Powiększenie 100x. (zdjęcie dzięki uprzejmości dr hab. n. med. Joanny Czuwary)

2.2. Epidemiologia i czynniki ryzyka raka kolczystokomórkowego skóry

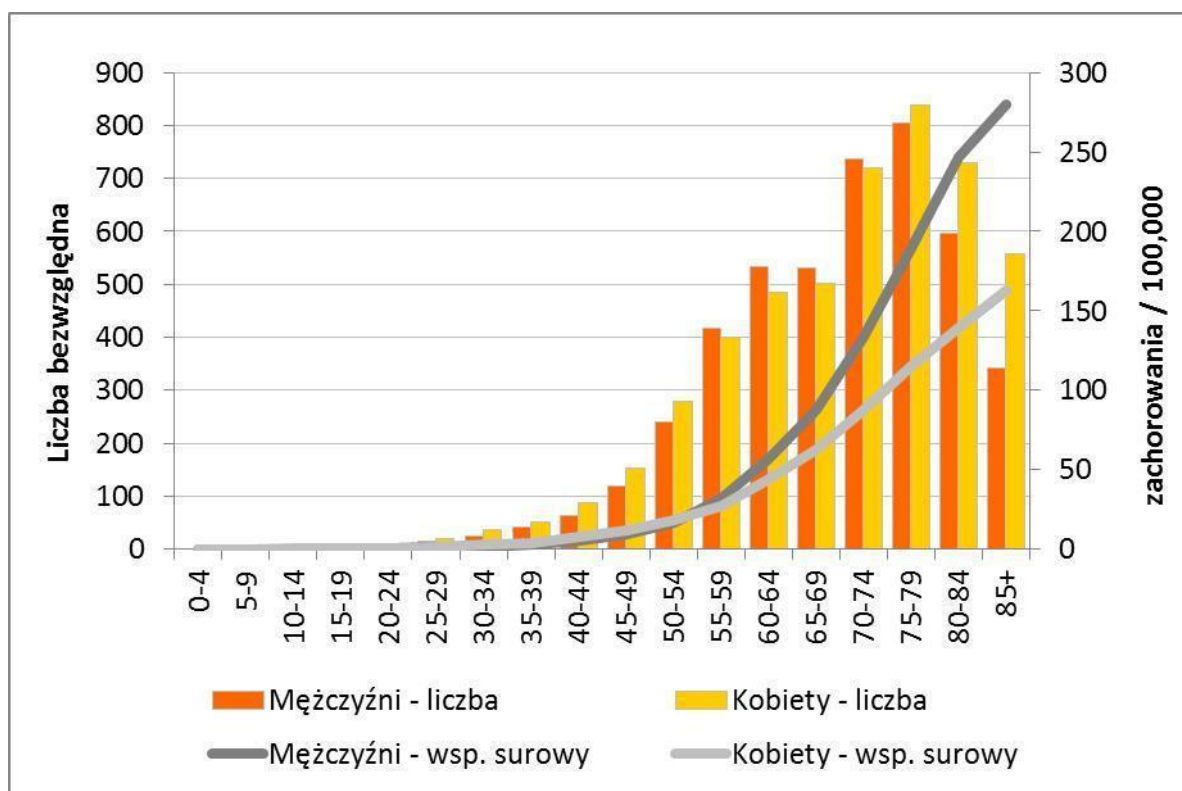
Rak kolczystokomórkowy skóry jest drugim co do częstości występowania rakiem skóry (ok. 15-20% przypadków NMSC) tuż po raku podstawnokomórkowym skóry. Raki te stanowią najliczniejszą grupą nowotworów złośliwych pochodzenia nabłonkowego występujących u osób rasy kaukaskiej.

Według danych z 2021 roku, w ostatnich latach zaobserwowano znaczący wzrost liczby zachorowań na raka kolczystokomórkowego. Zachorowalność na SCC następuje szybciej niż na BCC, co wpływa na tendencje w zmniejszeniu różnicy w częstości występowania tych dwóch raków skóry [3]. Jest to szczególnie dobrze widoczne na przykładzie danych pochodzących z Australii, gdzie zachorowalność na raka skóry jest jedną z najwyższych na świecie. Pandeya i wsp. przeanalizowali częstość zabiegów chirurgicznego usunięcia raka kolczystokomórkowego w Australii. Wynosiła 1531 na 100 000 osobolat, a zapadalność wzrastała z wiekiem, z przewagą

mężczyzn (standaryzowany współczynnik zapadalności 1,43; 95% CI: 1,42-1,45). Zapadalność na raka kolczystokomórkowego była 8-krotnie wyższa wśród osób z wcześniejszym wywiadem wycięcia zmian, niż w populacji zdrowej. Według tych badań w latach 2011-2014 odnotowano wycięcie pojedynczego ogniska SCC u 3,9% Australijczyków [34]. Muzic i wsp. przeprowadzili badanie retrospektywne i wykazali, że średnia wieku rozpoznania raka kolczystokomórkowego skóry wyniosła 70,5 lat z przewagą mężczyzn (55,1%) nad kobietami (44,9%). Ponadto w przypadku pacjentów w wieku poniżej 40 roku życia częstość występowania SCC była wyższa u młodych kobiet niż u mężczyzn [35].

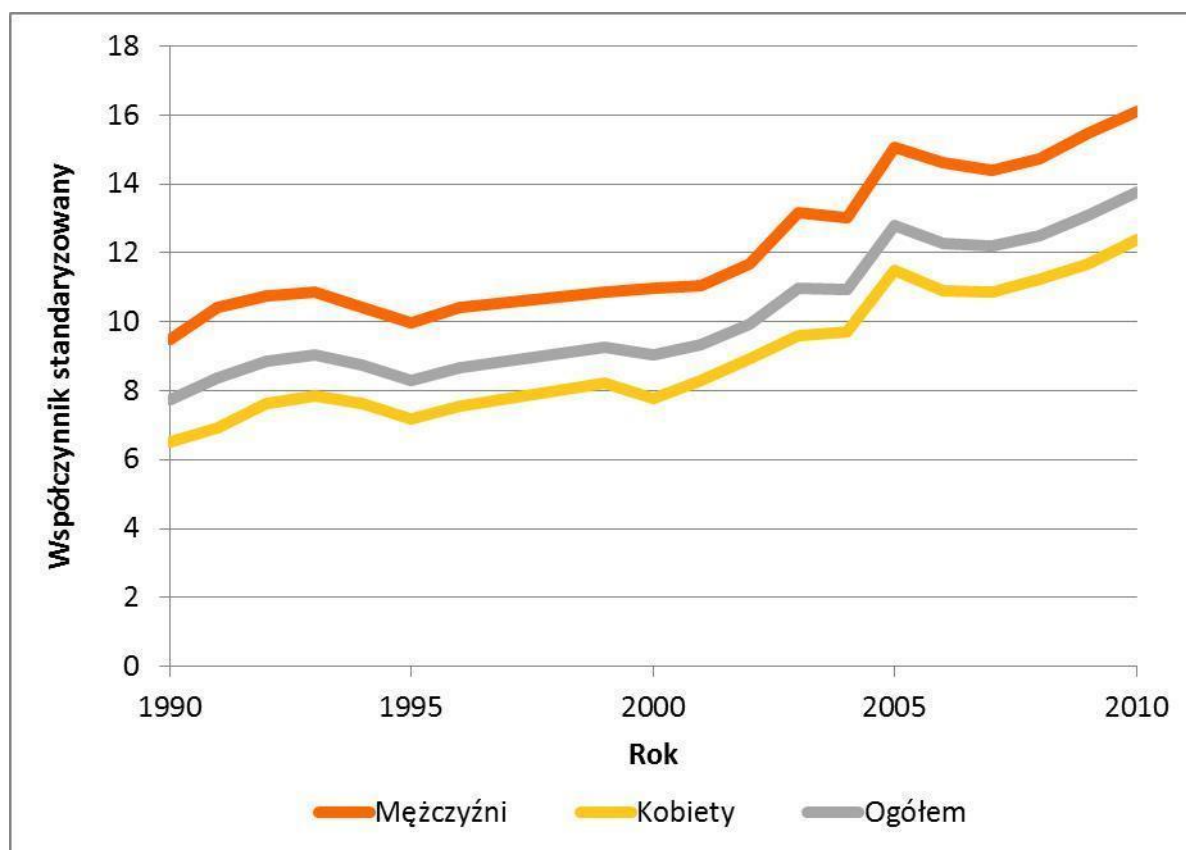
Chociaż rak podstawnkomórkowy jest częstszym rakiem skóry, to rak kolczystokomórkowy ma wyższy potencjał tworzenia przerzutów odległych. Według danych literaturowych jest to około 5% wszystkich przypadków SCC w porównaniu z BCC, który daje przerzuty jedynie w 0,003-0,1% przypadków [36].

W Polsce brak jest szczegółowych danych dotyczących zachorowalności na raka kolczystokomórkowego skóry. Wynika to z faktu, że w Krajowym Rejestrze Nowotworów, rak podstawnkomórkowy oraz kolczystokomórkowy, są zaliczane do wspólnej grupy nieczerniakowych nowotworów skóry. Z danych Krajowego Rejestru Nowotworów, wynika, że zachorowalność na raka skóry w Polsce wśród mężczyzn i kobiet w latach 1990-2010 wzrosła z 3952 do 10053 osób (Ryc. 6) [37].



Ryc. 6. Trendy zachorowalności na raka skóry w Polsce w latach 1990-2010 (dane z www.onkologia.org.pl)

Liczba przypadków raka skóry w Polsce wzrasta u osób po 20 roku życia, przy czym najwięcej zachorowań u obu płci odnotowuje się w ósmej dekadzie życia (Ryc. 7).

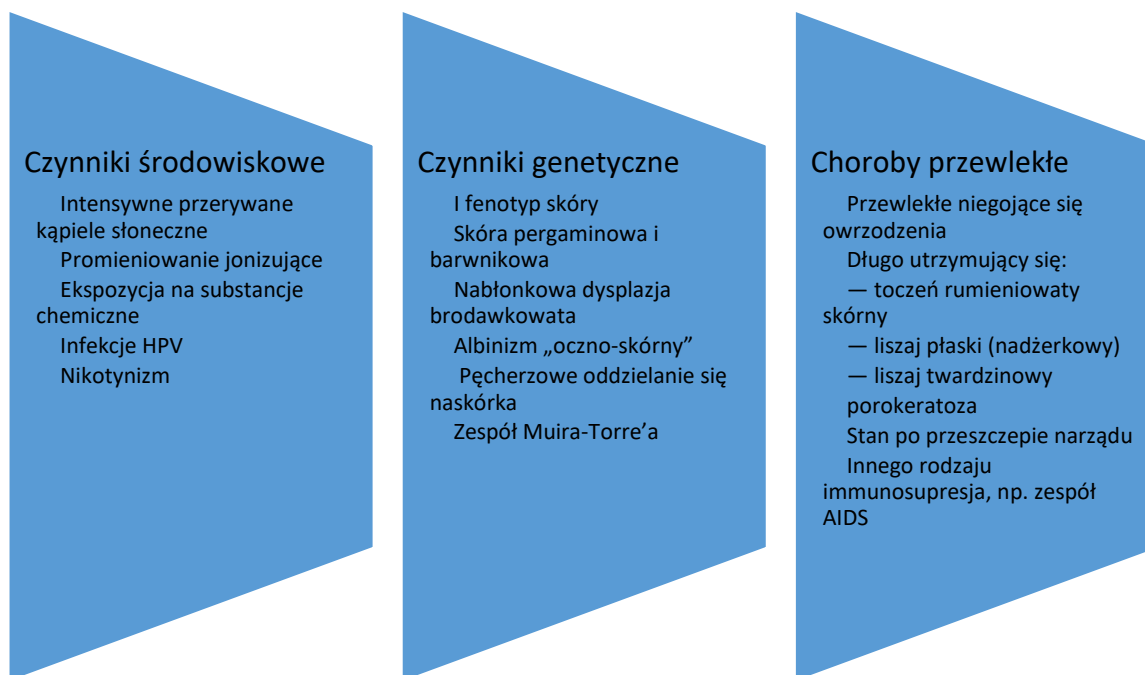


Ryc. 7. Zachorowalność na raka skóry w Polsce w latach 2008-2010 w zależności od wieku (dane z www.onkologia.org.pl)

W 2017 r. odnotowano w Polsce 13 478 nowych przypadków raków skóry (BCC i SCC łącznie) - 6543 u mężczyzn i 7025 u kobiet, które przekładają się odpowiednio na zachorowalność w odsetku procentowym 7,9% i 8,5% [38].

Głównym czynnikiem prowadzącym do rozwoju raka kolczystokomórkowego jest nadmierna dawka promieniowania ultrafioletowego. Narażenie na nadmierne promieniowanie UV ma związek m.in. z częstszą migracją osób z jasnym fototypem skóry do regionów o dużym nasłonecznieniu, korzystanie z lamp opalających emitujących promieniowanie UV (solaria), a także narażenie zawodowe na promieniowanie UV u osób pracujących na zewnątrz oraz nie korzystających z fotoprotekcji [1]. Z globalnego punktu widzenia destrukcja warstwy ozonowej, naturalnie chroniącej nas przed promieniowaniem ultrafioletowym, skutkuje tym, że więcej promieni UV dociera do powierzchni ziemi. Kolejnym czynnikiem ryzyka jest stosowanie leków immunosupresyjnych, zwłaszcza u biorców przeszczepów narządów. Według danych literaturowych w porównaniu z populacją ogólną, biorcy przeszczepu narządu litego mają od 65 do 250 razy większe ryzyko zachorowania na SCC, którego przebieg może być agresywniejszy niż u osób immunokompetentnych [39,40].

Do czynników ryzyka mogących prowadzić do rozwoju SCC zalicza się również: narażenie na substancje rakotwórcze (arsen, azbest, smoła), promieniowanie jonizujące, palenie tytoniu, przewlekłe owrzodzenia skóry, infekcje wirusem brodawczaka ludzkiego HPV [41]. Z czynników endogennych wpływających na wzrost ryzyka wystąpienia SCC należą niektóre choroby genetyczne (wrodzone pęcherzowe oddzielanie się naskórka, nabłonkowa dysplazja brodawkowata, xeroderma pigmentosum – skóra pergaminowa i barwnikowa) oraz zespoły niedoboru odporności (Ryc. 8) [1].



Ryc. 8. Czynniki zwiększające ryzyko wystąpienia raka kolczystokomórkowego skóry [1].

2.3. Diagnostyka raka kolczystokomórkowego skóry

Diagnostyka raka kolczystokomórkowego skóry opiera się na ocenie obrazu klinicznego, zastosowaniu dermatoskopii oraz, jeżeli istnieje taka możliwość, zastosowaniu refleksyjnej mikroskopii konfokalnej. Złotym standardem diagnostycznym pozostaje pobranie wycinka skóry do badania histopatologicznego.



Ryc.9. Ognisko raka kolczystokomórkowego u nasady nosa pacjentki o jasnym fototypie skóry. W wywiadzie przewlekła ekspozycja na promieniowanie UV. (zdjęcie własne Tatsiany Damps)

Rak kolczystokomórkowy skóry najczęściej występuje u osób starszych o jasnym fototypie skóry (Ryc. 9). Najczęściej zajmuje skórę nosa, małżowin usznych, czerwień wargową, skórę owłosionej głowy (przeważnie u mężczyzn z cechami łysienia) oraz skórę grzbietów rąk. SCC może również zajmować błony śluzowe i ich granice. Klinicznie, rak kolczystokomórkowy skóry prezentuje się jako zmiana rumieniowo-złuszczająca; rumieniowo-naciekowa, dobrze odgraniczona, z łuską na powierzchni, lub jako guz z nadżerką albo głębokim owrzodzeniem w części centralnej zmiany [2].

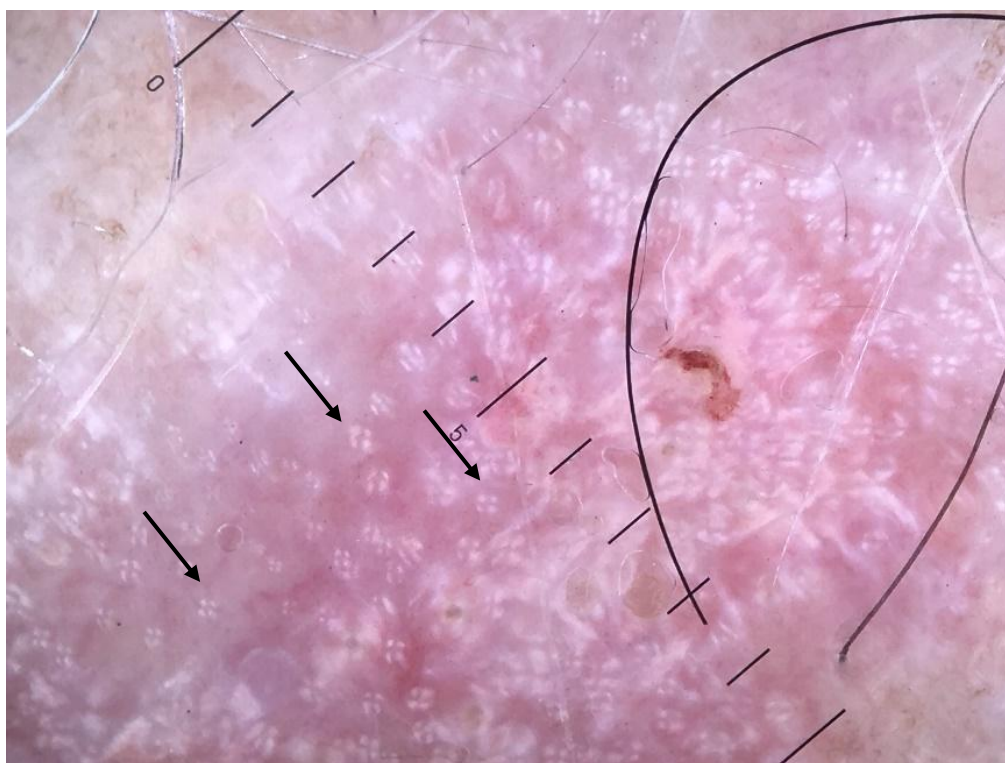
Dermoskopia jest nieinwazyjną techniką diagnostyczną, która umożliwia ocenę *in vivo* kolorów i mikrostruktur naskórka, połączeń skórno-naskórkowych i skóry właściwej przy 10-krotnym powiększeniu, co zwiększa dokładność diagnostyczną SCC w porównaniu z badaniem nieuzbrojonym okiem [42]. Chociaż cechy dermoskopowe rogowacenia słonecznego, SCC *in situ* i inwazyjnego SCC w pewnym stopniu się pokrywają, istnieją również pewne ważne wskaźniki, które mogą pomóc w rozpoznaniu i dalszym postępowaniu (Ryc. 10,11) [43].

Refleksyjna mikroskopia konfokalna jest rzadziej dostępną nieinwazyjną metodą diagnozującą raki skóry, pozwalającą na obserwację pełnej grubości naskórka oraz skóry właściwej do głębokości warstwy brodawkowatej. Daje to możliwość wykonania tzw. „wirtualnej biopsji” bez konieczności interwencji dermatochirurgicznej. W zmianach o cechach SCC, w górnych warstwach naskórka widoczna jest dezorganizacja jego prawidłowej architektury lub atypowy wzór plastra miodu [44]. Na poziomie warstwy kolczystej w 65% przypadkach stwierdza się okrągłe komórki z jądrem komórkowym odpowiadające atypowym keratynocytom lub komórkom dyskeratocytom, z kolei w górnej części skóry właściwej u 90% pacjentów

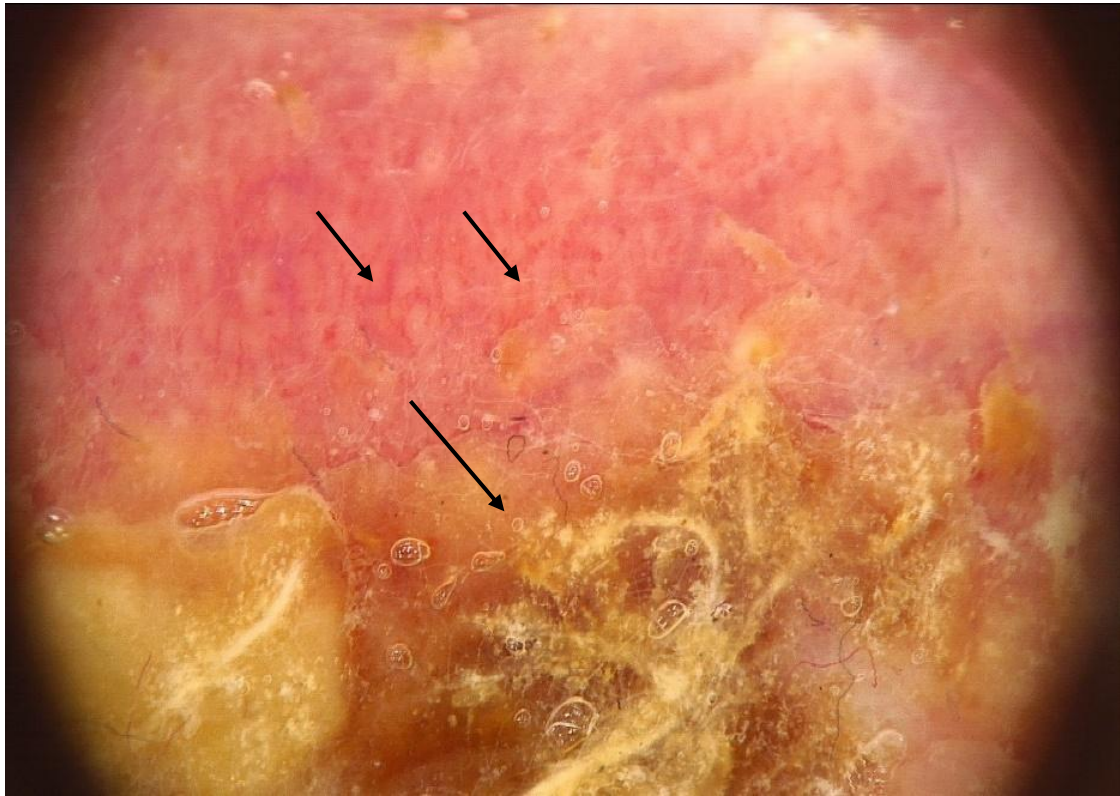
obserwuje się poprzecznie ułożone naczynia krwionośne [45]. Za pomocą refleksyjnej mikroskopii konfokalnej ocenia się również *ex vivo* margines usuniętej zmiany [46].

W przypadkach z histologicznie nietypowym obrazem zmiany skórnej, wykonuje się barwienia immunohistochemiczne na obecność keratyn CK5/6, AE1/AE3, oraz ekspresję p63, p16, p53, Ki-67 [2]. Przy podejrzeniu naciekania przez nowotwór otaczających tkanek, wskazane jest poszerzenie diagnostyki o badania obrazowe (tomografię komputerową, rezonans magnetyczny) oraz wykonanie aspiracyjnej biopsji cienkoigłowej lub pobranie całego węzła chłonnego (węzła wartowniczego) w sytuacjach podejrzenia zajęcia węzłów chłonnych [46,47].

Wczesne rozpoznanie SCC pozwala na wdrożenie leczenia chirurgicznego guza nowotworowego, co zmniejsza ryzyko przerzutów oraz redukuje śmiertelność spowodowaną nieoperacyjnym naciekaniem lub przerzutowym SCC. Do czynników wysokiego ryzyka nawrotu nowotworu w przypadku SCC należą: wielkość zmiany skórnej powyżej 2 cm i grubość powyżej 2 mm (IV–V poziom wg Clarka), nieostro odgraniczone brzegi, nawrotowy przebieg, stosowanie leczenia immunosupresyjnego, wcześniejsza radioterapia, przewlekły stan zapalny w obrębie tkanek guza, szybki jego wzrost, pojawienie się towarzyszących objawów neurologicznych, nacieki okołonerwowe oraz opisany w badaniu histopatologicznym niski stopień zróżnicowania G3 [48].



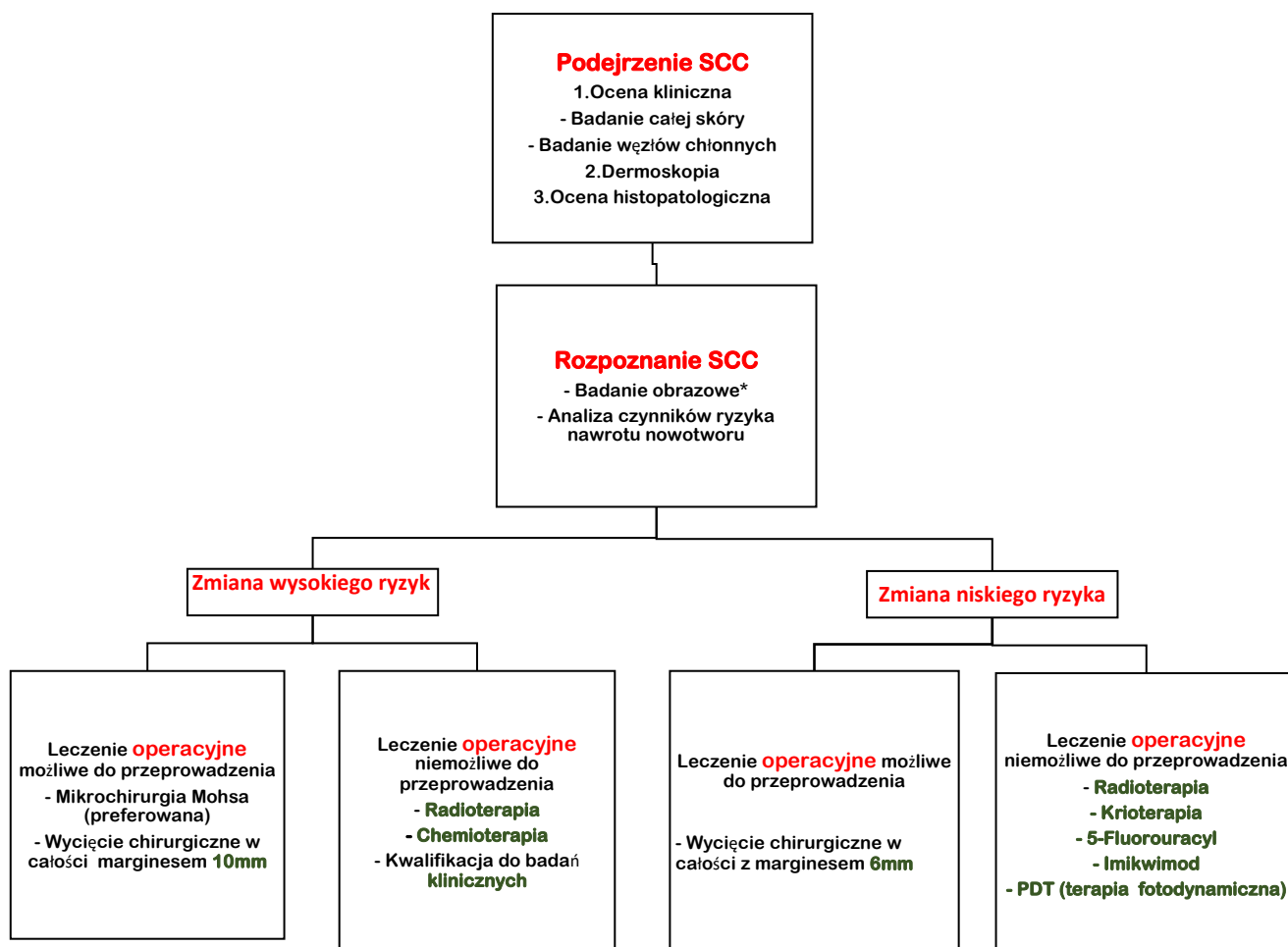
Ryc. 10. Obraz dermoskopowy ogniska skóry zmienionej przez rogowacenie słoneczne – rozetki na podłożu rumieniowym, zaznaczone czarnymi strzałkami. Powiększenie 10x. (zdjęcie własne Tatsiany Damps)



Ryc. 11. Obraz dermoskopowy ogniska raka kolczystokomórkowego skóry – hiperkeratyczny strup w części centralnej zmiany, polimorficzne naczynia krwionośne, naczynia typu szpilki (wymienione cechy zaznaczono czarnymi strzałkami). Powiększenie 10x. (zdjęcie własne Tatsiany Damps)

2.4. Współczesne metody leczenia raka kolczystokomórkowego skóry

Usunięcie chirurgiczne ogniska raka kolczystokomórkowego skóry w całości z zachowaniem dobrego efektu estetycznego jest priorytetem w postępowaniu terapeutycznym. Schemat możliwych metod leczniczych został przedstawiony na rycinie 12 [2]. Przy wyborze metody leczenia istotny jest typ histopatologiczny nowotworu, stopień jego zaawansowania oraz głębokość nacieku, średnica i lokalizacja zmiany skórnej, a także stan ogólny pacjenta i obecność chorób towarzyszących.



Ryc. 12. Schemat proponowanego postępowania terapeutycznego w przypadku raka kolczystokomórkowego skóry [2]. *W przypadku podejrzenia zmiany zaawansowanej lub nacieku na tkanki miękkie, kości, naczynia itd. (MRI lub TK).

2.4.1. Metody leczenia raka kolczystokomórkowego wysokiego ryzyka

W procesie terapeutycznym raka kolczystokomórkowego wysokiego ryzyka powinien być zaangażowany wielospecjalistyczny zespół lekarzy. Wycięcie chirurgiczne pierwotnego SCC wysokiego ryzyka jest zalecane zawsze, gdy jest to możliwe, z marginesem chirurgicznym wynoszącym 10 mm [49]. Preferowane jest przeprowadzenie śródoperacyjnej analizy doszczętności zabiegu z zastosowaniem mikrochirurgii Mohsa [50]. Metoda ta polega na warstwowym wycinaniu guza ze śródoperacyjną oceną zamrożonych skrawków pochodzących z brzegów oraz dna okolicy po wyciętym guzie (Ryc. 13). Poszczególne wycinki są oznakowywane, aby w następstwie uzyskanych wyników poszerzyć wyłącznie te marginesy operacyjne, w których stwierdzono komórki nowotworowe. Przekrojenie tkanki w kierunku poziomym umożliwia

zbadanie pod mikroskopem praktycznie 100% marginesu tkanki (marginesy obwodowe i głębokie). Proces ten powtarza się aż do uzyskania negatywnego wyniku histologicznego obecności komórek nowotworowych [51].

Radioterapia (RT) może być proponowana jako leczenie pierwszego rzutu, gdy chory nie może być zakwalifikowany do zabiegu operacyjnego. W przebiegu raka koleczystokomórkowego, u chorych z rozpoznanymi przerzutami regionalnymi lub odległymi, stosuje się substancje cytostatyczne takie jak cisplatyna, karboplatyna i 5-fluorouracyl (5-FU). Mogą być one stosowane zarówno w monoterapii, jak i w schematach łączonych. W aktualizacji National Comprehensive Cancer Network (NCNN) z 2022 roku zatwierdzono opcję stosowania karboplatyny z lub bez paklitakselu, w skojarzeniu z radioterapią [52]. Radioterapia może być również stosowana jako leczenie adiuwantowe w przypadku niekompletnego wycięcia zmiany rakowej bez możliwości reoperacji, a także w przypadku zajęcia tkanek okołonerwowych, przerzutów do węzłów chłonnych lub zmian o charakterze nawrotowym. Ponadto są badania wykazujące lepszy wynik leczenia chirurgicznego w połączeniu z radioterapią adiuwantową [53, 54].

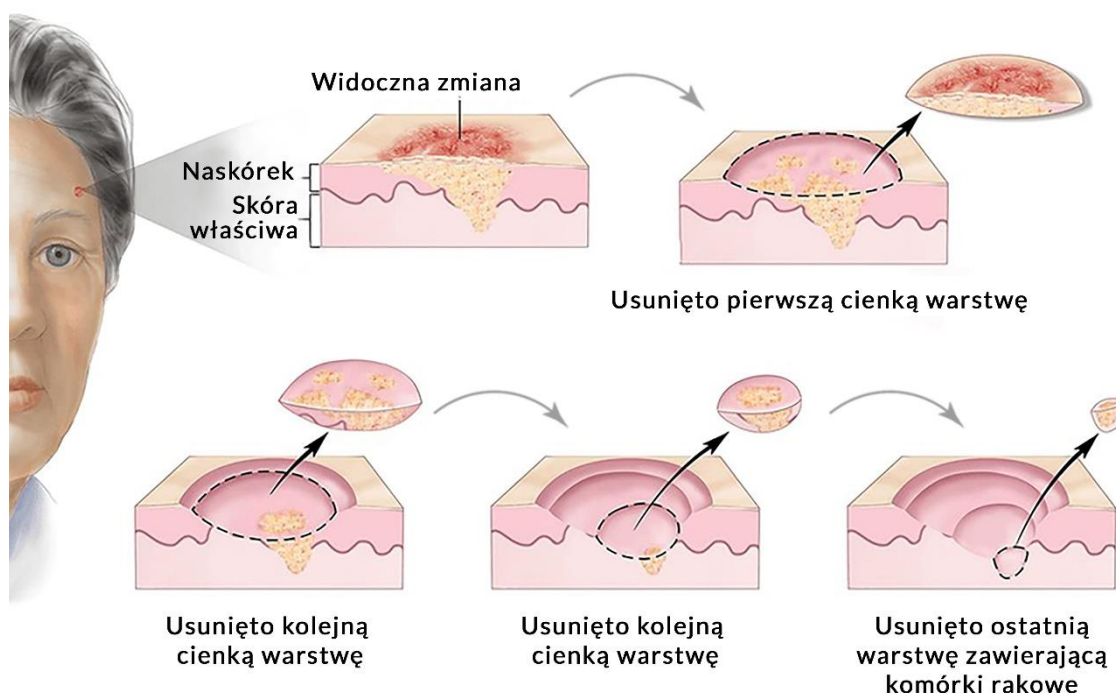
W pozostałych przypadkach, dyskwalifikujących pacjenta z wyżej wymienionych metod leczniczych, należy rozważyć wdrożenie leczenia biologicznego [55]. Najbardziej obiecujące wyniki otrzymano przy zastosowaniu inhibitorów receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR). EGFR wykazuje silną ekspresję w przerzutowych SCC, a jego nadekspresja w pierwotnych SCC jest czynnikiem niekorzystnym rokowniczo [56]. W tym przypadku, leczenie polega na stosowaniu przeciwciał monoklonalnych, takich jak cetuksymab lub panitumumab, blokujących aktywację EGFR, lub małych cząsteczek, np. gefitynibu lub erlotynibu, skierowanych na wewnątrzkomórkową domenę receptora hamujących jego wewnątrzkomórkowe przekazywanie. Leczenie cetuksymabem przyniosło obiecujące wyniki w kilku badaniach klinicznych [57-59]. Skuteczność erlotynibu i gefitynibu wydaje się być mniejsza [60,61].

Druga ścieżka zastosowania celowanej immunoterapii w leczeniu raka koleczystokomórkowego dotyczy oddziaływania na receptor programowanej śmierci-1 (PD-1), znajdujący się na powierzchni limfocytów T. W analizach pierwotnych danych fazy 2 badania klinicznego u pacjentów otrzymujących cemiplimab wykazano znaczną aktywność przeciwnowotworową i akceptowalny profil bezpieczeństwa. Cemiplimab jest ludzkim przeciwciałem monoklonalnym IgG4 o wysokim powinowactwie do receptora programowanej śmierci komórki [62].

2.4.2. Metody leczenia raka kolczystokomórkowego niskiego ryzyka

2.4.2.1. Leczenie chirurgiczne

Zawsze, gdy jest to możliwe, biorąc pod uwagę stan ogólny pacjenta, chirurgiczne wycięcie guza jest leczeniem pierwszego wyboru u pacjentów z rozpoznaniem ogniska raka kolczystokomórkowego skóry, niezależnie od wieku i lokalizacji anatomicznej [49]. Standardowe wycięcie zmiany skórnej o niskim ryzyku nawrotu polega na zachowaniu 6-milimetrowego marginesu tkanek makroskopowo niezmiennych. W większości przypadków SCC metoda ta prowadzi do całkowitego wyleczenia. Z onkologicznego punktu widzenia ubytek chirurgiczny powinien być odtworzony przy użyciu technik, które nie powodują mobilizacji otaczających tkanek, takich jak bezpośrednie zamknięcie lub przeszczep, natomiast rekonstrukcja za pomocą płatów skórnych może być zalecana dopiero po upewnieniu się, że guz został całkowicie usunięty [63].



Ryc. 13. Schemat wycięcia chirurgicznego raka skóry zgodnie z zastosowaniem metody Mohsa. W trakcie zabiegu wykonywana jest śródoperacyjna ocena histopatologiczna skrawków zmiany nowotworowej wyciętej na różnych głębokościach. (Źródło: <https://nowotworskory.pl/metoda-mohsa/>)

2.4.2.2 Farmakologiczne metody leczenia

W przypadkach powierzchownych ognisk SCC niskiego ryzyka, w tym SCC *in situ*, mogą być stosowane leki miejscowe, zawierające 5-fluorouracyl lub imikwimod, a na ogniska rogowacenia słonecznego także preparaty zawierające diklofenak [64,65].

Mechanizm działania 5-fluorouracylu, analogu pirymidyny, jest wielotorowy, ale najważniejszym punktem jest wiązanie się z syntazą tymidylanową za pośrednictwem kofaktora 5,10-metylenotetrahydrofolianu. Prowadzi to do zahamowania syntezy tymidyny, zahamowania replikacji DNA a w konsekwencji do indukcji apoptozy [66]. Co ciekawe, w nawiązaniu do poszukiwania nowych preparatów o działaniu przeciwnowotworowym, analogi 5-FU zostały znalezione w gąbce morskiej *Phakellia fusca*, pochodzącej z okolic wysp Xisha na Morzu Południowym w Chinach [67].

W przeprowadzonym na dużą skalę randomizowanym badaniu klinicznym z podwójnie ślepą próbą, kontrolowanym placebo (932 osoby), stwierdzono, że leczenie 5% 5-FU (dwa razy dziennie przez okres do 4 tygodni) prowadziło do całkowitego ustąpienia zmian o charakterze rogowacenia słonecznego u 38% pacjentów w porównaniu z 17% pacjentów w grupie kontrolnej [68]. Podczas gdy w praktyce klinicznej zazwyczaj stosuje się 5% krem 5-FU, w mniejszym badaniu (21 pacjentów) wykazano, że codzienne stosowanie 0,5% kremu 5-FU (przez 4 tygodnie) było równie skuteczne w leczeniu AK, jak stosowanie dwa razy dziennie 5% kremu 5-FU [69]. W tym badaniu 67% i 47% zmian uległo redukcji po zastosowaniu odpowiednio 0,5% i 5% kremu. Zgodnie z oczekiwaniami, preparat 0,5% był lepiej tolerowany przez pacjentów ze względu na redukcję bólu, rumienia i podrażnienia skóry.

W przypadku leczenia SCC *in situ* za pomocą kremu zawierającego 5% 5-FU, badania wstępne wykazały, że odsetek wyleczeń po 12 miesiącach od zakończenia terapii wynosił od 48% do 69% (przy codziennym stosowaniu przez 1 tydzień i stosowaniu dwa razy dziennie przez kolejne 3 tygodnie) [70,71].

Imikwimod jest agonistą receptora Toll-podobnego (TLR)-7, który działa jako miejscowy modyfikator odpowiedzi immunologicznej. Receptory TLR, znajdujące się na powierzchni komórek dendrytycznych, monocytów, makrofagów i komórek Langerhansa, sprzyjają aktywacji wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej, co prowadzi do uwolnienia cytokin i chemokin. Ponadto, imikwimod wywołuje bezpośredni efekt apoptotyczny na komórki nowotworowe [72]. Imikwimod jest stosowany w postaci kremu w stężeniach 5%, 3,75% i 2,5% na ogniska rogowacenia słonecznego zlokalizowanego na twarzy

lub skórze głowy. Do najczęściej zgłaszanych działań niepożądanych związanych ze stosowaniem imikwimodu należą świąd, pieczenie, ból w miejscu aplikacji, a nierzadko powstanie nadżerek [73]. Z uwagi na częste występowanie niepożądanych odczynów skórnych oraz konieczność powtarzania aplikacji miejscowych preparatów imikwimodu i 5-FU, taka metoda leczenia może nie być preferowana przez każdego pacjenta [74].

Diklofenak jest niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym, blokującym enzym cyklooksygenazę 2, którego głównymi funkcjami są stymulacja proliferacji komórek i angiogenezy oraz hamowanie apoptozy komórkowej [75]. W leczeniu rogowacenia słonecznego stosuje się postać 3% żelu diklofenaku w 2,5% kwasie hialuronowym, stosowanym dwa razy dziennie przez 60-90 dni. Całkowita odpowiedź na leczenie sięga 58% w 30-dniowej terapii [75]. Gupta i wsp. wykazali podobną skuteczność diklofenaku w odniesieniu do 5-FU i 5% imikwimodu w zakresie całkowitego ustąpienia zmian skórnych o morfologii AK [76]. Badanie przeprowadzone przez Nistico i wsp. także wykazało dobrą tolerancję i korzystny profil farmakoekonomiczny diklofenaku w leczeniu rogowacenia słonecznego [77].

2.4.2.3. Inne metody leczenia raka kolczystokomórkowego skóry niskiego ryzyka

Oprócz leczenia chirurgicznego i farmakologicznego, dobrze tolerowana przez pacjentów jest metoda kriochirurgii zmian skórnych o morfologii AK i SCC *in situ*. Krioterapia z zastosowaniem ciekłego azotu jest szeroko stosowaną metodą przeprowadzaną w warunkach gabinetu lekarskiego bez znieczulenia [78]. Za pomocą urządzenia rozpylającego ciekły azot o temperaturze w przedziale od -50 do -60°C , tworzą się wewnątrzkomórkowe i zewnątrzkomórkowe kryształki lodu, co uszkadza nieprawidłowe komórki poprzez kriolizę, zastój naczyniowy i apoptozę [79]. Odnotowany odsetek całkowitego ustąpienia zmian przy zastosowaniu metody kriochirurgii wynosi od 39% do 76%, a większą skuteczność odnotowano, gdy kriochirurgia była skojarzona z leczeniem miejscowym [80].

Terapia fotodynamiczna (PDT) (ang. *photodynamic therapy*) jest kolejną małoinwazyjną metodą leczenia m.in. AK i SCC *in situ*, która polega na wykorzystaniu środków fotouczulających, takich jak kwas 5-aminolewulinowy (5-ALA) i ester metylowy 5-ALA (MAL), które selektywnie gromadzą się w atypowych keratynocytach i pod wpływem promieniowania elektromagnetycznego bliższej podczerwieni o długości fali $\lambda = 610$ nm ulegają wzbudzeniu. Prowadzi to do wytworzenia reaktywnych form tlenu na drodze procesów

fotokemicznych i fizycznych, co skutkuje bezpośrednim uszkodzeniem komórek [80,81]. Zastosowanie PDT w przypadku SCC *in situ* wiąże się z wyższym odsetkiem nawrotów, a trwałe wskaźniki szacowanych całkowitych odpowiedzi ma dużą rozbieżność (48%-89%), co wynika z różnic w wykonywanych technikach PDT [47,82,83]. Analiza dostępnych danych z piśmiennictwa wskazuje, że MAL-PDT cechuje się wyższą skutecznością od 5-FU i kriochirurgii [47,82].

Pozostałe, nie wymienione w danym rozdziale metody leczenia, są mniej skuteczne lub znajdują się w fazie trwających badań klinicznych [65].

2.5. Substancje naturalne o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym

Obecnie stosowane standardowe metody leczenia nowotworów są często nieskuteczne oraz obciążone licznymi działaniami niepożądanymi. W związku z tym naukowcy z całego świata prowadzą badania nad opracowaniem bezpieczniejszych i skuteczniejszych metod terapii przeciwnowotworowej. Badania prowadzone na szeroką skalę wykazały, że bioaktywne związki pochodzenia naturalnego mogą być użyteczne w zapobieganiu i leczeniu nowotworów [84-97].

2.5.1. Różne źródła pozyskiwania substancji o działaniu przeciwnowotworowym

Z doniesień literaturowych wynika, że najwięcej substancji o działaniu przeciwnowotworowym wyizolowano z produktów pochodzenia roślinnego. Do takich substancji należą m.in. fenole, flawonoidy, alkaloidy i wiele innych. Fenole posiadają udowodnione działanie cytotoksyczne w stosunku do różnych nowotworów, a mechanizm ich działania opiera się na drodze indukcji apoptozy. Przykładowym związkiem fenolowym jest kurkumina pozyskiwana z kłącza kurkumy (łac. *Curcuma speciosa*) [86]. Badania przedkliniczne wykazały, że kurkumina hamuje proces kancerogenezy w większości nowotworów, w tym jelita grubego, trzustki, żołądka i prostaty. Ponadto kurkumina działa jako chemio-uczulacz, powodując zwiększenie aktywności innych preparatów o działaniu przeciwnowotworowym w przypadku guzów opornych na chemioterapię [87,88]. Potwierdzono, że kurkumina zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych na doksorubicynę poprzez blokadę szlaku sygnalizacyjnego NF- κ B. Szlak NF- κ B jest zaangażowany w cytotoksyczne działanie doksorubicyny i jej analogów [89]. Podobne działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek

nowotworowych wykazuje imbir lekarski (łac. *Zingiber officinale*), zawierający kompleks różnych fenoli [86].

Kolejną interesującą grupą związków bioaktywnych są flawonoidy. Yang i wsp. udowodnili, że stosowanie w diecie flawonoidów zmniejsza ryzyko zachorowania na raka okrężnicy i sutka [90]. Do rodziny flawonoidów należy m.in. genisteina, będąca fitosterolem działającym na nowotwór wywodzący się z układu krwiotwórczego. Genisteina hamuje kinazy tyrozynowe, proces angiogenezy oraz zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G2/M, prowadząc do indukcji apoptozy komórek białaczkowych [87]. Flawonoidy mogą być pozyskiwane zarówno z roślin jak i mikroorganizmów np. bakterii z typu *Actinobacteria*, czyli promieniowców. Promieniowce wytwarzają związki o działaniu przeciwbakteryjnym, a także o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym [91].

W badaniach nad linią komórek raka kolczystokomórkowego stwierdzono, że ekstrakt z gorzkiego melona (łac. *Momordica charantia*) hamuje proliferację i metabolizm komórek SCC w badaniach *in vitro*, indukując ich apoptozę oraz wzmacnia system obrony immunologicznej [92].

Do obecnie stosowanych leków w klinicznej terapii onkologicznej należą takie fitochemiczne substancje jak alkaloidy (winblastyna, winkrystyna), taksany (paklitaksel), antracykliny (doksorubicyna, idarubicyna) [93,94]. Leki te często powodują wystąpienie poważnych działań niepożądanych (ciężkie reakcje nadwrażliwości, zahamowanie czynności szpiku kostnego, leukopenię, bóle stawowe i mięśniowe, zaburzenia żołądkowo-jelitowe i inne). Ze względu na swój unikalny mechanizm działania przeciwnowotworowego, jednym z najbardziej skutecznych i szeroko stosowanych naturalnych leków przeciwnowotworowych jest paklitaksel. Jest on trójpierscieniowym związkiem diterpenoidowym naturalnie wytwarzanym w korze i igłach drzewa *Taxus brevifolia*. Paklitaksel promuje łączenie się tubuliny w mikrotubule i zapobiega rozpadowi mikrotubul, blokując w ten sposób postęp cyklu komórkowego, zapobiegając mitozie i hamując wzrost komórek nowotworowych [95].

W literaturze dostępne są również informacje o przeciwnowotworowym działaniu substancji pochodzenia zwierzęcego. Golpich i wsp. ocenili przeciwnowotworowe działanie osocza karpia zwyczajnego (łac. *Cyprinus carpio*) na komórki raka sutka [96]. Badano wpływ osocza hibernującego na żywotność, morfologię oraz migrację komórek, tempo apoptozy i rozkład cyklu komórkowego komórek raka sutka. Badanie wykazało, że osocze hibernujące znacząco zmniejszało żywotność komórek nowotworowych, jednocześnie nie wykazując

cytotoksycznego działania wobec fibroblastów podścieliska. W tych eksperymentach pod wpływem osocza przedstawiono indukcję apoptozy i zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M oraz zahamowanie migracji komórek nowotworowych.

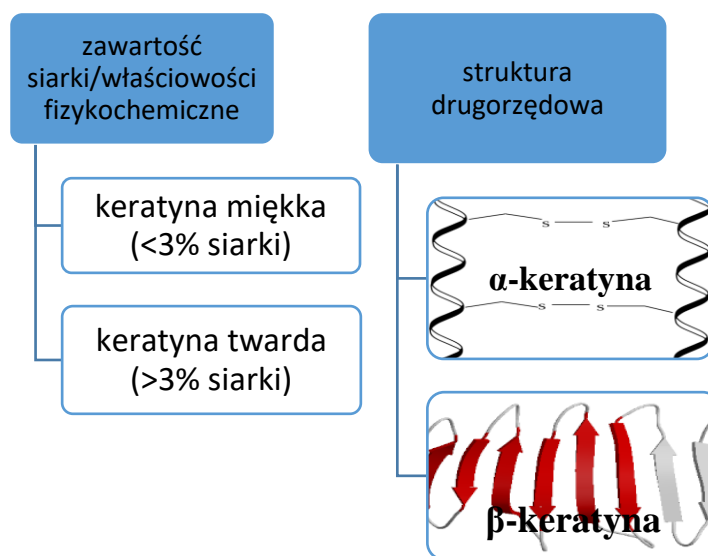
Jeyamogan i wsp. opublikowali interesujące wyniki dotyczące wpływu surowicy pozyskanej od warana paskowanego (łac. *Varanus salvator*), pytona siatkowego (łac. *Malayopython reticulatus*) i żółwia sundajskiego (łac. *Cuora kamaroma amboinensis*) na komórki nowotworowe raka prostaty, raka szyjki macicy, raka piersi i prawidłowe keratynocyty. Wykorzystując chromatografię cieczową w połączeniu ze spektrometrią mas, w osoczu warana zidentyfikowano 123 peptydy o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym, z całościowej liczby 883 peptydów, 306 potencjalnych peptydów przeciwnowotworowych z 1074 peptydów z osocza pytona oraz 235 z 885 peptydów z osocza żółwia [97].

2.5.2. Keratyny

Ważną rolę w procesach diagnostycznych, wspomagających leczenie miejscowe i transport leków oraz zastosowaniach kosmetycznych odgrywają keratyny. Keratyny są grupą nierozpuszczalnych białek wytwarzanych przez keratynocyty. W zależności od zawartości siarki w strukturze keratyn, co wprost przekłada na ich wytrzymałość, keratyny można podzielić na formy „miękkie”, i „twarde” (Ryc. 14). Keratyny nabłonkowe (keratyny miękkie) znajdują się w naskórku, błonie śluzowej jamy ustnej i innych tkankach wyścielonych komórkami nabłonkowymi [98]. Zawartość siarki w ich strukturze nie przekracza 3% [117]. Keratyny tworzą wewnątrzkomórkowe sieci filamentów pośrednich, które stanowią rusztowanie dla komórek nabłonka i tkanek, aby te mogły wytrzymać naprężenia mechaniczne i zachować integralność strukturalną. Keratyny są zaangażowane w procesy fizjologiczne komórki, tj. adhezję, migrację i różnicowanie [99]. Jak również zaangażowane w wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne, np. ochronę przed stresem oksydacyjnym, apoptozę i gojenie ran [100, 101]. Na przykład, keratyna-17 (KRT-17) jest odpowiedzialna za proliferację keratynocytów. Keratynocyty pozbawione KRT-17 są mniejsze, mają obniżoną szybkość translacji białek związaną z obniżonym sygnałem mTOR/AKT, co ma bezpośredni wpływ na proliferację keratynocytów [102].

Poza keratynami nabłonkowymi, forma keratyn „twardych” występuje w przydatkach skóry, są one klasyfikowane jako α -keratyny (występujące we włosach lub wełnie) i β -keratyny (występujące w piórach ptaków i tkankach gadów) [103]. Keratyny twarde posiadają liczne wiązania disiarczkowe, dzięki którym mają wyjątkowo wytrzymałą strukturę, ale

charakteryzują się gorszą rozpuszczalnością. Zawartość siarki w ich strukturze przekracza 3% [117].



Ryc. 14. Uproszczona klasyfikacja protein keratynowych w zależności od zawartości siarki oraz struktury drugorzędowej analizowanej za pomocą dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego (zmodyfikowano na podstawie [122]).

Należy wspomnieć, że niektóre klasy keratyn wykazują charakterystyczne wzorce ekspresji w ludzkich nowotworach. Keratyny są związane z procesem nowotworzenia i przerzutami różnych nowotworów, w tym raka jelita grubego, płuc i sutka, i są szeroko stosowane jako biomarkery diagnostyczne w nowotworach skóry, takich jak czerniak [104]. Markowicz i wsp. wykazali właściwości przeciwnowotworowe fragmentów peptydowych wyizolowanych z włosów ludzkich w stosunku do komórek czerniaka [18].

Wiele grup badawczych na całym świecie poszukuje nowych terapii antynowotworowych, które opierają się na wykorzystaniu biomateriałów pochodzenia naturalnego. Znając właściwości fizykochemiczne i biologiczne keratyn, udowodniono, że mogą one być zastosowane w celach biomedycznych [105, 106]. Obecnie keratyny wykorzystywane są jako składowe opatrunków przy trudno gojących się ranach, w dostarczaniu i uwalnianiu leków, a także w przemyśle kosmetycznym. Biomateriały keratynowe posiadają takie cechy jak biokompatybilność, biodegradowalność i bioaktywność. Charakteryzują się one również hydrofilową powierzchnią, której nie posiada wiele syntetycznych polimerów [107]. Biokompatybilność można zdefiniować jako zdolność materiałów do oddziaływania z komórkami gospodarza bez wywoływania systemowej i miejscowej cytotoksyczności, mutagenyzy, kancerogenności, reakcji alergicznych lub indukcji stanu zapalnego [108]. W

kilku badaniach *in vitro* na różnych liniach komórkowych wykazano, że biomateriały keratynowe są biokompatybilne i wspomagają wzrost komórek [109-112]. Yamauchi i wsp. wykazał, że podłoże pokryte keratyną wykazało lepszą adhezję i wzrost fibroblastów w porównaniu z podłożami pokrytymi kolagenem [111].

Niezależnie od źródła keratyny (włosy, wełna lub pióra), materiały te wykazują pewne właściwości przeciwbakteryjne, które mogą być wzmocnione przez dodanie substancji przeciwdrobnoustrojowych (np. nanocząstek srebra) lub leków (np. mupirocyny) [112,113]. Konop i wsp. wykazali, że sama nierozpuszczalna frakcja keratyn lub z dodatkiem nanocząstek srebra wykazuje właściwości antybakteryjne przeciwko *S. aureus* i *E. coli* w warunkach *in vitro* [112,114]. Co więcej, nie zaobserwowano cech infekcji bakteryjnej w ranach leczonych opatrunkami na bazie keratyny u myszy z cukrzycą indukowaną farmakologicznie.

Hydrolizaty keratyny stały się standardowymi składnikami kosmetyków do włosów i paznokci. W zależności od masy cząsteczkowej, wyróżniamy frakcje hydrolizatów keratyny o małej masie cząsteczkowej, które łatwo przenikają przez warstwę rogową naskórka, zwiększając nawilżenie skóry; natomiast frakcje o dużej masie cząsteczkowej tworzą na powierzchni naskórka film ochronny, poprawiając funkcję barierową skóry [115]. Proces otrzymywania rozpuszczalnych form keratyn wiąże się z szeregiem trudności technicznych. Keratyna trudno rozpuszcza się w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych oraz posiada bardzo stabilną strukturę dzięki między- i wewnątrzcząsteczkowym wiązaniom wodorowym oraz silnym wiązaniom mostków disiarczkowych. Dlatego też strategie ekstrakcji keratyny z różnych naturalnych substratów polegają na rozszczepieniu wiązań dwusiarczkowych i wodorowych w celu przekształcenia jej w formę nieusieciowaną, a tym samym zwiększeniu rozpuszczalności. W literaturze dostępnych jest kilka metod ekstrakcji keratyny opracowanych na przestrzeni lat. Główne metody ekstrakcji i rozpuszczenia keratyny klasyfikuje się jako chemiczne (redukcja, utlenianie, hydroliza, etc.), fizyczne (eksplozja pary wodnej, obróbka wodą przegrzaną, ekstrakcja wodą w stanie nadkrytycznym i promieniowanie mikrofalowe) oraz biologiczne (mikrobiologiczne i enzymatyczne) [116]. Uważa się, że metody enzymatyczne i mikrobiologiczne, w których stosuje się łagodniejsze warunki, pozwalają na zachowanie właściwości biologicznych keratyny [117, 121]. Mikroorganizmy keratynolityczne, reprezentowane przez niektóre bakterie i grzyby keratynofilne, wykorzystują keratynę jako źródło węgla, azotu, siarki oraz energii [121]. Ich aparat keratynolityczny jest przystosowany do radzenia sobie z właściwościami fizycznymi i chemicznymi keratyn. Dane literaturowe wskazują na skuteczność enzymatycznej hydrolizy keratyn za pomocą keratynaz

wytwarzanych przez bakterie z rodziny *Bacillus subtilis* [117]. Wykorzystanie zaś konkretnych enzymów do hydrolizy keratyny pozwala na wybór pożądaných właściwości funkcjonalnych w celu zastosowań biotechnologicznych keratyny. Na przykład, potencjał keratyny w zjawisku adhezji i proliferacji keratynocytów został uwzględniony w produkcji opatrunków na rany [122].

Wełna, będąca masowo produkowanym na skalę światową odpadem organicznym, jest cennym surowcem, który potencjalnie może zastąpić produkty syntetyczne w wielu branżach (medycyna, kosmetologia czy rolnictwo) [118].

3. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Liczne doniesienia literaturowe wskazują na przeciwnowotworowe właściwości substancji pochodzenia naturalnego. Szczególnie interesujące są wyniki prac badawczych dotyczące właściwości przeciwnowotworowych peptydów wyizolowanych ze źródeł, takich jak włosy czy wełna.

W Zakładzie Neuropeptydów, wykorzystując metodykę opracowaną przez Pana Profesora Andrzeja W. Lipkowskiego, otrzymano hydrolizaty pochodzące z wełny alpaki.

Opierając się na powyższych informacjach sformułowano hipotezę badawczą, że otrzymane hydrolizaty z wełny alpaki będą wykazywać aktywność biologiczną, w tym przeciwnowotworową. Stąd celem badań było:

1. Charakterystyka właściwości fizykochemicznych hydrolizatów z wełny alpaki.
2. Ocena właściwości biologicznych otrzymanych hydrolizatów wełny, ze szczególnym uwzględnieniem ich wpływu na żywotność komórek raka kolczystokomórkowego oraz prawidłowych keratynocytów.
3. Porównanie działania obniżającego żywotność komórek otrzymanych hydrolizatów z wełny alpaki do działania obecnie stosowanych leków w terapii raka kolczystokomórkowego, w modelu *in vitro*.
4. Ocena interakcji hydrolizatów wełny alpaki z substancjami przeciwnowotworowymi na komórki raka kolczystokomórkowego *in vitro*.

4. MATERIAŁY I METODY

4.1. Otrzymywanie hydrolizatów z wełny alpaki

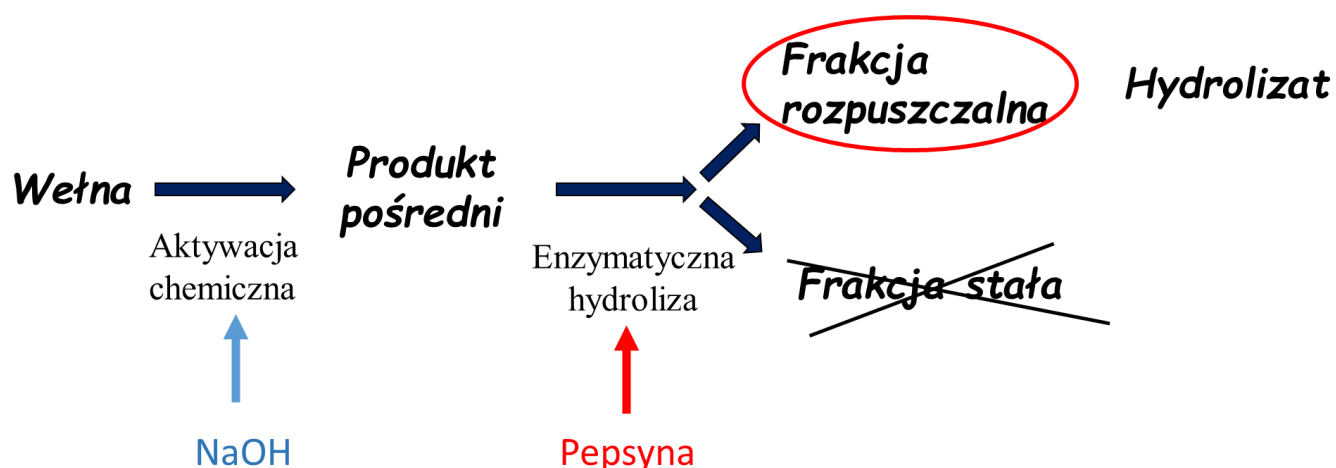
Procedura otrzymywania hydrolizatów z wełny alpaki składa się z dwóch etapów - chemicznej aktywacji oraz enzymatycznego trawienia [119]:

a) Chemiczna aktywacja

Na etapie chemicznej aktywacji badaną próbkę wełny alpaki ($m=100\text{g}$) umieszczano w 3% roztworze wodorotlenku sodu (NaOH) w temperaturze pokojowej (21°C) na okres 1 godziny. W celu ułatwienia penetracji roztworu, próbkę mieszano z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego. Po zakończeniu etapu chemicznej aktywacji próbkę wełny przemywano wodą destylowaną (doprowadzono do wartości $\text{pH} \sim 7$), odsączano na sączku i używano następnie do etapu enzymatycznego trawienia.

b) Enzymatyczne trawienie z wykorzystaniem pepsyny

Badaną próbkę wełny umieszczano w wodzie destylowanej (250 ml) a roztwór doprowadzono do wartości $\text{pH}=1,7$, który jest optymalny dla działania pepsyny. Stosunek enzymu do badanej próbki wynosił 2%. Trawienie prowadzono w termostatowanej wytrząsarce ($T=37^{\circ}\text{C}$, $\text{RPM}=150$, $t=24\text{h}$). Następnie dezaktywowano enzym poprzez ogrzanie próbki do temperatury 80°C . Po obniżeniu temperatury do 40°C i zakończeniu enzymatycznego trawienia, otrzymany przesącz zagęszczano poprzez odparowanie wody na wyparce obrotowej, zamrażano a następnie poddawano procesowi liofilizacji. Otrzymany produkt (frakcja rozpuszczalna) zdefiniowano jako hydrolizat wełny alpaki MRx. W trakcie przeprowadzonych badań otrzymano i zbadano następujące preparaty: MR1, MR2, MR3, MR4 (Ryc. 15). Frakcja stała w niniejszej pracy nie była badana.



Ryc. 15. Schemat otrzymywania hydrolizatów z wełny alpaki.

4.2. Badanie zawartości białek i peptydów w hydrolizatach z wełny alpaki

Oznaczanie zawartości białka całkowitego i peptydów w hydrolizatach z wełny przeprowadzono przy użyciu testu Micro Lowry Onishi & Barr Modification. Do przygotowania krzywej kalibracyjnej jako wzorca użyto albuminy surowicy bydlęcej (BSA) w 0,85% chlorku sodu. 0,85% chlorek sodu służył również jako próba ślepa. 1 mg każdej próbki rozpuszczono w 1mL 0,85% roztworu chlorku sodu. 200mL każdej próbki przeniesiono do falkonów o pojemności 5mL, a następnie dodano 2,2mL odczynnika Biureta. Zawartość próbki natychmiast wymieszano i pozostawiono na 10 minut. Następnie dodano 100 uL odczynnika fenolowego Folin & Ciocalteu, wymieszano i pozostawiono na 30 minut. Następnie roztwory przeniesiono do studzienek 96-dołkowej płytki płaskodennej i zmierzono absorbancję przy długości fali $\lambda=750$ nm za pomocą czytnika mikropłytek. Każdą z próbek badano jednocześnie w czterokrotnym powtórzeniu, a każdy z eksperymentów powtórzono dwukrotnie. Analizie poddano liofilizowane filtry hydrolizatów.

4.3. Badanie składu pierwiastkowego hydrolizatów z wełny alpaki

W celu określenia procentowego składu pierwiastków zawartych w hydrolizatach z wełny alpaki została wykorzystana technika dysfrakcji rentgenowskiej (XRD). Metoda ta służy do analizy struktury substancji na poziomie atomów lub molekularnym. Obraz XRD otrzymanych materiałów uzyskano za pomocą dyfraktometru Empyrean PANalytical przy użyciu

promieniowania Cu K α o długości fali wiązki $\lambda=0,154\text{nm}$. Materiał badany w tym eksperymencie był w postaci sproszkowanej.

4.4. Oznaczenie właściwości przeciwbakteryjnych hydrolizatów z wełny alpaki

W celu określenia właściwości przeciwbakteryjnych hydrolizatów wyizolowanych z wełny alpaki wykorzystano metodę dyfuzji w studni agarowej, elektroforezę kapilarną oraz pomiary potencjału zeta.

4.4.1. Metoda dyfuzji w studni agarowej

W badaniach wykorzystano szczep *Escherichia coli* (ATCC 25922) oraz *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). Płynną pożywkę płynną Mueller-Hinton II (20 ml) zaszczerpiano 1 kolonią *E. coli* lub *S. aureus*, hodowle inkubowano w temp. 37°C z wytrząsaniem (180 rpm) przez 16 godzin. Następnie z tak przygotowanej hodowli przygotowano zawiesinę o gęstości 0,5 w skali McFarland. W kolejnym kroku, na płytkę ze stałym podłożem Mueller-Hinton II naniesiono 100 μl zawiesiny bakterii *E. coli* lub *S. aureus* i rozprowadzono głaszczką. W tak przygotowanych płytkach, wyjałowionym korkoborem wycięto studnie agarowe o średnicy 5 mm. Do studzienek dodano po ok. 100 μl zawiesiny badanych hydrolizatów w stężeniach 1, 5 i 10%. Jako kontrolę pozytywną zastosowano roztwór ampicyliny (10 $\mu\text{g/ml}$). Płytki inkubowano przez 18-20 godzin w temp. 35°C . Powstałe strefy hamowania wzrostu mierzono z wykorzystaniem suwmiarki.

4.4.2. Elektroforeza kapilarna

Pomiary elektroforetyczne przeprowadzono z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej Agilent 7100 series CE (Agilent Technologies) wyposażonej w detektor z matrycą diodową (DAD). Warunki prowadzenia elektroforezy były następujące: kapilara o długości efektywnej $L=33,5$ cm, o średnicy wewnętrznej 75 μm ID, bufor boranowy jako elektrolit wiodący (20 mM) z dodatkiem dodecylsulfianu sodu (SDS) (30 mM), detekcja przy długości fali $\lambda=214$ nm, napięcie $U=20$ kV, nastryk 20 mbar \times 20 s. Każdą z badanych próbek (*E. coli*; *S. aureus*; *E. coli* plus hydrolizat; *S. aureus* plus hydrolizat) nastryknięto trzykrotnie.

Przed rozpoczęciem eksperymentu kapilarę wstępnie kondycjonowano przez 10 min za pomocą 1M roztworu NaOH w celu aktywacji wewnętrznej ściany kapilary. Następnie kapilarę przepłukano buforem. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w temperaturze pokojowej (25°C). Do pomiarów elektroforetycznych użyto 0,5 ml bulionu bakteryjnego.

4.4.3. Wyznaczenie potencjału zeta

Potencjał zeta mierzono za pomocą analizatora wielkości cząsteczek Zetasizer Hardware 3000 i Zetasizer nano ZS (Malvern Instrument). Potencjał zeta jest wyznaczany na podstawie ruchliwości elektroforetycznej (μ) w oparciu o równanie Smoluchowskiego. Do pomiarów potencjału zeta dodawano po 5 ml wyjściowej zawiesiny bakteryjnej do 10 ml odpowiedniego buforu, a następnie mieszkę wirowano przed przeniesieniem jej do polistyrenowej kuwety Malvern w kształcie litery U.

4.5. Związki chemiczne o uznanym działaniu przeciwnowotworowym

Jako substancje kontrolne, wykorzystano związki stosowane w leczeniu raka skóry słonecznego oraz raka kolczystokomórkowego skóry. W badaniach zastosowano 5-fluorouracyl i diklofenak. Mechanizm działania powyższych związków został opisany w rozdziale „2.4.2.2. Farmakologiczne metody leczenia”.

4.6. Linie komórkowe

W badaniach wykorzystano następujące linie komórkowe: komercyjnie dostępne linię ludzkiego raka kolczystokomórkowego SCC-25 oraz linię ludzkich keratynocytów HEKa, a także linię keratynocytów wyizolowanych z materiału klinicznego (sHEK).

Komórki raka kolczystokomórkowego SCC-25 (nr kat. ACC 617) zostały zakupione z Niemieckiej Kolekcji Mikroorganizmów i Hodowli Komórkowych (DSMZ). Ludzkie keratynocyty HEKa zostały zakupione z firmy CellSystems (nr kat. FC-0025). Hodowlę komórek SCC-25 prowadzono w pożywce Ham's F12/DMEM (1:1) z 20% obj. cielęcą surowicą płodową (FBS), 2 mM L-glutaminą, 1 mM pirogronianem oraz 1% obj. roztworu penicyliny i streptomycyny. Ludzkie keratynocyty HEKa hodowano w pożywce EpiLife (Gibco) z dodatkiem suplementu Epi Life (Gibco) i 1% obj. roztworu penicyliny i streptomycyny (Sigma Aldrich, Polska). Komórki inkubowano w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂ i wilgotnością 95%.

4.7. Izolacja keratynocytów z materiału klinicznego

Keratynocyty wyizolowano z próbek skóry pobranych od zdrowych pacjentek po operacji zmniejszenia piersi. Metoda została zatwierdzona przez Komisję Bioetyczną Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (nr zgody KB/283/2013). Keratynocyty izolowano z wykorzystaniem enzymatycznej dysocjacji tkanek. Z pobranych fragmentów skóry usuwano tkankę tłuszczową. Następnie, bioptyaty przepłukiwano roztworem PBS z 1% obj. antybiotyku i inkubowano w pożywce DMEM z dodatkiem dyspazy II (1 mg/ml) przez noc w temperaturze 4°C. Po inkubacji naskórek oddzielano mechanicznie od skóry właściwej. Oddzielony naskórek trawiono przez kilka minut w trypsynie z 0,05% obj. EDTA. Trypsynę inaktywowano, dodając DMEM z 10% obj. FBS. Następnie zawiesinę komórek filtrowano przez sitko (\varnothing 40 μ m) i wirowano przez 5 minut przy 1200 rpm. Supernatant delikatnie usuwano. Osad komórkowy zawieszano w pożywce DMEM z 10% obj. FBS z 1% obj. roztworem antybiotyków i amfoterycyny B. Komórki inkubowano w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂ i wilgotnością 95%. Po 24 godz. zmieniono pożywkę na pożywkę dedykowaną do hodowli keratynocytów EpiLife z 1% obj. antybiotyku. Hodowlę prowadzono do uzyskania ok. 70% konfluencji, a następnie komórki poddano charakterystyce fenotypowej. Wyizolowane komórki oznaczone zostały jako sHEK.

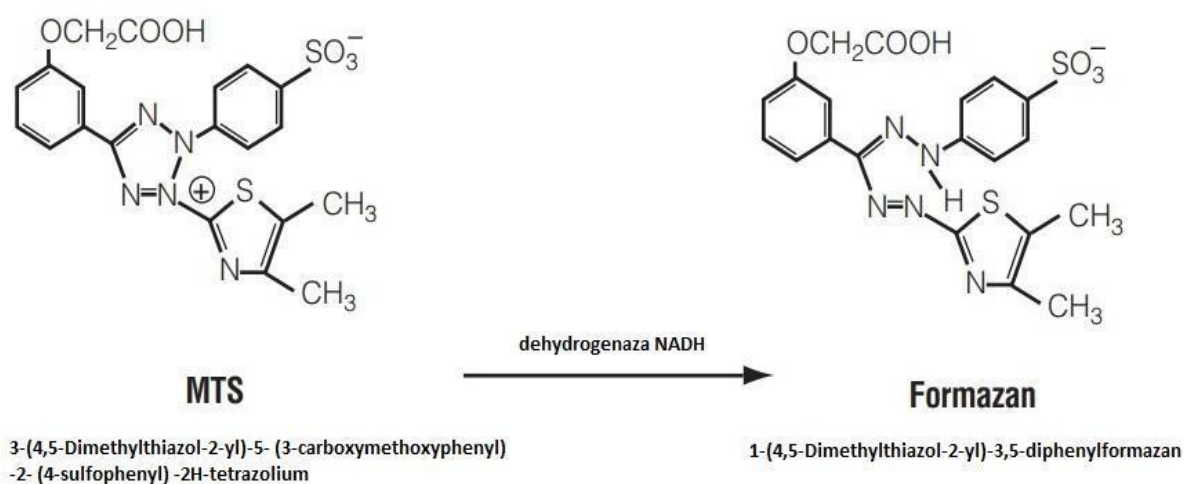
4.8. Charakterystyka fenotypowa wyizolowanych komórek

Do scharakteryzowania wyizolowanych komórek sHEK zastosowano mysie przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko cytokeratynie-14 (nr kat. sc-53253, Santa Cruz). Komórki hodowano na szklanych szkiełkach nakrywkowych (\varnothing 12 mm) umieszczonych w 24-dółkowych płytkach. Komórki przepłukiwano trzykrotnie ciepłym PBS, a następnie utrwalano z zastosowaniem 4% paraformaldehydu (PFA) w PBS przez 20 min w temperaturze pokojowej. Blokowanie wiązań niespecyficznych prowadzono w 10% roztworze koziej surowicy w PBS z dodatkiem 0,25% obj. Triton X przez 60 min w temperaturze pokojowej. Następnie komórki inkubowano w temperaturze 4°C z przeciwciałem pierwszorzędowym rozcieńczonym w mieszaninie blokującej (1:300) przez noc. Po zakończonej inkubacji, komórki przepłukiwano trzykrotnie buforem PBS i inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym skoniugowanym z fluorochromem AlexaFluor 488 (1:500; nr kat. A11003, Invitrogen) przez 60 min w temperaturze pokojowej, w ciemności. Jądra komórkowe barwiono barwnikiem Hoechst 33342 (10 μ g/ml). Preparaty zamykano za pomocą muonting medium. W

celu wizualizacji wykorzystano mikroskop Axioscope z kamerą AxioCamMRC5 i systemem konfokalnym LSM 510.

4.9. Badanie wpływu hydrolizatów na żywotność komórek

Oznaczenie żywotności komórek wykonano z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego odczynnika CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Mechanizm działania odczynnika polega na redukcji soli tetrazolowej MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) do formazanu w obecności dehydrogenazy NADH (Ryc. 16). W wyniku redukcji soli MTS dochodzi do zmiany zabarwienia roztworu z żółtego na brązowy. Intensywność barwy roztworu jest wprost proporcjonalna do liczby komórek aktywnych metabolicznie.



Ryc. 16. Schemat przedstawiający redukcję soli tetrazolowej MTS do formazanu w obecności dehydrogenazy NADH.

Na 96-dółkowe płytki wysiano zawiesinę komórek HEK o gęstości 30 tys. komórek/ml lub zawiesinę komórek SCC-25 o gęstości 20 tys. komórek/ml. Płytki inkubowano przez 24 godz. w temperaturze 37°C. Następnie do komórek dodano badane hydrolizaty lub związki kontrolne. Końcowe stężenie dla hydrolizatów wynosiło: 0,1; 0,5 i 1%, natomiast stężenie związków kontrolnych wynosiło 0-100 μM. Płytki inkubowano przez 24 i 72 godz., a następnie do wszystkich dołków dodawano 20 μl roztworu MTS i inkubowano przez 2 godz. w temp. 37°C. Pomiar absorbancji wykonywano przy długości fali równej 490 nm. Doświadczenie przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach.

4.10. Badanie wpływu hydrolizatów na migrację komórek

W celu zbadania wpływu hydrolizatów na zdolność komórek do migracji wykorzystano test rysy (ang. *scratch assay*) *in vitro*. Polega on na mechanicznym wykonaniu rysy w warstwie komórek w hodowli *in vitro*, a następnie obserwacji zdolności komórek do przemieszczania się (zarastania) w kierunku środka rysy. Rysę wykonuje się najczęściej przy użyciu sterylnej końcówki do pipet o pojemności 10 lub 200 μl .

Komórki SCC-25 wysiewano na płytki 24-dołkowe w ilości 50 tys. komórek na dołek i inkubowano przez 24 godz. w temperaturze 37°C. Następnie, końcówką pipety (10 μl) w każdym dołku wykonano rysę przebiegającą przez środek dołka. Pożywkę zawierającą oderwane komórki usunięto. Do komórek dodawano po 0,5 ml świeżej pożywki zawierającej badane hydrolizaty w stężeniu 0,1 lub 0,5%. Wpływ hydrolizatów na zdolność komórek do migracji dokumentowano fotograficznie z wykorzystaniem mikroskopu kontrastowo-fazowego wyposażonego w kamerę. Zdjęcia wykonano w określonych punktach czasowych: 0, 24, 48, 72 i 96 godz. Szybkość migracji komórek obliczano poprzez pomiar odległości pomiędzy brzegami rysy w każdym punkcie czasowym. Wyniki przedstawiono jako średnią szerokość rysy w danym punkcie czasowym wraz z odchyleniem standardowym.

4.11. Badanie wzajemnego oddziaływania 5-fluorouracylu i hydrolizatów wełny oraz 5-fluorouracylu i diklofenaku na żywotność komórek

Badanie wzajemnego oddziaływania 5-fluorouracylu z hydrolizatami wyizolowanymi z wełny oraz 5-fluorouracylu i diklofenaku, a także ich wpływu na żywotność komórek wykonano z zastosowaniem metody szachownicy (Ryc. 17). Na 96-dołkowe płytki wysiano zawiesinę komórek HEKa o gęstości 30 tys. komórek/ml lub zawiesinę komórek SCC-25 o gęstości 20 tys. komórek/ml. Płytki inkubowano przez 24 godz. w temperaturze 37°C. Następnie do komórek dodawano 5-FU (końcowe stężenia 0,25 μM ; 0,50 μM oraz 1 μM) oraz badany hydrolizat (końcowe stężenie 0,1; 0,5; 1%). Na sąsiednich płytkach do komórek dodawano 5-FU (końcowe stężenia 0,25 μM ; 0,50 μM oraz 1 μM) oraz diklofenak (końcowe stężenia 0,25 μM ; 0,50 μM oraz 1 μM). Końcowa objętość roztworu w dołku wynosiła 100 μl . Komórki inkubowane bez dodatku badanych hydrolizatów i związków stanowiły kontrolę negatywną. Płytki inkubowano przez 24 i 72 godz., a następnie do wszystkich dołków dodawano 20 μl MTS i inkubowano przez 2 godz. w temp. 37°C.

	MRx	0,1%		0,5%		1%				
5-FU (μM)	◀	↓		↓		↓				
0										
0,25										
0,50		↓		↓		↓				
1	◀									
blank										

Ryc. 17. Schemat rozplanowania płytki 96-dołkowej zastosowany w przeprowadzonych doświadczeniach.

Pomiar absorbancji wykonywano przy długości fali 490nm. Doświadczenie przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach. Wpływ wzajemnego oddziaływania oceniano w odniesieniu do wyników otrzymanych dla 5-FU.

4.12. Analiza statystyczna

Przed przystąpieniem do analizy danych z wpływu hydrolizatów i substancji komercyjnych na żywotność komórek, zbiór danych został sprawdzony testem Dixona w celu usunięcia wartości odstających. Analizę statystyczną wpływu związków na komórki w odniesieniu do kontroli przeprowadzono z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Newmana-Keulsa ($p=0,05$). Porównanie wyników pomiędzy różnymi liniami komórkowymi w tych samych stężeniach analizowano za pomocą t-testu ($p=0,05$) i sprawdzono nieparametrycznym testem Manna Whitneya ($p = 0,05$). Wyniki przedstawiono w postaci wykresów ramka-wąsy. Gwiazdki oznaczają istotność różnicy. Należy jednak zauważyć, że ze względu na testowanie różnic między wszystkimi wariantami zastosowano różne kolory gwiazd. Warianty różnią się istotnie tylko wtedy, gdy kolor gwiazdki jest różny. Czarna gwiazdka oznacza, że wybrany wariant różni się od wszystkich pozostałych. Z kolei ten sam kolor oznacza, że różnica jest statystycznie nieistotna. Ponadto liczba gwiazdek (*, ** lub ***) odnosi się $p < 0,05$; $p < 0,01$ i $p < 0,005$, odpowiednio. Wszystkie analizy przeprowadzono w programie Statistica DataMiner 7 (Statsoft, Polska).

Do analizy statystycznej danych ze wzajemnego oddziaływania hydrolizatów z substancjami komercyjnymi użyto oprogramowania Statistica 13.1 (StatSoft, USA) dla systemu MS

Windows 10. Do testu normalności danych użyto testu Shapiro-Wilksa. Homogeniczność wariancji zbadano testem Browna-Forsythe'a. Istotność statystyczną oceniano za pomocą analizy wariancji (ANOVA) i testu post-hoc Tukeya (Tukey' HSD). Wyniki wyrażono jako średnią i odchylenie standardowe ($\bar{x} \pm SD$). Dla wszystkich analiz istotność statystyczną ustalono na poziomie $p < 0,05$.

5. WYNIKI

5.1. Charakterystyka fizykochemicznych właściwości hydrolizatów wełny alpaki

W celu opisanie właściwości fizykochemicznych hydrolizatów otrzymanych z wełny alpaki oszacowano zawartość białek i peptydów w hydrolizatach, jak również oceniono ich skład pierwiastkowy.

5.1.1. Zawartość białek i peptydów w hydrolizatach

Ilościowa zawartość peptydów i białek w hydrolizatach wełny przy użyciu testu Lowry'ego wykazała, że każdy hydrolizat zawierał co najmniej 66% peptydów i białek. Najwyższą zawartość peptydów i białek (85%) odnotowano w próbce MR4 (Tabela 1). W większości próbek hydrolizatów zaobserwowano trudności z rozpuszczalnością. W związku z tym tylko niskie stężenia procentowe czterech wybranych, najlepiej rozpuszczalnych hydrolizatów (MR1-MR4), przebadano w warunkach *in vitro*.

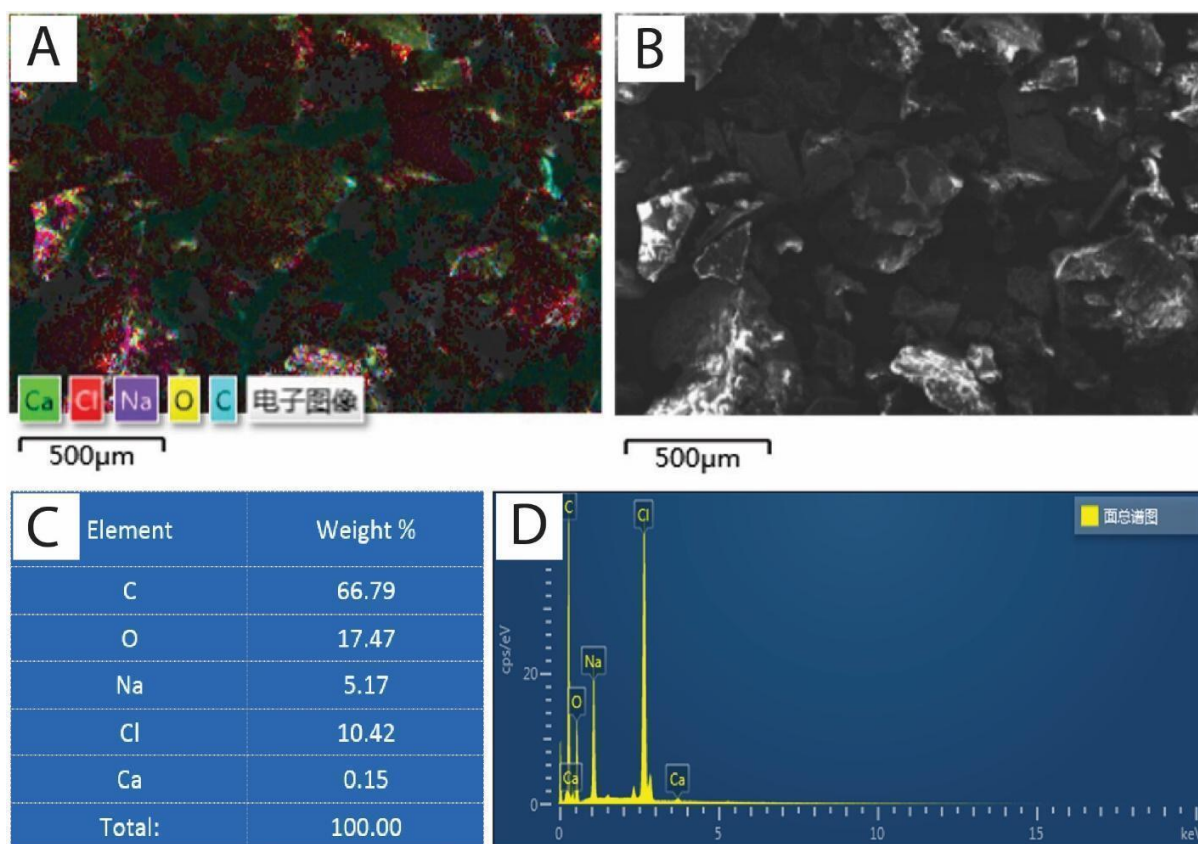
Tab.1. Oszacowanie zawartości białek i peptydów w hydrolizatach metodą Lowry'ego

<i>hydrolizat</i>	<i>% białek/peptydów ± współczynnik zmienności</i>
MR1	66±0.4
MR2	66±1.1
MR3	73±0.9
MR4	85±0.5

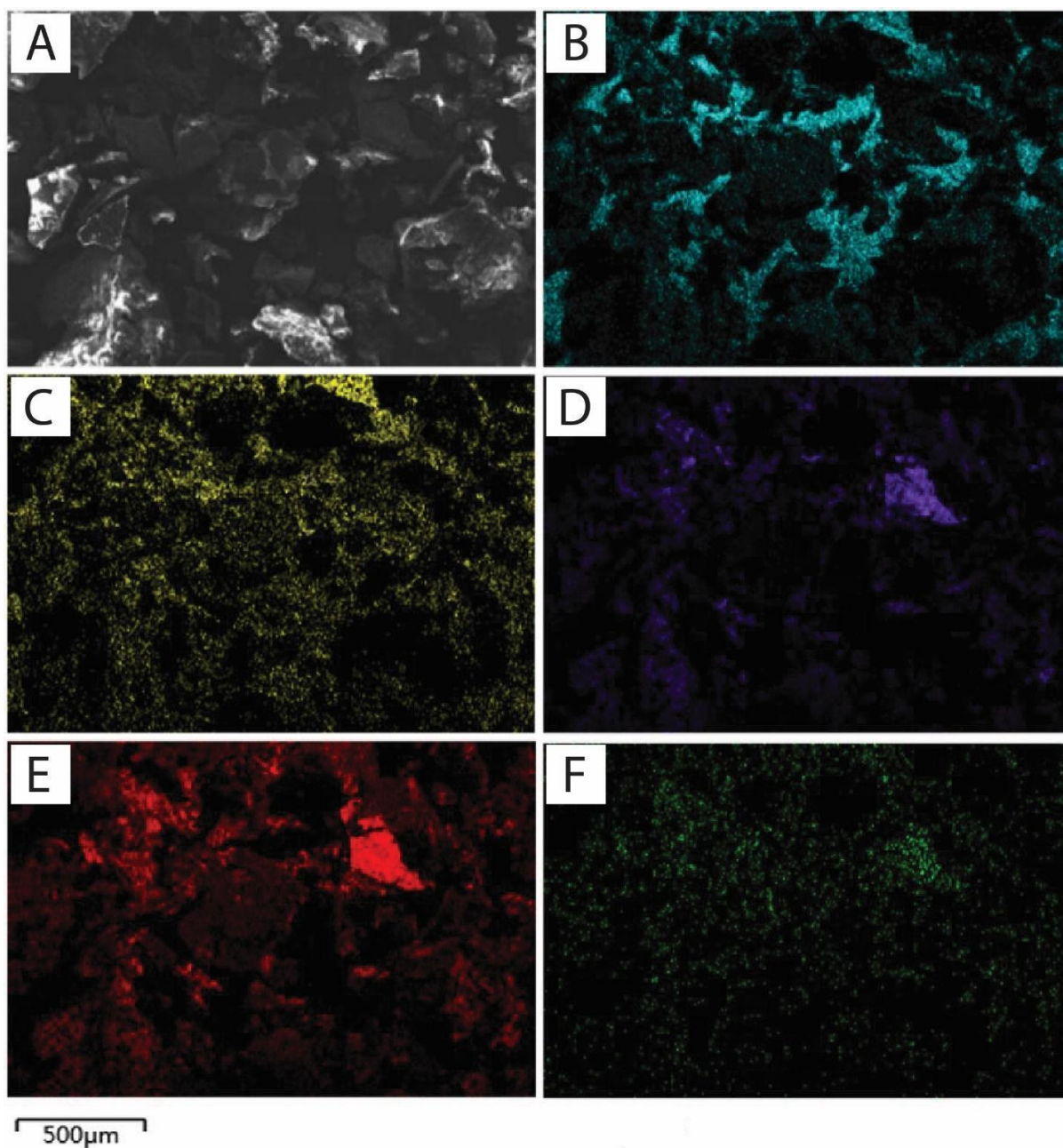
5.1.2. Skład pierwiastkowy hydrolizatów wełny alpaki

Analizę składu pierwiastkowego hydrolizatów z wełny alpaki przeprowadzono za pomocą spektroskopii rentgenowskiej z dyspersją energii (EDX). Wyniki badań EDX, przedstawione na Ryc. 18, wskazują na obecność w badanej próbce kilku pierwiastków, takich jak: sód (Na), chlor (Cl), wapń (Ca), a także tlen (O) i węgiel (C). Obrazy mapy pierwiastków przedstawiono na Ryc. 19. Procentowe udziały pierwiastków oznaczonych w próbce przedstawiono na Ryc. 18C. Dodatkowo, kilka obrazów skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) hydrolizatów pokazano na Ryc. 20. Obraz XRD próbek MR1, MR2 i MR4 zebrano na Ryc. 21. Jak można wyraźnie zauważyć, główne refleksy Bragga pojawiają się pod tym samym

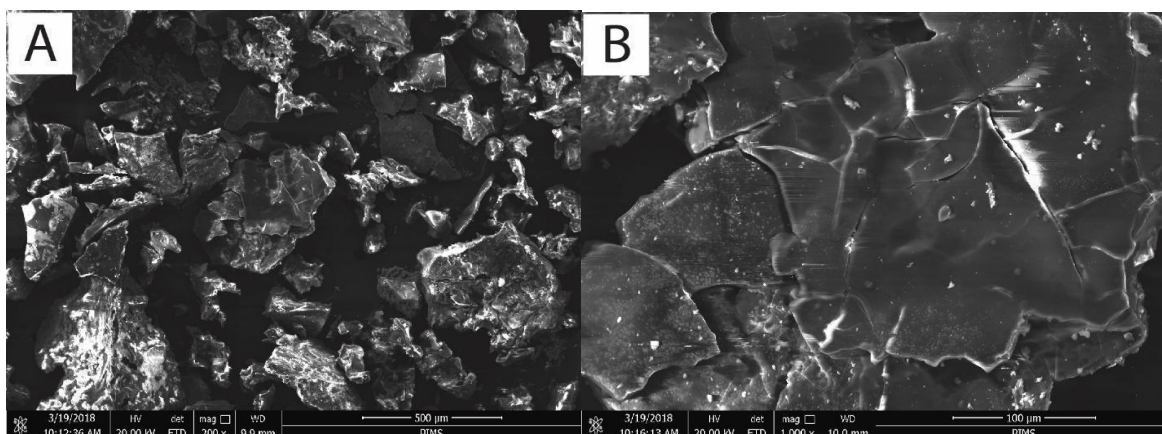
kątem odbicia dla każdego z analizowanych hydrolizatów i są zlokalizowane w punktach: 27,26,31,62,45,39,53,83,56,44,66,20,73,05,75,28 i 83,99 2 θ stopnia.



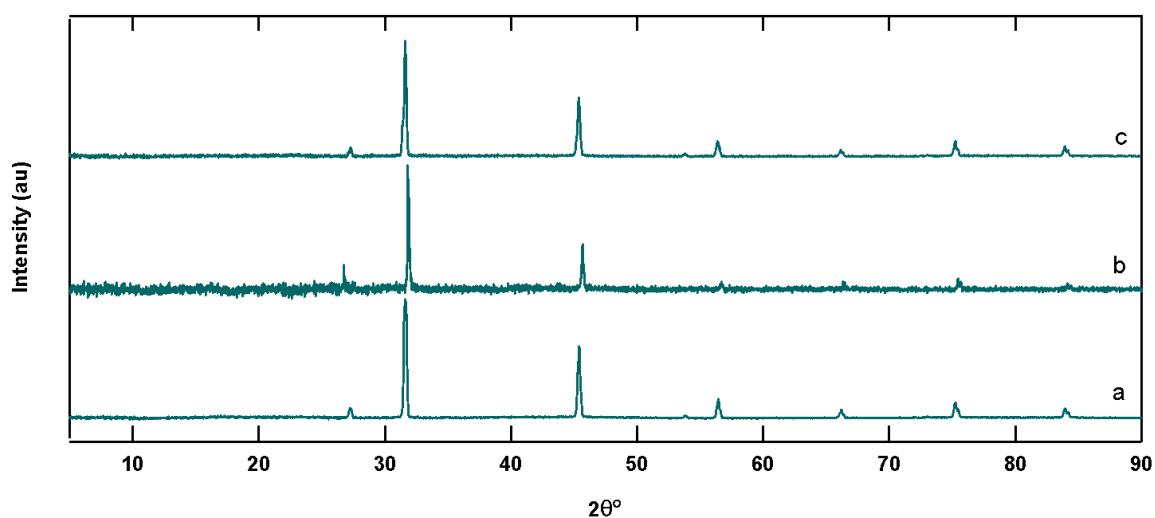
Ryc. 18. (A) Obraz ze skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) mapy pierwiastków uzyskany z obszaru przedstawionego na rycinie (B); (C) procentowe udziały atomowe pierwiastków; (D) widma EDX uzyskane z obszaru przedstawionego na obrazie (B).



Ryc. 19. (A) Obraz SEM z zaznaczonym obszarem akwizycji mapy pierwiastkowej; Obrazy mapy rozkładu pierwiastków w próbce (B) C, (C) O, (D) Na, (E) Cl i (F) Ca.



Ryc. 20. (a-b) Obrazy SEM dla hydrolizatu MR1, w powiększeniu 200 x (A) oraz 1000 x (B).



Ryc. 21. Widma XRD dla hydrolizatów MR1 (a), MR3 (b) oraz MR4 (c).

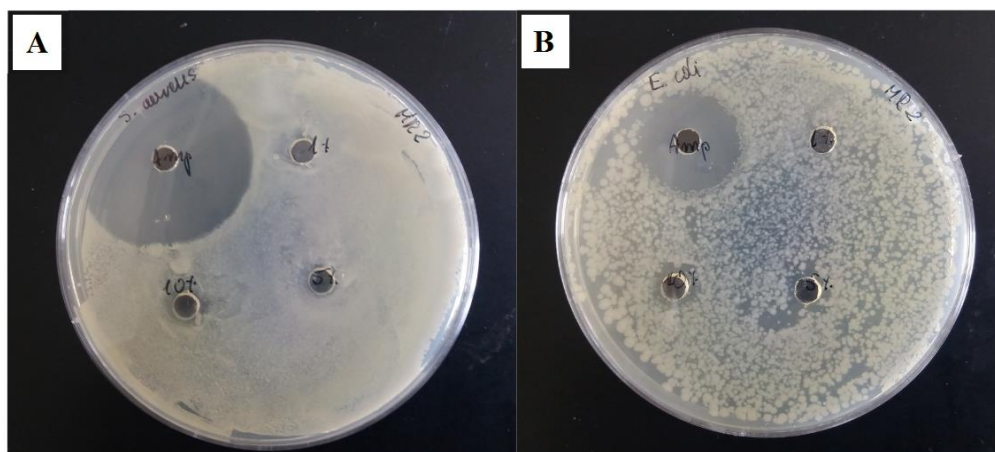
5.2. Właściwości przeciwbakteryjne hydrolizatów wełny alpaki

Potencjalne właściwości przeciwbakteryjne hydrolizatów otrzymanych z wełny alpaki zostały ocenione za pomocą metody dyfuzji w studni agarowej, a następnie z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej oraz pomiaru potencjału Zeta.

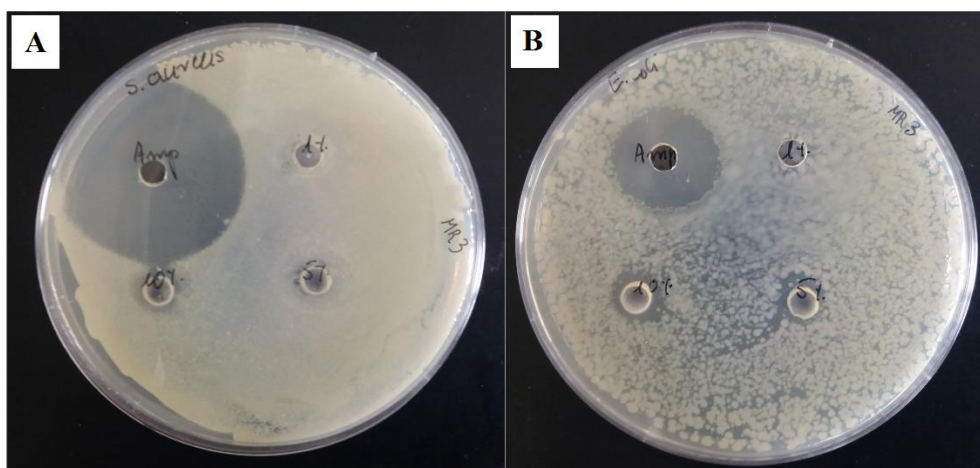
5.2.1. Metoda dyfuzji w studni agarowej

Uzyskane wyniki wykazały, że badane hydrolizaty wykazywały zróżnicowane właściwości przeciwbakteryjne. Najwyższą aktywność wykazano dla hydrolizatu MR3 w stężeniu 10% (Ryc. 23). Preparat MR3 wykazywał aktywność wobec obydwu badanych szczepów, przy

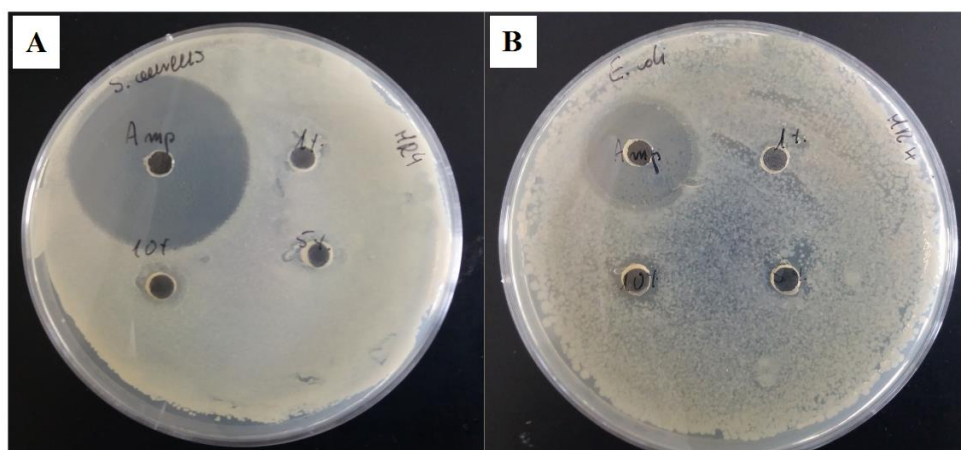
czym wyższą aktywność wykazano wobec szczepu *E. coli* (Ryc. 23B). Hydrolizaty MR2 i MR4 w stężeniu 10% charakteryzowały się słabszymi właściwościami przeciwbakteryjnymi. Również w tym przypadku zaobserwowano większą wrażliwość *E. coli* na działanie hydrolizatów (Ryc. 22, 24). W przypadku *S. aureus* zaobserwowano jego wysoką oporność na działanie hydrolizatów. Spośród badanych preparatów wyraźną strefę zahamowania wzrostu odnotowano wyłącznie dla hydrolizatu MR3 w stężeniu 10%.



Ryc. 22. Wpływ hydrolizatu wełny MR2 w stężeniach 1%, 5% oraz 10% na wzrost bakterii *S. aureus* (A) i *E. coli* (B) w odniesieniu do ampicyliny (Amp).



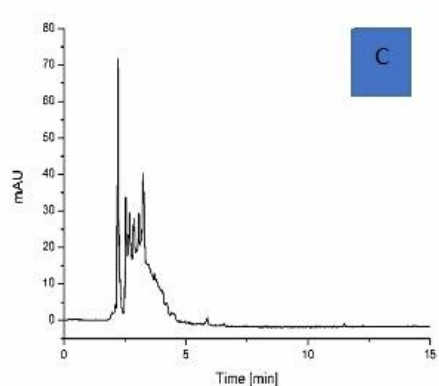
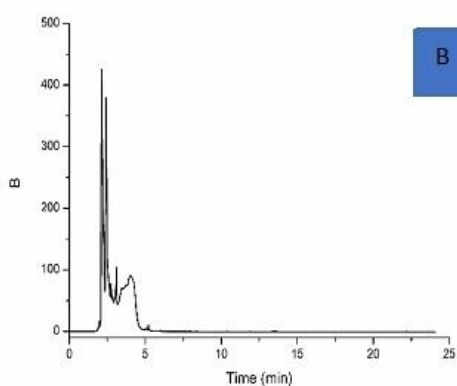
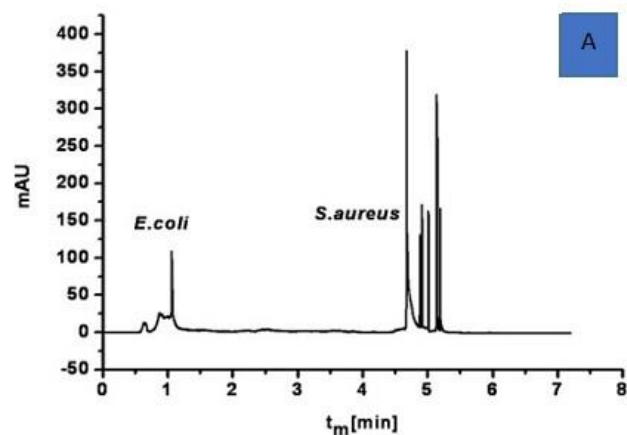
Ryc. 23. Wpływ hydrolizatu wełny MR3 w stężeniach 1%, 5% oraz 10% na wzrost bakterii *S. aureus* (A) i *E. coli* (B) w odniesieniu do ampicyliny (Amp).



Ryc. 24. Wpływ hydrolizatu wełny MR4 w stężeniach 1%, 5% oraz 10% na wzrost bakterii *S. aureus* (A) i *E. coli* (B) w odniesieniu do ampicyliny (Amp).

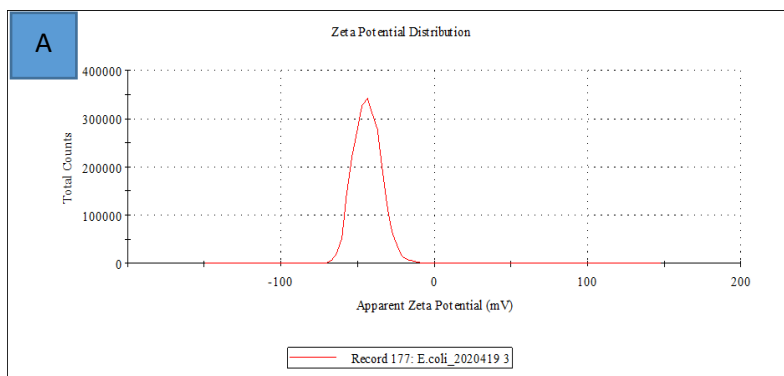
5.2.2. Elektroforeza kapilarna i pomiary potencjału zeta

Przeprowadzona analiza wykazała, że badane hydrolizaty posiadają właściwości przeciwbakteryjne, o czym świadczą nieregularne pasma otrzymywane na elektroferogramie. Kilka sygnałów na elektroferogramie odpowiada różnym wartościom potencjału zeta oraz różnym wielkościom cząstek. Obecność licznych sygnałów świadczy o zniszczeniu błony komórkowej bakterii i uwolnieniu do środowiska białek bakteryjnych (Ryc. 25). Spośród badanych hydrolizatów najlepszą aktywność przeciwbakteryjną wykazał hydrolizat MR4 dla *E. coli* i MR1 dla *S. aureus*. Każdy aglomerat z białek charakteryzował się inną wartością potencjału zeta i odpowiadał poszczególnemu pasmu na elektroferogramie



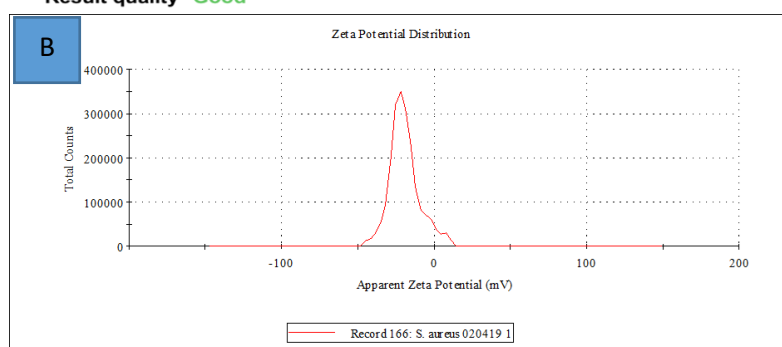
Ryc. 25. Elektroforegramy dla bakterii *E. coli* and *S. aureus* przed (A) oraz po inkubacji z hydrolizatami z wełny alpaki (B, C).

Posiadając wiedzę, że po śmierci komórki potencjał błonowy ulega obniżeniu, należy się spodziewać różnic w rozkładzie potencjału zeta po inkubacji bakterii z hydrolizatami. Analizując wykresy stwierdzono, że dodanie hydrolizatów wełny do zawiesiny bakteryjnej znacząco zmieniło profile potencjału zeta w kierunku bardziej dodatnich wartości (Ryc. 26, 27). Potencjał zeta dla *E. coli* przed inkubacją wynosił $-43,6$ mV, a po inkubacji z hydrolizatem MR4 wyniósł $-10,2$ mV. Dla *S. aureus* otrzymany sygnał z potencjału zeta zmienił się z $-19,4$ mV na $4,36$ mV. Można przyjąć, że hydrolizaty adsorbują się na ścianie komórkowej bakterii i w ten sposób osłaniają ładunek powierzchniowy.



Results

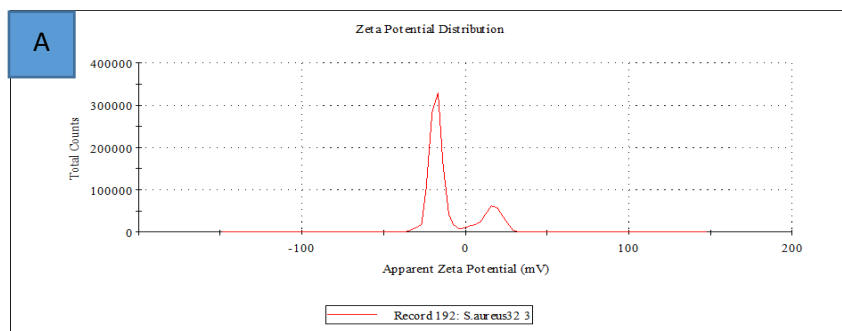
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -43,6	Peak 1: -43,6	100,0	8,97
Zeta Deviation (mV): 8,97	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,320	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality Good			



Results

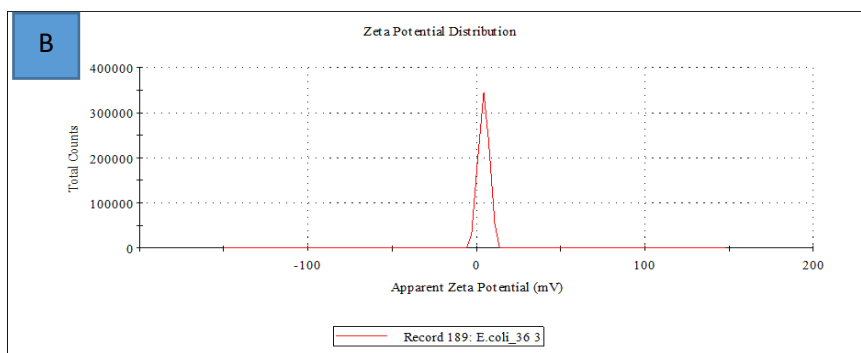
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -19,4	Peak 1: -20,0	96,6	9,10
Zeta Deviation (mV): 9,94	Peak 2: 7,19	3,4	2,42
Conductivity (mS/cm): 0,430	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Ryc. 26. Potencjał zeta zarejestrowany dla szczepu *E. coli* (A) i *S. aureus* (B).



Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -10,2	Peak 1: -17,9	76,5	4,32
Zeta Deviation (mV): 14,9	Peak 2: 15,0	23,5	7,40
Conductivity (mS/cm): 1,02	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality Good			



Results

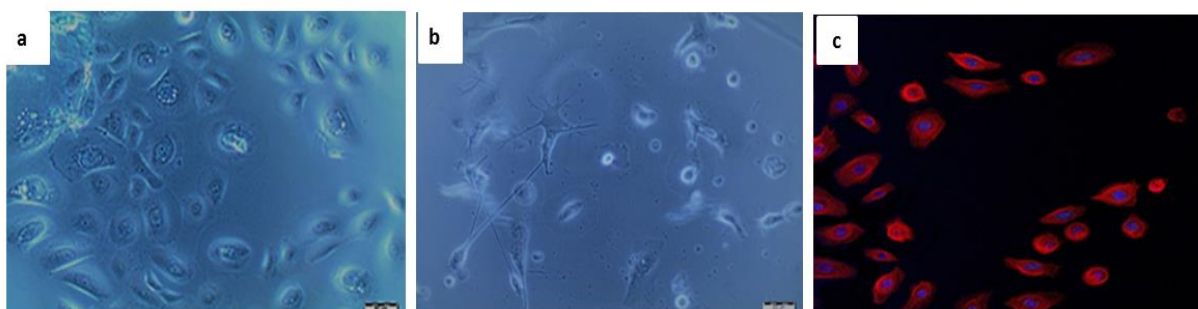
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): 4,36	Peak 1: 4,36	100,0	3,13
Zeta Deviation (mV): 3,13	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,269	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality Good			

Ryc. 27. Otrzymane zmiany potencjału zeta dla bakterii *E. coli* (A) i *S. aureus* (B) poddanych działaniu hydrolizatem wełny MR4.

5.3. Charakterystyka keratynocytów wyizolowanych z materiału klinicznego

5.3.1. Charakterystyka fenotypowa wyizolowanych keratynocytów

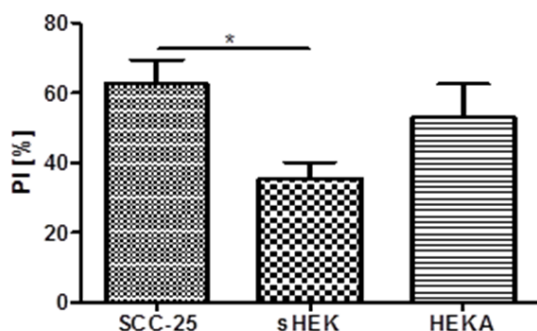
Komórki wyizolowane z fragmentów zdrowej skóry ludzkiej wykazywały typową morfologię epiteloidalną (Ryc. 28a). Komórek nie poddawano procesowi unieśmiertelniania, w związku z czym po ok 3-4 pasażach obserwowano zmiany morfologiczne mogące świadczyć o różnicowaniu komórek. Komórki te były bardziej heterogenne, o bardziej wydłużonym kształcie i powiększonej cytoplazmie oraz cechowały się nieregularnymi jądrami (Ryc. 28b). Komórki te wykazywały również spowolnienie lub zahamowanie podziałów komórkowych. W celu potwierdzenia wyizolowania z fragmentów skóry mianowicie keratynocytów, wykonano barwienie komórek z użyciem przeciwciał przeciwko cytokeratynie 14. Izolowane keratynocyty skóry (sHEK) wykazały dodatnią reakcję z przeciwciałami przeciwko cytokeratynie 14 (CK14), co widać na zdjęciu poniżej (Ryc. 28c).



Ryc. 28. Wyizolowane komórki sHEK widziane w mikroskopie świetlnym (a - wczesny pasaż, b - późny pasaż) oraz keratynocyty znakowane przeciwciałem przeciwko cytokeratynie 14 (CK14) (c). Powiększenie 100x.

5.3.2. Ekspresja Ki-67

Średnia wartość indeksu proliferacji określona z wykorzystaniem białka Ki-67 przedstawiona została jako średnia \pm SD: dla linii komórkowej SCC-25 wynosiła $62,63 \pm 13,62\%$, dla izolowanych komórek sHEK $35,5 \pm 9,29\%$, a w przypadku HEKa wynosiła $53,00 \pm 16,52\%$ (Ryc. 29). Uzyskane wyniki wskazują na różnice w tempie proliferacji komórek pomiędzy liniami komórkowymi, a izolowane keratynocyty sHEK wykazywały najniższy odsetek proliferacji.



Ryc. 29. Indeks proliferacyjny dla linii komórkowych SCC-25, sHEK i HEKa po 24 godzinach inkubacji. W analizie statystycznej wykorzystano wartości średnie opierając się na testach porównawczych (ANOVA, Kruskal-Wallis/Dunn's Testy porównań wielokrotnych) przy użyciu programu Prism ($p < 0,05$).

5.4. Właściwości badanych hydrolizatów i związków chemicznych o działaniu przeciwnowotworowym

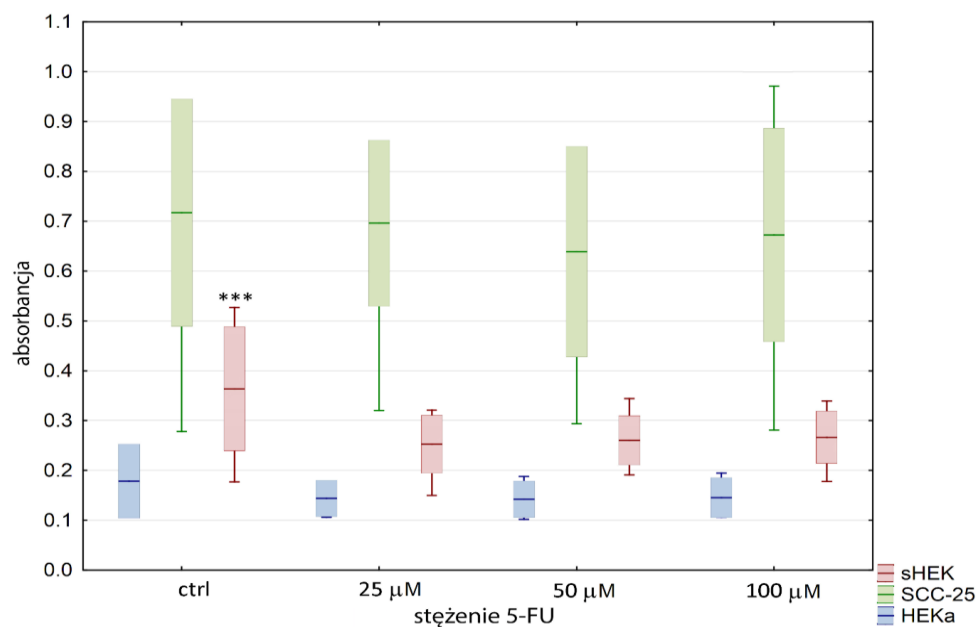
Właściwości biologiczne badanych hydrolizatów z wełny alpaki oraz związków komercyjnych o uznanym działaniu przeciwnowotworowym oceniono poprzez zbadanie ich wpływu na żywotność komórek raka kolczystokomórkowego oraz prawidłowych keratynocytów.

Żywotność komórek, przedstawioną na wykresach jako absorbancję, oznaczano za pomocą testu MTS. Oznaczenie wykonano w odniesieniu do kontroli, którą stanowiły komórki nietraktowane żadnymi substancjami. Uzyskane w pracy dane wskazują na spadek żywotności komórek HEKa, sHEK i SCC-25 w doświadczeniach z badanymi hydrolizatami. Absorbancja mierzona dla SCC-25 oraz sHEK i HEKa była istotnie różna dla wszystkich badanych związków we wszystkich stosowanych stężeniach.

5.4.1. Wpływ 5-fluorouracylu na żywotność komórek

W badaniach, jako substancję referencyjną, zastosowano 5-fluorouracyl. Wpływ 5-fluorouracylu na żywotność komórek prawidłowych i nowotworowych był zależny od stężenia i czasu inkubacji. Zaobserwowano, że w trakcie 24 godzinnej inkubacji wszystkie badane linie

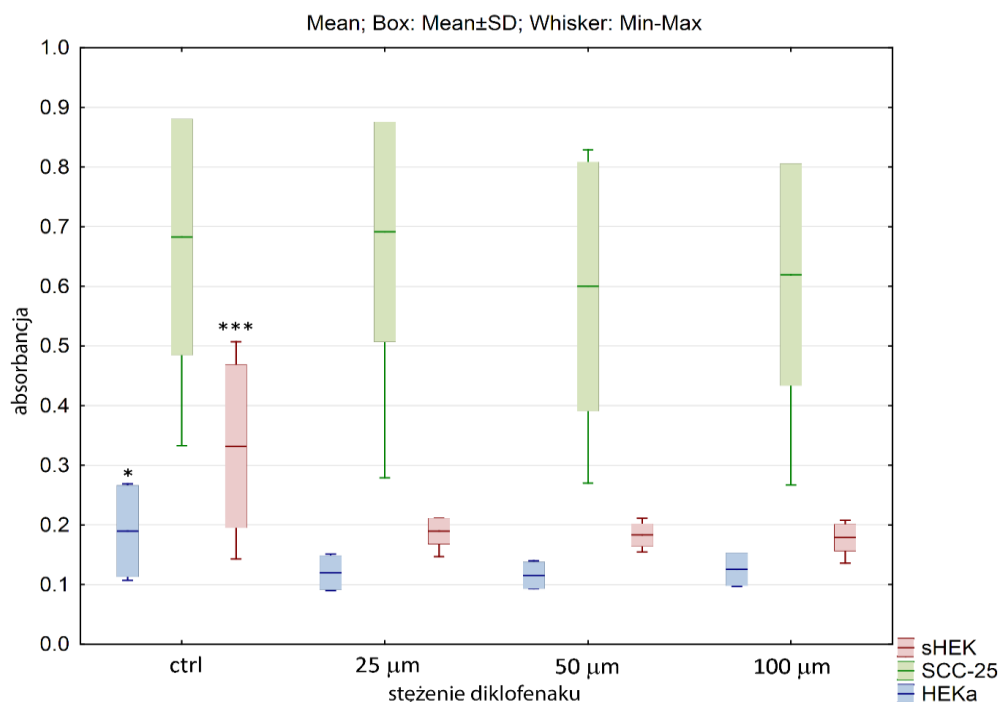
komórkowe wykazywały zbliżoną niską wrażliwość na działanie 5-FU. Po 24 godz. inkubacji, największy spadek żywotności odnotowano dla komórek sHEK ($p < 0,005$) (Ryc. 30).



Ryc. 30. Wpływ 5-fluorouracylu na żywotność komórek trzech linii komórkowych po 24-godzinnej inkubacji. Wyniki przedstawiono w postaci wykresów pudełkowych (ramka-wąsy). Gwiazdki wskazują na istotność różnicy. Należy jednak zauważyć, że ze względu na badanie różnic między wszystkimi wariantami zastosowano różne kolory gwiazdek. Warianty różnią się istotnie tylko wtedy, gdy kolor gwiazdki jest różny. Czarna gwiazdka oznacza, że wybrany wariant różni się od wszystkich pozostałych. Natomiast ten sam kolor oznacza, że różnica jest statystycznie nieistotna. Ponadto liczba gwiazdek (*; ** lub ***) oznacza odpowiednio $p < 0,05$; $p < 0,01$ i $p < 0,005$.

5.4.2. Wpływ diklofenaku na żywotność komórek

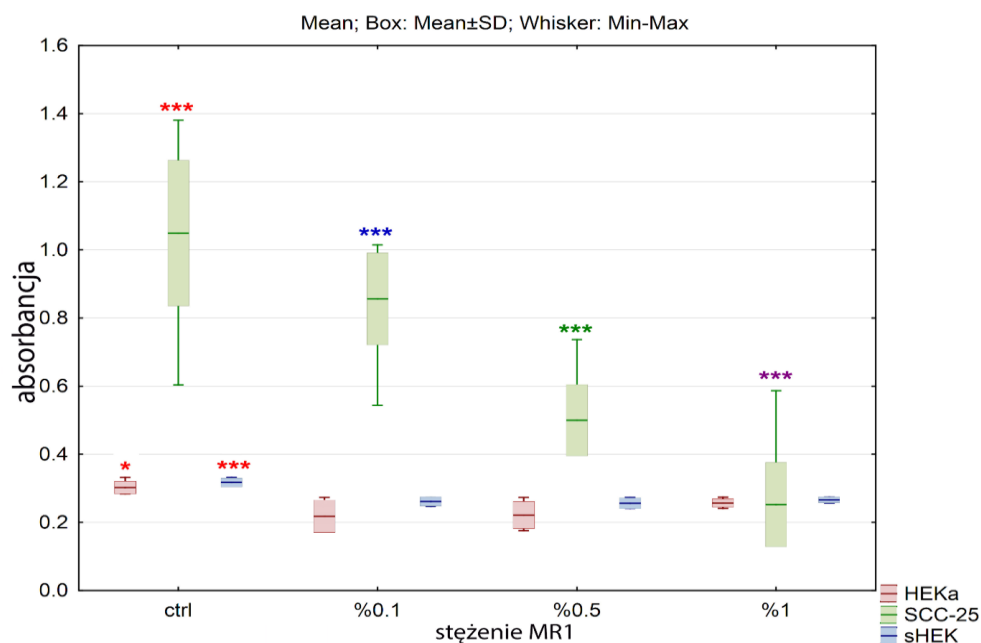
Podobny efekt jak dla 5-fluorouracylu, zaobserwowano dla diklofenaku, gdzie w przypadku diklofenaku, komórki SCC-25 poddane 24 godzinom inkubacji wykazywały żywotność zbliżoną do żywotności komórek kontrolnych ($p > 0,05$). Dla linii komórkowych HEKa i sHEK dodatek diklofenaku w najniższym stężeniu 25 μM powodował istotny statystycznie spadek żywotności komórek ($p < 0,05$ i $p < 0,005$ odpowiednio dla HEKa i sHEK) (Ryc. 31).



Ryc. 31. Wpływ diklofenaku na żywotność komórek trzech linii komórkowych po 24-godzinnej inkubacji. Wyniki przedstawiono w postaci wykresów pudełkowych (ramka-wąsy). Gwiazdki wskazują na istotność różnicy. Należy jednak zauważyć, że ze względu na badanie różnic między wszystkimi wariantami zastosowano różne kolory gwiazdek. Warianty różnią się istotnie tylko wtedy, gdy kolor gwiazdki jest różny. Czarna gwiazdka oznacza, że wybrany wariant różni się od wszystkich pozostałych. Natomiast ten sam kolor oznacza, że różnica jest statystycznie nieistotna. Ponadto liczba gwiazdek (*; ** lub ***) oznacza odpowiednio $p < 0,05$; $p < 0,01$ i $p < 0,005$.

5.4.3. Wpływ hydrolizatu MR1 na żywotność komórek

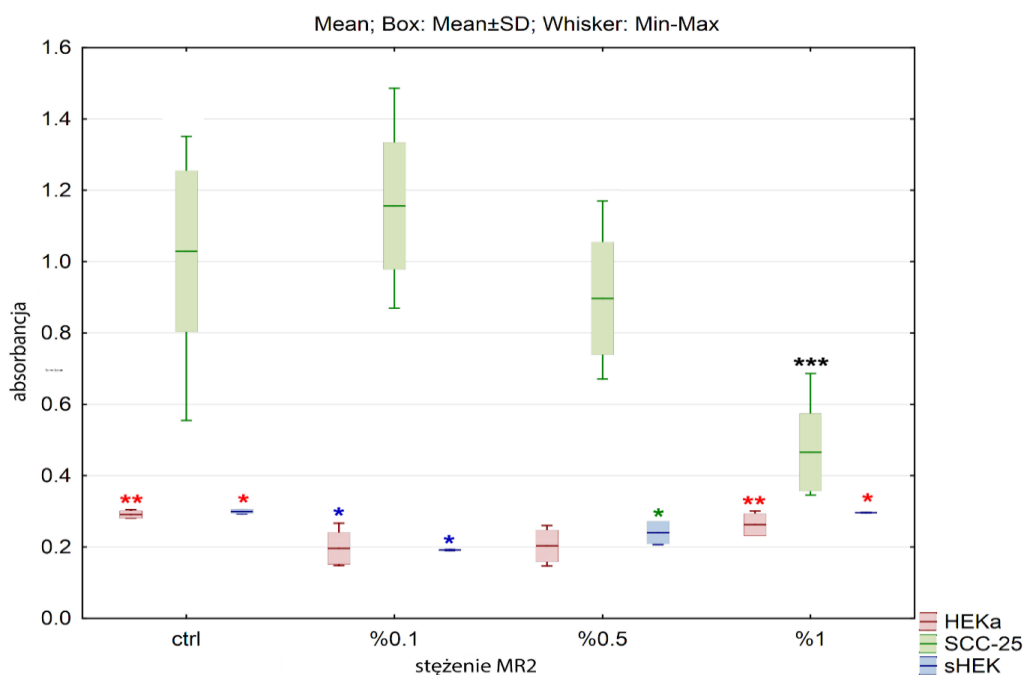
Obecność hydrolizatu MR1 powodowała istotny spadek żywotności komórek SCC-25 po 24 godzinach inkubacji przy wszystkich zastosowanych stężeniach hydrolizatu ($p < 0,005$). Również w przypadku komórek sHEK i HEKa, inkubacja z hydrolizatem wełny MR1 powodowała istotny spadek żywotności komórek w porównaniu z kontrolą ($p < 0,005$ i $p < 0,05$, odpowiednio). Nie zaobserwowano zmian między wariantami o różnych stężeniach (Ryc. 32).



Ryc. 32. Wpływ hydrolizatu MR1 na żywotność komórek trzech linii komórkowych po 24-godzinnej inkubacji. Wyniki przedstawiono w postaci wykresów pudełkowych (ramka-wąsy). Gwiazdki wskazują na istotność różnicy. Należy jednak zauważyć, że ze względu na badanie różnic między wszystkimi wariantami zastosowano różne kolory gwiazdek. Warianty różnią się istotnie tylko wtedy, gdy kolor gwiazdki jest różny. Ten sam kolor oznacza, że różnica jest statystycznie nieistotna. Ponadto liczba gwiazdek (*; ** lub ***) oznacza odpowiednio $p < 0,05$; $p < 0,01$ i $p < 0,005$.

5.4.4. Wpływ hydrolizatu MR2 na żywotność komórek

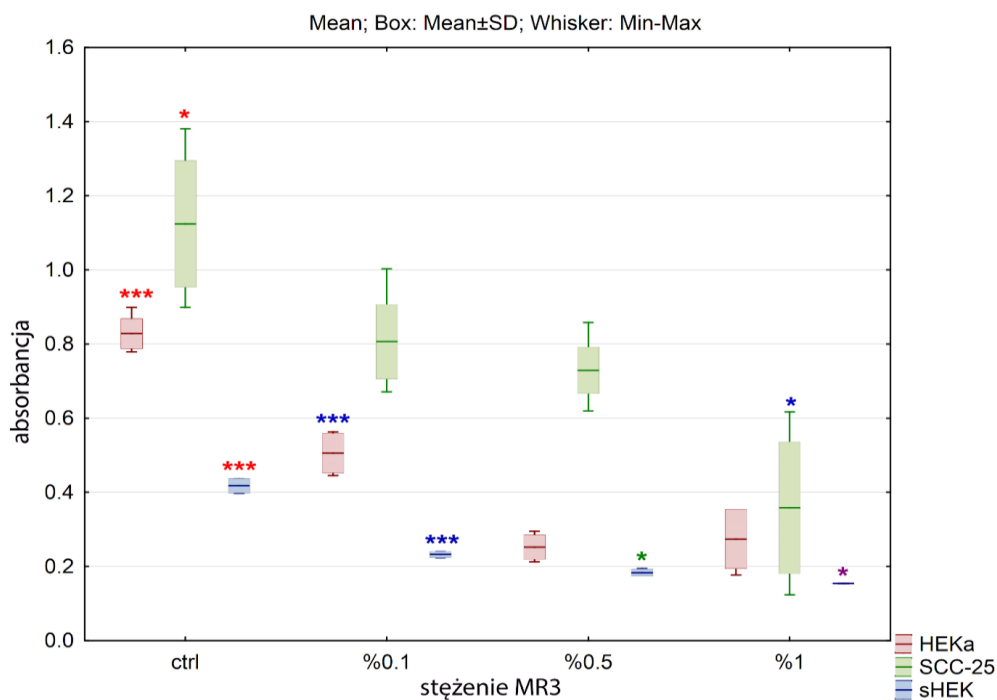
W przypadku komórek SCC-25 tylko najwyższe stężenie hydrolizatu spowodowało istotny spadek żywotności komórek ($p < 0,01$). Również w przypadku linii komórkowej HEKa zaobserwowano istotny spadek żywotności komórek ($p < 0,05$). Preparat MR2, w stężeniu 1%, oddziaływał silniej na komórki nowotworowe niż na komórki prawidłowe (Ryc. 33). Dodanie 0,1% zawiesiny hydrolizatu MR2 powodowało znaczący spadek żywotności komórek linii sHEKa ($p < 0,05$), ale przy stężeniu 0,5% obserwowano wzrost żywotności komórek linii sHEKa (Ryc. 33). Intensywność absorbancji w przypadku dodania 1% hydrolizatu wełny MR2 była podobna do absorbancji kontroli dla badanych keratynocytów.



Ryc. 33. Wpływ hydrolizatu MR2 na żywotność komórek trzech linii komórkowych po 24-godzinnej inkubacji. Wyniki przedstawiono w postaci wykresów pudełkowych (ramka-wąsy). Gwiazdki wskazują na istotność różnicy. Należy jednak zauważyć, że ze względu na badanie różnic między wszystkimi wariantami zastosowano różne kolory gwiazdek. Warianty różnią się istotnie tylko wtedy, gdy kolor gwiazdki jest różny. Czarna gwiazdka oznacza, że wybrany wariant różni się od wszystkich pozostałych. Natomiast ten sam kolor oznacza, że różnica jest statystycznie nieistotna. Ponadto liczba gwiazdek (*; ** lub ***) oznacza odpowiednio $p < 0,05$; $p < 0,01$ i $p < 0,005$.

5.4.5. Wpływ hydrolizatu MR3 na żywotność komórek

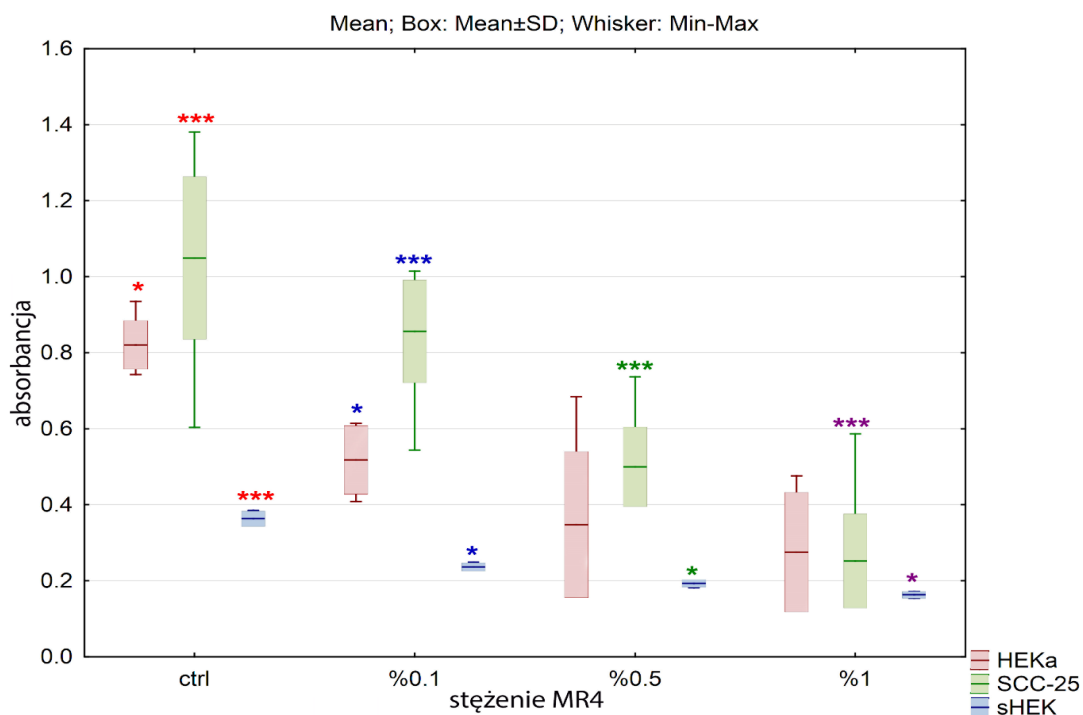
Hydrolizat wełny alpaki MR3 również spowodował obniżenie żywotności komórek zarówno nowotworowych, jak i prawidłowych keratynocytów, zgodnie z wynikami przedstawionymi na rycinie 34. Obniżenie żywotności komórek w odpowiedzi na działanie hydrolizatu wełny MR3 w liniach komórkowych HEKa, SCC-25 i sHEK było istotne przy wartościach p mniejszych od 0,001; 0,05 i 0,05 odpowiednio (Ryc. 34). Żywotność komórek poddanych 24 godzinnej inkubacji z hydrolizatem MR3 spadała wraz ze wzrostem stężenia preparatu.



Ryc. 34. Wpływ hydrolizatu MR3 na żywotność komórek trzech linii komórkowych po 24-godzinnej inkubacji. Wyniki przedstawiono w postaci wykresów pudełkowych (ramka-wąsy). Gwiazdki wskazują na istotność różnicy. Należy jednak zauważyć, że ze względu na badanie różnic między wszystkimi wariantami zastosowano różne kolory gwiazdek. Warianty różnią się istotnie tylko wtedy, gdy kolor gwiazdki jest różny. Ten sam kolor oznacza, że różnica jest statystycznie nieistotna. Ponadto liczba gwiazdek (*; ** lub ***) oznacza odpowiednio $p < 0,05$; $p < 0,01$ i $p < 0,005$.

5.4.6. Wpływ hydrolizatu MR4 na żywotność komórek

Wpływ hydrolizatu MR4 na żywotność komórek SCC-25 i sHEK był zależny od stężenia preparatu. Żywotność komórek rakowych poddanych 24 godzinnej inkubacji z hydrolizatem MR4 spadała wraz ze wzrostem stężenia preparatu ($p < 0,005$). Żywotność prawidłowych wyizolowanych keratynocytów poddanych 24 godzinnej inkubacji z hydrolizatem MR4 również spadała wraz ze wzrostem stężenia preparatu ($p < 0,05$). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w żywotności komórek HEKa poddanych działaniu najwyższych stężeń MR4 (Ryc. 35). Hydrolizat MR4 w stężeniu 1% spowodował obniżenie żywotności komórek SCC-25 o 70% w stosunku do nietraktowanych komórek oraz o 40% i 60% odpowiednio dla izolowanych keratynocytów sHEK i komercyjnie dostępnej linii HEKa.

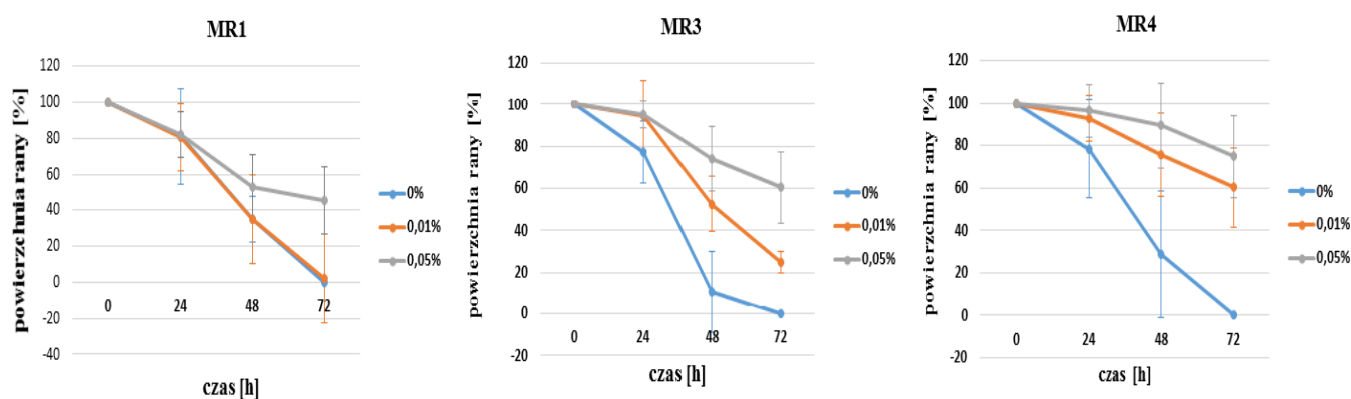


Ryc. 35. Wpływ hydrolizatu MR4 na żywotność komórek trzech linii komórkowych po 24-godzinnej inkubacji. Wyniki przedstawiono w postaci wykresów pudełkowych (ramka-wąsy). Gwiazdki wskazują na istotność różnicy. Należy jednak zauważyć, że ze względu na badanie różnic między wszystkimi wariantami zastosowano różne kolory gwiazdek. Warianty różnią się istotnie tylko wtedy, gdy kolor gwiazdki jest różny. Ten sam kolor oznacza, że różnica jest statystycznie nieistotna. Ponadto liczba gwiazdek (*; ** lub ***) oznacza odpowiednio $p < 0,05$; $p < 0,01$ i $p < 0,005$.

5.5. Wpływ hydrolizatów na migrację komórek

Wpływ hydrolizatów wełny na migrację komórek SCC-25 oceniano za pomocą tak zwanego testu rysy (ang. *scratch assay*). Tempo migracji komórek poddanych działaniu hydrolizatów było wolniejsze w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Po 72 godzinach rana kontrolna uległa całkowitemu zamknięciu, podczas gdy rana w przypadku komórek poddanych działaniu hydrolizatów zmniejszyła się średnio o około 50%. Po 24 godzinnej inkubacji z preparatem MR3 lub MR4 w stężeniach 0,01 i 0,05%, obserwowano nieznacznie zahamowanie migracji komórek SCC-25 w porównaniu do komórek kontrolnych. Zahamowanie migracji komórek przez obydwa hydrolizaty było zbliżone. Przy wydłużeniu czasu inkubacji do 72 godzin zaobserwowano zmniejszenie powierzchni rysy do około 25% w przypadku zastosowania 0,01% hydrolizatu MR3 oraz do około 60% w przypadku zastosowania 0,01%

hydrolizatu wełny MR4 (Tab. 2), w porównaniu do powierzchni rany w czasie początkowym. Wszystkie hydrolizaty w stężeniu 0,05% w czasie 48-godzinnej inkubacji, w sposób istotny statystycznie, hamowały migrację komórek lepiej niż hydrolizaty w stężeniu 0,01% (Ryc. 36). Zaobserwowano, że hydrolizat MR1 w stężeniu 0,01% nie wpływał na zahamowanie tempa migracji komórek. Migracja komórek SCC-25 poddanych działaniu MR1 była porównywalna do migracji komórek nietraktowanych. Zastosowanie hydrolizatu MR1 w stężeniu 0,05% po 72 godzinach inkubacji powodowało zahamowanie migracji w porównaniu do komórek nietraktowanych.



Ryc. 36. Szybkość migracji komórek SCC-25 po poddaniu ich działaniu hydrolizatów wełny alpaki MR1, MR3 oraz MR4.

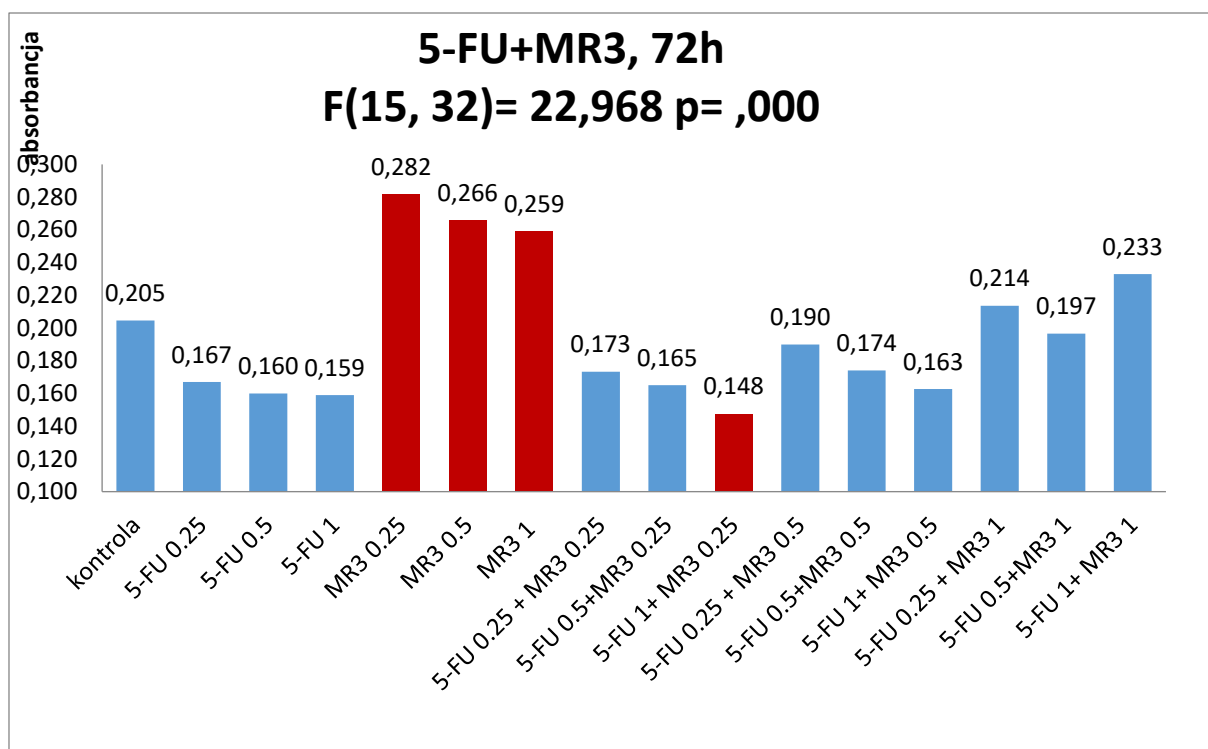
Tabela 2. Wartości procentowe powierzchni rany ocenianej w teście migracji w trzech przedziałach czasowych dla działania hydrolizatów wełny MR1, MR3 oraz MR4 na komórki raka kolczystokomórkowego SCC-25. Hydrolizaty użyto w stężeniach 0,01% oraz 0,05%.

Hydrolizaty wełny	MR1	MR3	MR4
24h 0,01%	80	95	95
24h 0,05%	82	95	98
48h 0,01%	38	52	75
48h 0,05%	55	75	90
72h 0,01%	4	25	60
72h 0,05%	48	60	77

5.6. Wpływ interakcji hydrolizatów z 5-fluorouracylem oraz diklofenaku z 5-fluorouracylem na komórki nowotworowe

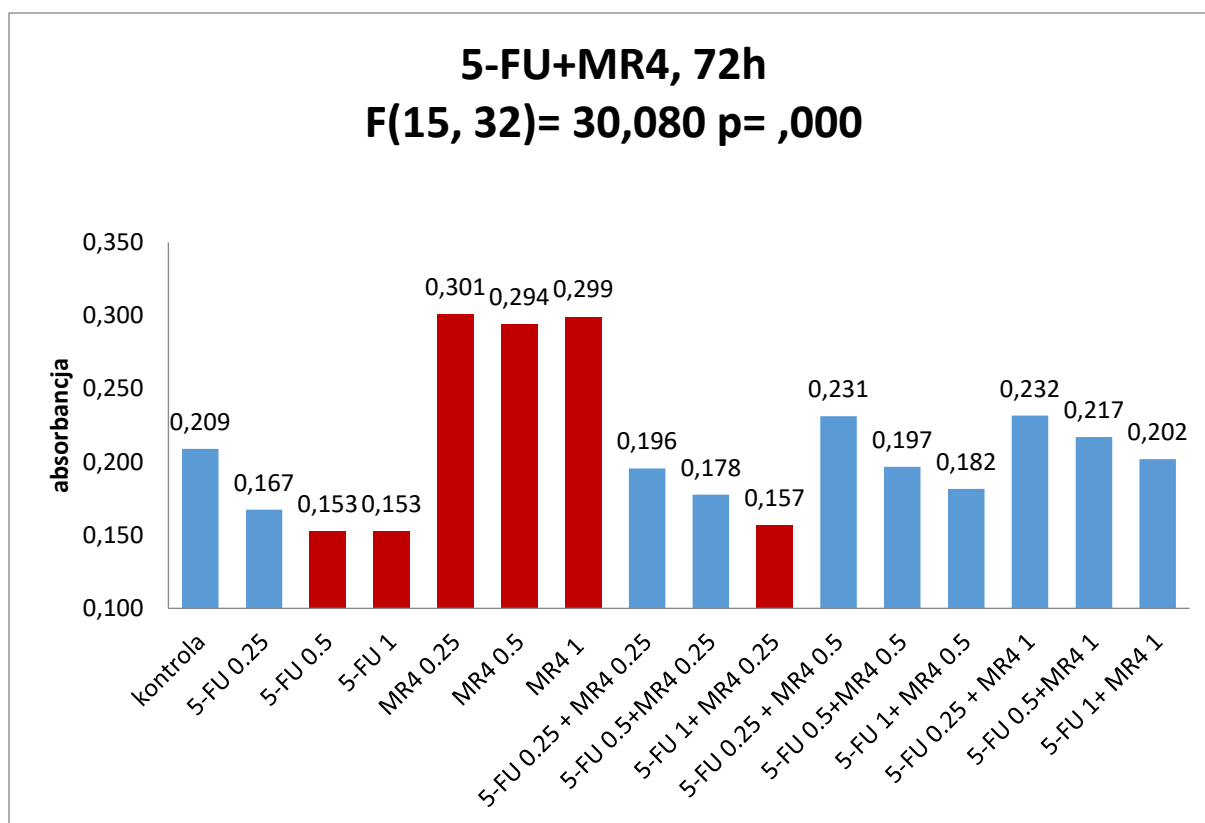
Analizie poddano efekt współdziaływania na żywotność komórek SCC-25 następujących par substancji : 5-fluorouracylu z hydrolizatami wełny MR3 lub MR4 oraz 5-fluorouracylu z diklofenakiem.

5-FU wykazał działanie antyproliferacyjne wobec komórek raka kolczystokomórkowego po 72 godzinach inkubacji (Ryc. 37). Z tego powodu kolejne doświadczenia nad interakcją dwóch substancji przeprowadzono po 72 godzinnych inkubacjach. 5-fluorouracyl stosowany samodzielnie powodował statystycznie istotne obniżenie żywotności komórek SCC-25. Dodatek 0,25% i 0,5% hydrolizatu MR3 do 5-FU powodował ten sam statystycznie istotny spadek żywotności komórek SCC-25 w porównaniu do 5-FU stosowanego samodzielnie (Ryc. 37).



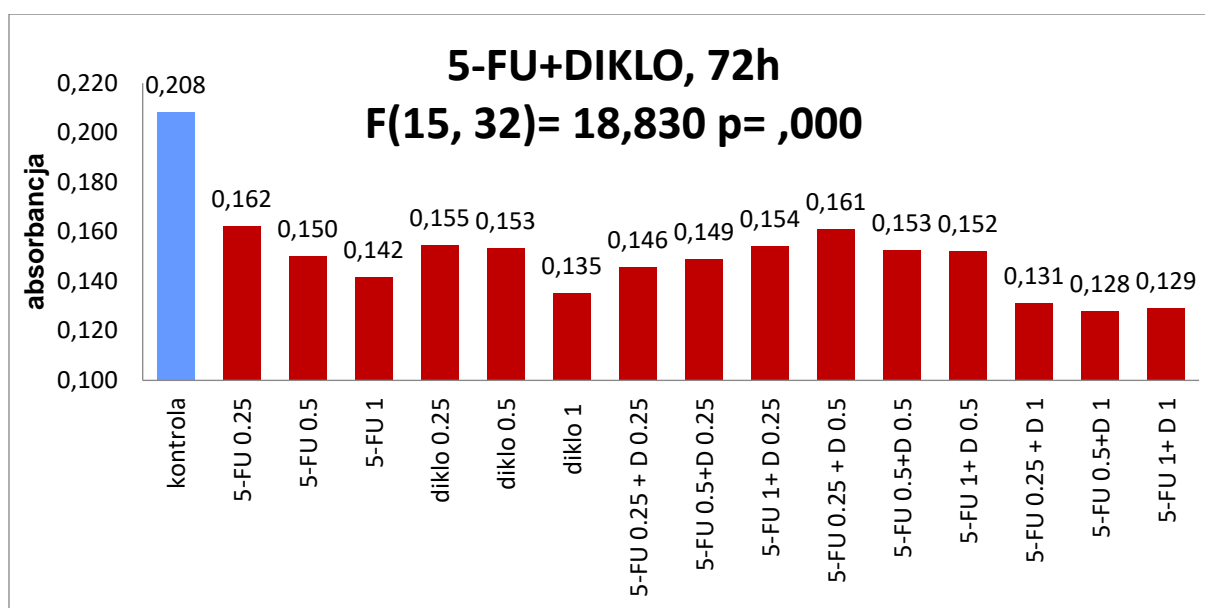
Ryc. 37. Wpływ interakcji 5-fluorouracylu z hydrolizatem wełny MR3 po 72 godzinach inkubacji. Oś x przedstawia zastosowane substancje (izolowany 5-FU zastosowany w trzech stężeniach 0,25 μ M; 0,5 μ M i 1 μ M, izolowany hydrolizat wełny MR3 w trzech stężeniach 0,25%; 0,5% i 1%, a także pary 5-FU+hydrolizat wełny MR3 w każdym ze stężeń, odpowiednio). Kontrola to nietraktowane żadnymi substancjami komórki raka koleczystokomórkowego SCC-25. Oś y przedstawia wartości absorbancji po 72 godzinach inkubacji. Na czerwono zaznaczono słupki z istotnymi statystycznie wartościami różnymi od grupy kontrolnej.

Dodanie 0,25% hydrolizatu MR4 do 1 μ M 5-fluorouracylu spowodowało statystycznie istotne obniżenie żywotności komórek SCC-25 w porównaniu z komórkami nieleczonymi, a efekt ten był podobny do 5-FU stosowanego samodzielnie (Ryc. 38).



Ryc.38. Efekt interakcji 5-fluorouracylu z hydrolizatem wełny MR4 po 72 godzinach inkubacji. Oś x przedstawia zastosowane substancje (izolowany hydrolizat wełny MR4 w trzech stężeniach 0,25%; 0,5% i 1%, izolowany 5-FU zastosowany w trzech stężeniach 0,25 μ M; 0,5 μ M i 1 μ M , a także pary 5-FU+hydrolizat wełny MR4 w każdym ze stężeń, odpowiednio). Kontrola to nietraktowane żadnymi substancjami komórki raka kolczystokomórkowego SCC-25. Oś y przedstawia wartości absorbancji po 72 godzinach inkubacji. Na czerwono zaznaczono słupki z istotnymi statystycznie wartościami różnymi od grupy kontrolnej.

Po 72 godzinach inkubacji, dodanie diklofenaku w stężeniach 0,25 μ M; 0,5 μ M i 1 μ M odpowiednio do 0,25 μ M; 0,5 μ M i 1 μ M 5-FU powodowało statystycznie istotne zmniejszenie żywotności komórek SCC-25 w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Interakcja diklofenaku w stężeniu 0,5 μ M i 1 μ M z każdym stężeniem 5-fluorouracylu skutkowało hamowaniem proliferacji komórek SCC-25, ($p < 0,005$). Tylko najniższe stężenie diklofenaku (0,25 μ M) w połączeniu z 0,5 μ M i 1 μ M 5-FU osiągnęło się wyniki na poziomie istotności $p < 0,05$. Najwyższe stężenia 5-FU i diklofenaku w kombinacjach dwóch leków powodowały spadek żywotności komórek SCC o prawie 40% po 72 godz. inkubacji. Ponadto diklofenak wykazywał stabilny efekt obniżający żywotność komórek raka kolczystokomórkowego niezależnie od stężenia dodanego 5-FU (Ryc. 39).



Ryc. 39. Wpływ interakcji 5-fluorouracylu z diklofenakiem po 72 godzinach inkubacji. Kontrola to nietraktowane żadnymi substancjami komórki raka kolczystokomórkowego SCC-25. Oś x przedstawia zastosowane substancje (izolowany 5-FU zastosowany w trzech stężeniach 0,25 μ M; 0,5 μ M i 1 μ M, izolowany diklofenak w trzech stężeniach 0,25 μ M; 0,5 μ M i 1 μ M, a także pary 5-FU+diklofenak, w każdym ze stężeń, odpowiednio). Oś y przedstawia wartości absorbancji po 72 godzinach inkubacji. Na czerwono zaznaczono słupki z istotnymi statystycznie wartościami różnymi od grupy kontrolnej.

5.7. Podsumowanie otrzymanych wyników

Wyniki eksperymentów przeprowadzonych w niniejszej pracy wykazały zróżnicowany wpływ badanych hydrolizatów otrzymanych z wełny alpaki na komórki raka kolczystokomórkowego i prawidłowe keratynocyty.

Podsumowując otrzymane wyniki, można stwierdzić, że:

- hydrolizaty są rozpuszczalną mieszaniną białek i peptydów, z odsetkową ich zawartością od 66% do 85%;
- procentowe udziały pierwiastków oznaczonych w próbkach otrzymanych hydrolizatów z wełny alpaki wskazują na największą zawartość atomów węgla (C), tlenu (O) oraz chloru (Cl);

- zaobserwowano działanie antybakteryjne hydrolizatów z wełny alpaki w stosunku do Gram-dodatniej bakterii *Staphylococcus aureus* oraz Gram-ujemnej bakterii *Escherichia coli*. Lepsze właściwości antybakteryjne hydrolizatów zaobserwowano w stosunku do *E. coli*;
- komórki bakteryjne po inkubacji z wyizolowanymi hydrolizatami ulegały częściowej lizie, co można było zaobserwować jako pojawiające się dodatkowe sygnały na elektroferogramie. Potwierdzeniem były przeprowadzone pomiary potencjału zeta, który po inkubacji charakteryzował się niższymi wartościami;
- hydrolizaty otrzymane z wełny alpaki wykazują działanie obniżające żywotność komórek nowotworowych;
- hydrolizat MR4 po 24 godzinach inkubacji powodował spadek żywotności komórek linii SCC-25 i sHEK w sposób zależny od stężenia. Dodatek najwyższego stężenia hydrolizatu MR4 obniżał żywotność komórek SCC-25 o 67% w porównaniu do komórek kontrolnych. Dla komórek sHEK oraz HEKa spadek żywotności wyniósł odpowiednio 39% i 56%;
- najniższą aktywność biologiczną zaobserwowano dla hydrolizatu MR2;
- hydrolizaty wełny alpaki MR3 i MR4 wykazały największe zahamowanie migracji komórek w stosunku do badanej linii komórkowej SCC-25. Hydrolizat MR1 w stężeniu 0,01% po 72 godzinach inkubacji wykazywał brak wpływu na proces zmniejszania powierzchni rany porównywalny do kontroli;
- działanie obniżające żywotność komórek po zastosowaniu 5-fluorouracylu zaobserwowano dopiero po 72 godzinach inkubacji;
- skojarzone działanie 5-fluorouracylu z hydrolizatami wełny alpaki po 72 godzinnej inkubacji powodowało obniżenie żywotności komórek nowotworowych SCC-25 porównywalne do działania izolowanego 5-FU;
- skojarzone działanie niskich stężeń 5-fluorouracylu z najwyższym stężeniem diklofenaku (1 μ M) skutkowało większym obniżeniem żywotności komórek raka kolczystokomórkowego niż działanie izolowanego 5-FU.

6. DYSKUSJA

6.1. Właściwości fizykochemiczne hydrolizatów wełny

Produkcja zwierzęca na skalę światową powoduje powstawanie ogromnych ilości odpadów stałych, takich jak kości, skóra i surowce bogate w keratynę, w tym pióra, włosy, wełna. Prowadzone są badania nad przekształcaniem takich surowców w materiały nadające się do następnego użytku. Przetwarzanie wełny, piór i innych podobnych produktów w hydrolizaty białkowe może mieć znaczenie przemysłowe, handlowe oraz diagnostyczno-lecznicze [120].

Wełna składa się w 82% z „twardej” formy keratyny (α -keratyny) o wyjątkowej odporności na działanie substancji chemicznych i enzymów dzięki kształcie łańcucha polipeptydowego w przestrzeni podobnego do spirali, stabilizowanego wiązaniami wodorowymi i hydrofobowymi [121]. Ponadto, wewnątrzcząsteczkowe i międzycząsteczkowe wiązania cystynowe i mostki disiarczkowe są odpowiedzialne za jej powolną biodegradację oraz słabą rozpuszczalność.

Istnieje kilka metod rozpuszczenia keratyny, wśród nich należy wyszczególnić chemiczne (redukcja, utlenianie, hydroliza, etc.), fizyczne (eksplozja pary wodnej, obróbka wodą przegrzaną, promieniowanie mikrofalowe, etc.) oraz biologiczne (mikrobiologiczne i enzymatyczne) [118]. Uważa się, że metody enzymatyczne i mikrobiologiczne, w których stosuje się łagodniejsze warunki, pozwalają na zachowanie biologicznie aktywnych właściwości keratyny [122]. Chemiczna metoda z zastosowaniem stężonego roztworu alkalicznego, po wcześniejszym jego ogrzaniu, powoduje nieodwracalną hydrolizę keratyny poprzez rozerwanie wiązań peptydowych, pierwszorzędowych wiązań amidowych oraz cystynowych wiązań disiarczkowych. Rozpad tych wiązań prowadzi do powstania rozpuszczalnej frakcji oligopeptydowej i pozostałości stałej. Do ograniczeń metody należy potrzeba użycia dużych ilości odczynników alkalicznych, a także dużych ilości kwasów do neutralizacji i odsączenia rozpuszczonej frakcji keratynowej [116].

W niniejszej pracy korzystano z połączenia preaktywacji wełny alpaki za pomocą wodorotlenku sodu z następującą enzymatyczną hydrolizą substratu. Metoda ta została opracowana i opatentowana przez prof. Andrzeja W. Lipkowskiego [123,124]. Jest to metoda polegająca na wykorzystaniu naturalnego dla organizmu ludzkiego proteolitycznego enzymu - pepsyny, działającego na substrat mało agresywnie. Powszechnie przyjmuje się, że włosy i

sierść stanowią naturalną, fizyczną ochronę organizmu przed urazami mechanicznymi oraz ochronę termiczną przez znaczną różnicą temperatur. W naturze, zwierzęta wylizują i połykają sierść, która może ulegać częściowej degradacji w przewodzie pokarmowym, wydzielając w ten sposób odpowiednie fragmenty peptydowe. Na podstawie powyższych informacji, opisano i zastrzeżono zastosowanie aktywnych peptydów z włosów lub wełny w procesie gojenia ran, a co najważniejsze, opisano właściwości przeciwnowotworowe otrzymanych hydrolizatów [125].

W pierwszym etapie badań w niniejszej dysertacji analizowano właściwości fizykochemiczne hydrolizatów. Wyniki wykazały, że zawartość białek i peptydów w hydrolizatach wełny alpaki wynosiła od 66% do 85%. Według danych literaturowych, keratyna zawarta w wełnie sięga 95% jej całkowitej masy, podczas gdy zawartość keratyny we włosach ludzkich wynosi około 80% [116].

Analizę składu pierwiastkowego badanych hydrolizatów pochodzących z wełny alpaki przeprowadzono za pomocą spektroskopii rentgenowskiej z dyspersją energii (EDX). Największą zawartość procentową składowych hydrolizatów stanowił węgiel (66,79%), następnie w wartościach malejących tlen (17,47%), chlor (10,42%), sód (5,17%) oraz wapń (0,15%). Dla porównania, przeprowadzona przez Van Dyke i wsp. analiza elementarna keratynowej zasyпки wykazała, że największą zawartość zasyпки stanowił węgiel (38,39 – 41,59% procent wagowych (w/w)). Zawartość wodoru była na poziomie 5.74 – 6.16% w/w; zawartość azotu na poziomie 15,19 – 15,89% w/w, a zawartość tlenu i siarki wynosiła między 23,67% a 26,97% w/w i 3,80% a 4,78% w/w, odpowiednio. Autorzy opatentowali zastosowanie keratynowej zasyпки jako opatrunku, który poprawia gojenie ran w wyniku uwalniania rozpuszczalnych w wodzie peptydów keratynowych do środowiska rany [126].

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że hydrolizaty z wełny alpaki stanowiły niejednorodną mieszkankę białawej sproszkowanej substancji, różniące się składem chemicznym i zawartością białka w zależności od preparatu. Początkowe trudności z rozpuszczalnością otrzymanych preparatów rozwiązano poprzez zastosowanie 10% wodnego roztworu DMSO. Problem ten jest wprost powiązany ze strukturą trudno rozpuszczalnych keratyn. W odniesieniu do światowej literatury, zastosowana w niniejszej pracy metoda rozpuszczenia keratyny pochodzącej z wełny, polegająca na dwustopniowym niszczeniu jej struktury, jest metodą uznaną i skutecznie stosowaną [116, 118, 122].

6.2. Działanie przeciwbakteryjne hydrolizatów wełny

Bioaktywne peptydy to związki występujące w produktach naturalnych pochodzących z różnych źródeł lub mogące być również syntetyzowane. Biologicznie aktywne peptydy mają wiele właściwości, w tym wykazują m.in. działanie przeciwnadciśnieniowe, antyoksydacyjne, przeciwbakteryjne czy przeciwzakrzepowe [127-129].

Niektóre peptydy o właściwościach antybakteryjnych oddziałują poprzez aktywację procesów immunomodulujących prowadzących do apoptozy komórek bakteryjnych. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa peptydów jest związana z ich właściwościami fizykochemicznymi, a także z liczbą i rodzajem aminokwasów [131, 132]. Właściwości fizykochemiczne peptydów, takie jak ich rozmiar, ładunek, hydrofobowość, rozpuszczalność, mają kluczowe znaczenie dla ich właściwości przeciwdrobnoustrojowych [132, 133]. Większość bioaktywnych peptydów cechuje się wysoką zawartością reszt cysteinowych lub glicynowych, a także posiada mostki disiarczkowe, które powstają między resztami cysteinowymi, zwiększając stabilność struktury tych białek. Większość z nich zawiera aminokwasy dodatnio naładowane, a także domeny hydrofobowe [130, 134].

Ponieważ szybki wzrost liczby bakteryjnych zakażeń lekoopornych stanowi wyzwanie dla konwencjonalnych terapii przeciwdrobnoustrojowych, istnieje potrzeba opracowania alternatywnych preparatów antybakteryjnych. W odróżnieniu od tradycyjnych antybiotyków, niektóre peptydy posiadające działanie antybakteryjne mają tę zaletę, że nie powodują oporności na leki oraz cechują się mniejszym spektrum działań niepożądanych. Z danych literaturowych wynika, że najbardziej poznany potencjał antybakteryjny wśród peptydów pochodzenia naturalnego wykazują peptydy wyizolowane z roślin [130, 135]. Hydrolizaty białek roślinnych, takich jak nasiona chia, rośliny strączkowe, ryż itd. stanowią opcję dla produkcji bioaktywnych peptydów [130]. Również peptydy pochodzenia zwierzęcego posiadają potencjał hamujący wzrost bakterii [137-139]. W badaniach Wu i wsp. udowodniono działanie antybakteryjne wywołane przez kilka gatunków morskich bezkręgowców [139]. Tran i wsp. w swojej pracy oceniającej działanie mieszaniny zawierającej celulozę oraz keratynę pochodzącą z trzech niezależnych źródeł (wełna, włosy i kurze pióra) przedstawili dwie zależności wyników. Wełna cechująca się największą zawartością α -keratyny, wykazała najsłabszą wytrzymałość mechaniczną, a pióra najsilniejszą. Drugą zależność wykazano pomiędzy strukturą drugorzędową peptydów zawartych w wełnie, włosach i piórach kurzych a przeciwbakteryjnymi właściwościami tych kompozytów wobec bakterii Gram-ujemnych (*E. coli*, *P. aeruginosa*) i Gram-dodatnich (*S. aureus*, *MRSA*, *VRE*). Różne rodzaje kompozytów

([włosy + celuloza], [pióra + celuloza] i [wełna + celuloza]) o różnych stężeniach (40:60, 65:35, 75:25 i 80:20 wełny, włosów lub piór i celulozy) oceniano hodując bakterie w obecności kompozytów przez 24 godziny, a następnie wysiewano je na płytki z agarem odżywcym. Liczbę kolonii powstałych po całonocnej inkubacji porównywano z kontrolą. Uwidoczniono, że wszystkie trzy kompozyty ([włosy + celuloza], [pióra + celuloza] i [wełna + celuloza]) nie zaprezentowały aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec *E. coli*, *S. aureus* i *VRE*. Natomiast wszystkie trzy kompozyty wykazały pewną aktywność przeciwbakteryjną wobec *MRSA*. Działanie bakteriobójcze było najsilniejsze w przypadku piór, następnie włosów, a najsłabsze w przypadku wełny. Autorzy tej pracy zasugerowali, że wełna o najwyższej zawartości α -keratyny ma bardziej uformowaną strukturę, co w pewnym stopniu ogranicza jej zdolność do oddziaływania z bakteriami. W konsekwencji ma ona najniższą aktywność przeciwdrobnoustrojową. Włosy, których struktura znajduje się pośrodku pomiędzy piórami i wełną, mają średni zakres działania przeciwdrobnoustrojowego [140].

Zdolność odzieży wełnianej do ograniczania gromadzenia się nieprzyjemnego zapachu, który powstaje w wyniku aktywności mikroorganizmów kolonizujących skórę, daje przesłanki sądzić, że wełna bez dodatkowych substancji może sama w sobie wykazywać właściwości przeciwbakteryjne [141]. Ivankovic i wsp. w marcu 2022 roku opublikowali wyniki eksperymentalnych badań, gdzie umieszczali bakterie na włóknach wełny i inkubowali je na płytkach agarowych. Kiedy próbka zawierająca wełnę została usunięta z powierzchni agaru odżywczego, komórki w formie biofilmu pozostały przyłączone do włókien wełny. Autorzy tej pracy obrazując próbki tekstyliów za pomocą mikrotomografii rentgenowskiej, wywnioskowali, że stopień przylegania bakterii do substratu może zależeć od topografii powierzchni. Wyniki wskazały, że wełna może prezentować właściwości przeciwbakteryjne w mechanizmie usuwania nadmiaru bakterii, które przyczepiają się do porowatej struktury włókien wełny. W pracy tej nie potwierdzono aktywności bakteriobójczej lub bakteriostatycznej w zakresie inaktywacji lub uśmiercania komórek bakteryjnych w kontakcie z wełną [142].

W niniejszej pracy oceniono działanie antybakteryjne hydrolizatów otrzymanych z wełny alpaki w stosunku do Gram-dodatniej bakterii *S. aureus* oraz Gram-ujemnej bakterii *E. coli*. Początkowo użyto metody dyfuzji w studni agarowej uzyskując różnej wielkości strefy zahamowania wzrostu bakterii traktowanych hydrolizatami. Hydrolizaty spowodowały powstanie większej strefy zahamowania wobec Gram-ujemnej bakterii *E. coli*. Kontynuując dalszą analizę posiadania przez badane hydrolizaty wełny alpaki właściwości

przeciwbakteryjnych, wykonano analizę elektroforetyczną oraz pomiary potencjału zeta. Mechanizm działania przeciwbakteryjnego peptydów polega na ich wiązaniu się z ścianami komórkowymi bakterii. Mechanizm ten opiera się na elektrostatycznym oddziaływaniu między dodatnio naładowanymi peptydami a ujemnie naładowaną powierzchnią ściany komórkowej bakterii, co powoduje w konsekwencji niszczenie struktury komórki [130, 134]. Wiadomo, że zewnętrzną ścianę komórkową bakterii Gram-ujemnych, np. *E. coli*, otacza warstwa lipopolisacharydu o grubości 1-3 pm, podczas gdy na powierzchni ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich, takich jak *S. aureus*, znajdują się kowalencyjnie związane kwas teichojowy, kwas teichuronowy i białka. W związku z tym należy się spodziewać znacznych różnic w zachowaniu elektroforetycznym i potencjale zeta. Parametry te są bardzo ważne w wykrywaniu zmian fizycznych w komórkach bakteryjnych i stają się nowoczesnym narzędziem diagnostycznym do określania ich cech fenotypowych. Gronkowiec złocisty posiada wiele warstw mureiny w swojej ścianie komórkowej, tworząc symetryczne drobne kule, których ładunek jest na tyle niewielki, że komórki się od siebie odpychają, tym samym tworząc mniej stabilne aglomeraty. Co za tym idzie, na elektroferogramie obecna jest duża ilość niewielkich sygnałów charakterystyczna dla *S. aureus*. Dodatkowo pomiar szerokości sygnałów dla obydwu bakterii świadczy o tym, że komórki *S. aureus* migrują znacznie szybciej - jako małe pojedyncze bądź połączone w skupiska klastry.

Dodanie hydrolizatów wełny MR1 i MR4 do zawiesiny bakteryjnej spowodowało znaczącą zmianę profilu potencjału zeta w kierunku bardziej pozytywnych wartości. Jak wspomniano na początku tego rozdziału białka aktywne, wchodzące w skład hydrolizatów wełny, posiadają dodatnie naładowany potencjał na powierzchni. Wydaje się być możliwe, że wchodzi on w interakcje z cząsteczkami znajdującymi się na ujemnie naładowanej powierzchni błony komórkowej bakterii, doprowadzając tym samym do jej destabilizacji i rozpadu.

Ważne też jest zrozumienie roli bakterii w procesie konwersji stanu przedrakowego, którym jest rogowacenie słoneczne, do postaci raka kolczystokomórkowego skóry. Z danych literaturowych wynika, że rola mikrobioty skóry w progresji rogowacenia słonecznego do raka kolczystokomórkowego skóry nie jest do końca poznana. Wood i wsp. przeprowadzili badanie kohortowe na grupie 13 immunokompetentnych mężczyzn z czynnikami ryzyka SCC [143]. Wyniki pracy wykazały, że takie drobnoustroje jak *Propionibacterium* sp. i *Malassezia* sp. występowały stosunkowo częściej na fotouszkodzonej skórze bez zmian przed- i nowotworowych skóry, niż na skórze zmienionej przez AK i SCC. Gronkowiec złocisty był wykrywany w 112 badanych ogniskach rogowacenia słonecznego. Ponadto, spośród 11

jednostek taksonomicznych podobnych do *S. aureus*, sześć było istotnie związanych ze zmianami SCC u siedmiu badanych, co sugeruje ich specyficzny udział w progresji AK do SCC. Jeśli istnieje związek przyczynowy między niektórymi bakteriami podobnymi do *S. aureus* a etiologią SCC, to w celu zmniejszenia liczby SCC można by zastosować metody terapeutyczne ukierunkowane na te bakterie. W mojej pracy doktorskiej uzyskano wyniki wskazujące na wyraźne działanie przeciwbakteryjne wobec bakterii *S. aureus* wywierane jedynie przez hydrolizat MR3. Pozostałe hydrolizaty otrzymane z wełny alpaki wykazały działanie przeciwbakteryjne w stosunku do bakterii *E. coli*. *E. coli* jest jedną z bakterii oportunistycznych powodujących nadkażenie ran. Przy czym komórki odpornościowe nie są w stanie przeniknąć przez biofilm utworzony na powierzchni tych ran, co nasila odczyn zapalny i utrudnia gojenie rany. Wydaje się być możliwe zastosowanie hydrolizatów otrzymywanych z wełny alpaki w preparatach miejscowych w celu ograniczenia rozprzestrzenienia się stanu zapalnego i szybszego procesu gojenia uszkodzonej skóry.

6.3. Wpływ hydrolizatów z wełny alpaki na komórki

Badając aktywność biologiczną preparatów otrzymanych w wyniku połączenia chemicznej aktywacji i enzymatycznego trawienia wełny, okazało się, że preparaty te wykazują aktywność przeciwnowotworową wobec nowotworów o różnej etiologii [125]. Postawiono hipotezę, że preparaty peptydowe otrzymane w wyniku odpowiedniego enzymatycznego trawienia wełny mogą być stosowane jako składniki aktywne w leczeniu lub profilaktyce nowotworów skóry.

6.3.1. Wpływ hydrolizatów na żywotność komórek raka kolczystokomórkowego oraz na prawidłowe keratynocyty

Wiele preparatów pochodzenia naturalnego wykazuje właściwości przeciwnowotworowe. Przykładowo, lignany roślinne stanowią grupę polifenoli, które hamują proliferację i indukują śmierć komórek nowotworowych, przy minimalnej toksyczności w stosunku do komórek prawidłowych [144, 145]. Jeden z polifenoli o właściwościach przeciwnowotworowych - magnolol, w badaniach indukował apoptozę poprzez aktywację zarówno mitochondrialnego, jak i receptorowego szlaku śmierci w komórkach czerniaka [146].

Ze względu na dużą zawartość ujemnie naładowanych cząsteczek w błonie komórek nowotworowych, są one bardziej podatne na interakcje z dodatnio naładowanymi peptydami,

co prowadzi do zaburzeń struktury i ciągłości błony komórkowej. Peptydy przeciwnowotworowe mają różne właściwości blokujące funkcje komórek, w tym wchodzi w interakcje z receptorami błony komórkowej, modulują adhezję komórek poprzez interakcje z białkami macierzy pozakomórkowej, hamują kinazy białkowe i proteazy, a także wpływają na aktywność antyangiogenną [18].

W eksperymentach przeprowadzonych przez Markowicza i wsp., hydrolizaty włosów ludzkich wykazały działanie przeciwnowotworowe w stosunku do komórek czerniaka [18]. Do badań użyto włosów pochodzących od zdrowych ochotników (kobiety i mężczyźni), które nie były wcześniej modyfikowane chemicznie. Hydrolizaty te otrzymano zgodnie z metodą opracowaną i opatentowaną przez prof. Andrzeja W. Lipkowskiego [125]. Badanie przeprowadzono na kilku liniach komórkowych, między innymi na liniach komórkowych czerniaka, raka pęcherza moczowego oraz zdrowych fibroblastach. Wykazano, że największe zahamowanie proliferacji kilku linii komórkowych czerniaka (we wczesnych oraz późnych pasażach) obserwowano po zastosowaniu hydrolizatów włosów ludzkich w stężeniu procentowym (wagowo-objętościowym) równym 0,1 ($p < 0,01$) [18]. Stwierdzono spadek żywotności prawidłowych fibroblastów traktowanych badanymi hydrolizatami i wykazano, że obniżenie żywotności komórek było zależne od rodzaju hydrolizatu oraz poszczególnych linii komórkowych fibroblastów.

Odnosząc się do wyników pracy Markowicz i wsp., hydrolizaty z wełny alpaki otrzymane w identyczny sposób, również wykazały działanie antyproliferacyjne w stosunku do komórek nowotworowych – linii raka kolczystokomórkowego, przy czym hydrolizat MR4 charakteryzował się najsilniejszym działaniem. Działanie w stosunku do prawidłowych keratynocytów było mniej toksyczne niż wobec komórek rakowych (żywotność prawidłowych keratynocytów spadała do około 50%). Po 24 godzinnej inkubacji najsilniej działający hydrolizat MR4 spowodował obniżenie żywotności komórek raka kolczystokomórkowego do 70% w stosunku do komórek kontrolnych. Z uwagi na największe obniżenie żywotności komórek raka kolczystokomórkowego przez hydrolizat MR4 zawierający największą ilość białek i peptydów, można przypuszczać, że efekt działania antynowotworowego jest wprost proporcjonalny do ilości zawartych w hydrolizatach białek i peptydów.

Istnieje prawdopodobieństwo, że hydrolizaty zawierają spektrum różnie działających peptydów, w tym nie wykluczone jest, że mogą to być działania przeciwstawne. Hydrolizaty włosów ludzkich wpływały na proliferację komórek nowotworowych, ale mogły również regulować proliferację fibroblastów [18]. Sugeruje to, że produkty degradacji włosów lub

wełny mogą wpływać na proliferację fibroblastów związanych z tkanką guza nowotworowego, zaangażowanych w podtrzymanie mikrośrodowiska nowotworu, ale także na proliferację prawidłowych fibroblastów biorących udział w procesie normalnej regeneracji. Na podstawie danych literaturowych i wyników własnych, nie można jednoznacznie stwierdzić, czy oczyszczone aktywne składniki przeciwnowotworowe hydrolizatu w wyższych stężeniach są bezpośrednio cytotoksyczne dla komórek nowotworowych. Zaobserwowano, że peptydowe defensyny uwalniane przez granulocyty mogą przyczyniać się do cytotoksyczności zewnątrzkomórkowej wobec różnych nowotworów, ale są wyraźnie hamowane przez albuminy i inne wielkocząsteczkowe składniki surowicy [18]. Należy także uwzględnić fakt, że działanie antyproliferacyjne hydrolizatów na komórki keratynocytów badano z użyciem płodowej surowicy cielęcej (FBS), zgodnie z wymaganiami producenta linii komórkowych. Nie można więc wykluczyć, że FBS mogła częściowo neutralizować działanie hydrolizatów.

W niniejszej dysertacji podjęto próbę weryfikacji hipotezy, że produkty biodegradacji wełny alpaki mogą brać udział w naturalnej ochronie przed nowotworami powstającymi na skórze narażonej na działanie kancerogennych czynników środowiskowych. Rozpuszczalna mieszanina białek i peptydów otrzymana w procesie trawienia enzymatycznego wełny alpaki obniżała żywotność komórek raka koleczystokomórkowego *in vitro*.

6.3.2. Wpływ hydrolizatów na migrację komórek raka koleczystokomórkowego

Migracja komórek jest ważnym procesem, który wpływa na wiele aspektów fizjologicznych. W procesie gojenia ran migracja ułatwia ponowne naskórkowanie uszkodzonej skóry, a zdolność migracji komórek rakowych w przypadku guzów nowotworowych jest kluczowym etapem tworzenia przerzutów [148].

Test rysy (ang. *scratch assay*) jest powszechnie stosowanym doświadczeniem oceniającym różne czynniki wpływające na procesy patofizjologiczne nowotworów, w tym SCC [149,150]. Prowadząc badania nad kilkoma liniami komórkowymi SCC o różnym stopniu złośliwości, Moilanen i wsp. stwierdzili, że pozbawienie komórek kolagenu XVII zaburza migrację komórek linii SCC-25 [150]. Wyniki badań migracji sugerują, że kolagen XVII ma wpływ na rozwój raka koleczystokomórkowego.

Przeprowadzone badania niniejszej dysertacji pozwoliły zauważyć zależność wpływu migracji komórek rakowych od czasu inkubacji oraz stężenia badanych hydrolizatów. Tempo migracji komórek poddanych działaniu hydrolizatów było wolniejsze w porównaniu z komórkami nowotworowymi nietraktowanymi żadnymi substancjami. Najniższe zastosowane stężenie hydrolizatów MR3 i MR4 w pierwszej dobie inkubacji nieznacznie hamowało migrację komórek SCC-25. Po 72 godzinach inkubacji powierzchnia rasy w przypadku komórek poddanych działaniu każdego z hydrolizatów zmniejszyła się o prawie połowę w porównaniu do powierzchni rasy w czasie początkowym. Każdy z badanych hydrolizatów w stężeniu 0,05% w czasie ponad 48-godzinnej inkubacji istotnie statystycznie hamował migrację komórek lepiej niż hydrolizat w mniejszym stężeniu 0,01%. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że zastosowanie wyższych stężeń hydrolizatów podczas wydłużonej inkubacji znacząco hamuje migrację komórek rakowych.

Z klinicznego punktu widzenia zastosowanie hydrolizatów wełny alpaki mogłoby przyczynić się do zmniejszenia ryzyka naciekania i przerzutowania SCC poprzez hamowanie migracji komórek rakowych. Potrzebne są dalsze badania nad potencjalnymi czynnikami mogącymi hamować migrację komórek SCC, szczególnie pod wpływem działania hydrolizatów wełny.

6.4. Wpływ interakcji 5-fluorouracylu z hydrolizatami wełny alpaki oraz 5-fluorouracylu z diklofenakiem na komórki raka kolczystokomórkowego

5-fluorouracyl, stosowany samodzielnie lub w połączeniu z innymi lekami, jest szeroko stosowany w leczeniu różnych guzów nowotworowych. 5-FU ma jednak ograniczoną skuteczność przeciwnowotworową z powodu oporności wielolekowej i cytotoksyczności ograniczającej jego dawkę. Ekspresja niektórych genów w komórkach nowotworowych, takich jak jądrowy czynnik kappa B (NF kB), receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1 R), receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), cyklooksygenaza-2 (COX-2) są związane z chemoodpornością i wrażliwością komórek nowotworowych na 5-FU. W przypadku długotrwałej ekspozycji na 5-FU, obserwuje się zwiększenie lub zmniejszenie ekspresji powyższych genów. Przykładowo, stwierdzono, że substancja pochodzenia naturalnego, jaką jest kurkumina, jest w stanie regulować te procesy [152]. W innym badaniu nie zaobserwowano, żeby kurkumina przyjmowana przez pacjentów jako składnik diety lub w postaci suplementów diety, powodowała zmniejszenie skuteczności 5-FU [153].

Dobre efekty kliniczne współdziałania 5-FU z kwasem salicylowym w terapii miejscowej uzyskano w leczeniu stanów przedrakowych tj. rogowacenia słonecznego [154]. Przeprowadzono retrospektywne badanie w celu porównania wyników trzech różnych terapii miejscowych u pacjentów z pojedynczym ogniskiem AK. Była to krioterapia, laser CO₂ i połączenie 0,5% 5-fluorouracylu z 10% kwasem salicylowym. Do badania włączono 72 pacjentów. Wszystkie metody doprowadziły do znacznego zmniejszenia średniej średnicy AK. Ból odczuwany przez pacjentów był istotnie mniejszy po zastosowaniu 0,5% 5-FU z 10% kwasem salicylowym niż po innych zabiegach. Działania niepożądane w postaci wystąpienia rumienia i/lub strupów rozkładały się podobnie w trzech grupach. Wyniki estetyczne były najlepsze w grupie 5-FU z kwasem salicylowym, oceniane zarówno przez pacjentów, jak i przez osobę wykonującą zabieg.

Biorąc pod uwagę dane literaturowe, w niniejszej pracy doktorskiej postawiono za cel ocenę interakcji 5-fluorouracylu z hydrolizatami wełny alpaki, a także 5-fluorouracylu z diklofenakiem, w stosunku do komórek raka kolczystokomórkowego. Do pierwszych obserwacji należała zależność efektu działania izolowanego 5-FU od czasu inkubacji. 5-FU powodował istotną redukcję żywotności komórek nowotworowych dopiero po 72 godzinach inkubacji. Słaba aktywność 5-FU po 24 godz. inkubacji może wynikać z mechanizmu działania, a także z charakterystyki linii komórkowej. 5-FU należy do analogów pirymidyn, a jego działanie jest ograniczone do fazy S cyklu komórkowego. Biorąc pod uwagę czas podwojenia populacji komórek SCC-25, który wynosi ok 50 godz. [151], istotne zahamowanie proliferacji może być obserwowane nawet po 72 godz. ekspozycji na 5-FU. Działaniu 5-FU poddają się komórki syntetyzujące kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA). Ponadto, 5-FU charakteryzuje się liniową zależnością odpowiedzi komórkowej od dawki. Kluczowy mechanizm blokowania syntezy DNA (hamowanie aktywności syntetazy tymidylowej) powoduje, że komórki wytwarzające DNA, znajdujące się w fazie S cyklu komórkowego, są szczególnie wrażliwe na ten lek. Z drugiej strony inne mechanizmy, takie jak wbudowywanie metabolitów 5-FU do kwasu rybonukleinowego (RNA) i w konsekwencji hamowanie syntezy białek czy też produkcja dużej ilości reaktywnych form tlenu, mogą być odpowiedzialne za obserwowaną liniową zależność odpowiedzi od dawki [155].

Początkowo sprawdzono interakcje 5-fluorouracylu z dwoma hydrolizatami wełny alpaki – 5-FU z MR3 oraz 5-FU z MR4. Jak przedstawiono w rozdziale 5, hydrolizaty te charakteryzują się właściwościami obniżającymi żywotność rakowych komórek SCC, a także dobrą bioaktywnością i umiarkowaną toksycznością wobec prawidłowych keratynocytów. Z uwagi

na późniejsze efekty rozpoczęcia oddziaływania między substancjami, wyniki przedstawiono dopiero po 72 godzinach inkubacji. Okazało się, że nie odnotowano wzmagania działania antyproliferacyjnego 5-fluorouracylu w połączeniu z hydrolizatem wełny alpaki. Wyniki wykazały wyższe wartości absorbancji dla komórek SCC-25 traktowanych samym hydrolizatem wełny alpaki MR3 czy MR4, co może być skutkiem zaburzonego odczytu przez aparat dołków z gęstą zawiesiną hydrolizatu pokrywającego powierzchnię komórek. Największe istotne statystycznie obniżenie żywotności komórek nowotworowych uzyskano po zastosowaniu najniższego stężenia hydrolizatu (0,25%) z najwyższym stężeniem 5-fluorouracylu (1 μ M). Skojarzone działanie hydrolizatów wełny alpaki MR3 czy MR4 w stężeniach 0,25% i 0,5% z każdym zastosowanym w pracy stężeniem 5-fluorouracylu zaprezentowało wartości absorbancji niższe od kontroli (komórek nietraktowanych żadną substancją). Nie uwidoczniło addytywnego efektu działania antyproliferacyjnego wobec SCC-25 przy skojarzonym działaniu najwyższego stężenia hydrolizatu wełny alpaki (1%) z każdym ze stężeń 5-fluorouracylu. Można zatem wnioskować, że zmodyfikowanie sposobu oczyszczenia i hydrolizy wełny alpaki mogłoby skutkować większym obniżeniem żywotności komórek raka kolczystokomórkowego skóry, w monoterapii czy interakcji lekowej.

W następnym etapie pracy badano interakcje 5-fluorouracylu z diklofenakiem, który już po 24 godzinach inkubacji samodzielnie spowodował istotny statystycznie spadek żywotności komórek raka kolczystokomórkowego. Diklofenak jest inhibitorem COX-2 i ten mechanizm znalazł zastosowanie w leczeniu i profilaktyce wielu nowotworów. Każde z zastosowanych stężeń diklofenaku w połączeniu z 5-FU skutkowało niższymi wynikami absorbancji w porównaniu do izolowanego zastosowania 5-fluorouracylu. Po 72 godzinach inkubacji współoddziałujących leków największy efekt antyproliferacyjny uzyskano przy łączonym działaniu każdego ze stężeń 5-FU z najwyższym stężeniem diklofenaku.

Mechanizm działania współczesnych miejscowych leków przeciwnowotworowych polega na unicestwieniu komórek transformowanych wieloetapowym procesem kancerogenezy. Nierzadkie są sytuacje, kiedy odczyn zapalny wokół i w obrębie traktowanej takimi lekami zmianie skórnej jest nasilony – objawia się to rumieniem, obrzękiem, sączeniem, a czasami towarzyszącym nadkażeniem bakteryjnym martwiczo zmienionej tkanki. Hydrolizaty wełny alpaki posiadające działanie przeciwnowotworowe, a także przeciwbakteryjne, mogą być dodatkiem do stosowanych aktualnie leków miejscowych, aby zminimalizować odczyn zapalny i ryzyko wtórnego nadkażenia bakteryjnego na leczonym obszarze.

7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Niniejsza praca doktorska opisuje wybrane właściwości fizykochemiczne i biologiczne hydrolizatów otrzymanych z wełny alpaki oraz działanie referencyjnych substancji stosowanych w leczeniu SCC i AK (takich jak 5-fluorouracyl i diklofenak). Przeprowadzone badania wykazały, że:

1. Otrzymane hydrolizaty stanowią heterogenną mieszaninę białek i peptydów.
2. Hydrolizaty z wełny alpaki wykazują właściwości przeciwbakteryjne, z większą aktywnością w stosunku do Gram-ujemnej bakterii *E. coli* niż Gram-dodatniej bakterii *S. aureus*.
3. Aktywność hydrolizatów wełny alpaki wobec komórek nowotworowych i prawidłowych keratynocytów była zależna od stężenia i czasu ekspozycji.
4. Spośród badanych związków, hydrolizaty wełny alpaki MR1 i MR4 charakteryzowały się najlepszymi właściwościami obniżającymi żywotność komórek raka koleczystokomórkowego. Wykazały one również mniejszą toksyczność wobec prawidłowych keratynocytów.
5. Hydrolizaty pozyskane z wełny alpaki spowalniały migrację komórek raka koleczystokomórkowego.
6. Interakcja 5-fluorouracylu z hydrolizatami wełny z alpaki nie wykazała wzmożonego efektu obniżającego żywotność komórek raka koleczystokomórkowego.
7. Można przypuszczać, że dodatek diklofenaku do niskiego stężenia 5-fluorouracylu może skutkować zminimalizowaniem wystąpienia działań niepożądanych chemioterapeutyku przy równej skuteczności przeciwnowotworowej. Efekt takiej interakcji może mieć pozytywne skutki dla pacjenta stosującego preparat miejscowy.
8. Potrzebne są dodatkowe badania w celu dokładniejszej charakterystyki wyizolowanych hydrolizatów z wełny alpaki i ich działania przeciwnowotworowego.

Innowacyjność prezentowanej pracy doktorskiej polega na tym, że po raz pierwszy zbadano i wykazano działanie hydrolizatów wełny alpaki obniżające żywotność komórek raka koleczystokomórkowego. W dotychczasowych danych literaturowych nie opisywano takiego działania. Nie wykluczone, że dalsze eksperymenty pozwoliłyby na zbadanie innych właściwości hydrolizatów wełny alpaki oraz przybliżyły możliwość ich ewentualnego

wykorzystania w preparatach miejscowych w celu prewencji progresji stransformowanych keratynocytów w rogowaceniu słonecznym czy raku kolczystokomórkowym skóry *in situ*.

8. LITERATURA

1. Rutkowski P., Owczarek W., Nejc D., et al. Skin carcinomas. *Oncol Clin Pract.* 2018, 14:129-147.
2. Lesiak A., Czuwara J., Kamińska-Winciorek G., et al. Squamous cell carcinoma and merkel-cell carcinoma. diagnostic and therapeutic recommendations of the polish dermatological society. *Dermatology review/przegląd dermatologiczny.* 2019;106(2):127-149.
3. Schmultz C., Blitzblau R., Aasi S., et al. NCCN Guidelines® Insights: Squamous Cell Skin Cancer, Version 1.2022. *J Natl Compr Canc Netw.* 2021 Dec;19(12):1382-1394.
4. Stonesifer C. J., Djavaid A.R., Grimes J.M., et al. Immune Checkpoint Inhibition in Non-Melanoma Skin Cancer: A Review of Current Evidence. *Review Front Oncol.* 2021 Dec 20;11:734354.
5. Babalola F., Moattari C., Berman B., et al. 2020 IDEOM Annual Meeting: Actinic Keratosis Stakeholders Survey Identifies Gaps in Research and Care. *J Drugs Dermatol.* 2022 Feb 1;21(2):128-134.
6. Alves-Silva J.M., Romane, A., Efferth, T., et al. North African medicinal plants traditionally used in cancer therapy. *Front. Pharmacol.* 2017, 8: 1–24.
7. Tariq A., Sadia S., Pan K., et al. A systematic review on ethnomedicines of anticancer plants. *Phytother. Res.* 2017, 31: 202–264.
8. Dehelean C.A., Marcovici I., Soica C., et al. Plant-Derived Anticancer Compounds as New Perspectives in Drug Discovery and Alternative Therapy. *Molecules* 2021, 26, 1109.
9. Leśków A., Tarnowska M., Szczuka I., et al. The effect of biologically active compounds in the mucus of slugs *Limax maximus* and *Arion rufus* on human skin cells. *Sci Rep.* 2021 Sep 21;11(1):18660.
10. Pilut C.N., Manea A., Macaso I., et al. Comparative Evaluation of the Potential Antitumor of *Helleborus purpurascens* in Skin and Breast Cancer. *Plants* 2022, 11, 194.
11. Newman D.J., Cragg G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 2016, 79: 629–661.
12. Penta D., Somashekar B.S., Meeran S.M. Epigenetics of skin cancer: Interventions by selected bioactive phytochemicals. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 2018, 34: 42–49.
13. Iqbal J., Abbasi B.A., Ahmad R., et al. Potential phytochemicals in the fight against skin cancer: Current landscape and future perspectives. *Biomed. Pharmacother.* 2019, 109: 1381–1393.
14. Konop M., Rybka M., Drapała A. Keratin Biomaterials in Skin Wound Healing, an Old Player in Modern Medicine: A Mini Review. *Pharmaceutics.* 2021 Nov 28;13(12):2029.
15. Fontoura R., Daroit D., Corrêa A.P.F., et al. Characterization of a novel antioxidant peptide from feather keratin hydrolysates. *N Biotechnol.* 2019 Mar 25;49:71-76.
16. Jeampakdee P., Puthong S., Srimongkol P., et al. The apoptotic and free radical-scavenging abilities of the protein hydrolysate obtained from chicken feather meal. *Poult Sci.* 2020 Mar; 99(3): 1693–1704.
17. Han W., Hu Ch., Zhao-Jun Fan., Guo-Liang Shen. Transcript levels of keratin 1/5/6/14/15/16/17 as potential prognostic indicators in melanoma patients. *Sci Rep.* 2021; 11: 1023.
18. Markowicz S., Matalinska J., Kurzepa K., et al. Anticancer properties of peptide fragments of hair proteins. *PLoS One.* 2014 Jun 10;9(6):e98073.

19. Damps T., Laskowska AK., Kowalkowski T., et al. The effect of wool hydrolysates on squamous cell carcinoma cells in vitro. Possible implications for cancer treatment. *PLoS One*. 2017 Aug 31;12(8):e0184034.
20. Yueyao Li , Wen-Qing Li , Tricia Li., et al. Eye color and the risk of skin cancer. *Cancer Causes Control*. 2022 Jan;33(1):109-116.
21. Calzavara-Pinton P., Calzavara-Pinton I., Rovati C., et al. Topical Pharmacotherapy for Actinic Keratoses in Older Adults. *Drugs & Aging* (2022) 39:143–152.
22. Baker C., James A., Supranowicz M., et al. Method of Assessing Skin Cancerisation and Keratoses (MASCK™): Development and Photographic Validation in multiple anatomical sites of a Novel Assessment Tool Intended for Clinical Evaluation of Patients with Extensive Skin Field Cancerisation. *Clin Exp Dermatol*. 2022 Feb 12. doi: 10.1111/ced.15136. Online ahead of print.
23. Morton CA, Szeimies RM, Basset-Séguin N, et al. European Dermatology Forum guidelines on topical photodynamic therapy 2019 Part 2: emerging indications: field cancerization, photorejuvenation and inflammatory/infective dermatoses. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020;34:17–29.
24. Ratushny V., Gober MD., Hick R., et al. From keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Invest*. 2012;122:464–72.
25. Seebode C., Lehmann J., Emmert S. Photocarcinogenesis and Skin Cancer Prevention Strategies. *Anticancer Res*. 2016 Mar; 36(3):1371-8.
26. Crowson A.N., Magro C.M., Mihm M.C.: Squamous cell carcinoma and its precursors. In: A.N. Crowson, C. Magro, M.C. Mihm Jr (eds.). *Biopsy Interpretation of the Skin: Primary Non-Lymphoid Cutaneous Neoplasia*. Lippincott WilliamsWilkins, Philadelphia, 2010, 288-339.
27. Kolev V., Mandinova A., Guinea-Viniegra J., et al. EGFR signalling as a negative regulator of Notch1 gene transcription and function in proliferating keratinocytes and cancer. *Nat Cell Biol*. 2008;10(8):902–911.
28. Zhao L., Li W., Marshall C., et al. Srcasm inhibits Fyn-induced cutaneous carcinogenesis with modulation of Notch1 and p53. *Cancer Res*. 2009;69(24):9439–9447.
29. Toll A., Salgado R., Yébenes M., et al. MYC gene numerical aberrations in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2009;161(5):1112–1118.
30. Toll A., Salgado R., Yébenes M., et al. Epidermal growth factor receptor gene numerical aberrations are frequent events in actinic keratoses and invasive cutaneous squamous cell carcinomas. *Exp Dermatol*. 2010;19(2):151–153.
31. Jiang W., Ananthaswamy HN., Muller HK., Kripke ML. p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene*. 1999;18(29):4247–4253.
32. Ruini C., Schuh S., Gust C., et al. In-Vivo LC-OCT Evaluation of the Downward Proliferation Pattern of Keratinocytes in Actinic Keratosis in Comparison with Histology: First Impressions from a Pilot Study. *Cancers* 2021, 13, 2856.
33. Schmitz L., Oster-Schmidt C., Stockfleth E. Nonmelanoma skin cancer – from actinic keratosis to cutaneous squamous cell carcinoma. *JDDG* 16 (2018) 1002–1013.
34. Pandeya N., Olsen CM., Whiteman DC. The incidence and multiplicity rates of keratinocyte cancers in Australia. *Med J Aust*. 2017 Oct 16; 207(8):339-343.

35. Muzic JG., Schmitt AR., Baum CL., et al Incidence and trends of basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma: a population-based study in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010. *Mayo Clin Proc.* 2017; 92:890–898.
36. Reichrath J., Reichrath S. The relevance of the vitamin D endocrine system (VDES) for tumorigenesis, prevention, and treatment of non-melanoma skin cancer (NMSC): Present concepts and future perspectives. *Dermatoendocrinol.* 2013 Jan 1;5(1):38-50.
37. Krajowy Rejestr Nowotworów. www.onkologia.org.pl
38. Wojciechowska U., Didkowska J. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie — Państwowy Instytut Badawczy. Dostępne na stronie <http://onkologia.org.pl/raporty/> dostęp z dnia 22/03/2020.
39. Cheng JY., Li FY., Ko CJ., et al. Cutaneous squamous cell carcinomas in solid organ transplant recipients compared with immunocompetent patients. *JAMA Dermatol* 2018; 154: 60-6.
40. Greenberg JN., Zwald FO. Management of skin cancer in solid organ transplant recipients: a multidisciplinary approach. *Dermatol Clin* 2011; 29: 231-41.
41. Damps T., Czuwara J., Warszawik-Hendzel O., et al. The role of drugs and selected dietary factors in cutaneous squamous cell carcinogenesis. *Adv Dermatol Allergol* 2021; XXXVIII (2): 198–204.
42. Warszawik-Hendzel O., Olszewska M., Maj M., et al. Non-invasive diagnostic techniques in the diagnosis of squamous cell carcinoma. *J Dermatol Case Rep.* 2015;9(4):89–97.
43. Combalia A., Carrera C. Squamous Cell Carcinoma: An Update on Diagnosis and Treatment. *Dermatol Pract Concept.* 2020 Jun 29;10(3):e2020066.
44. Kurzeja M., Walecka I., Lidia Rudnicka L., et al. Zastosowanie refleksyjnej mikroskopii konfokalnej in vivo w dermatologii. *Przegl Dermatol* 2010, 97, 281-289
45. Rishpon A., Kim N., Scope A., et al. Reflectance confocal microscopy criteria for squamous cell carcinomas and actinic keratoses. *Arch Dermatol* 2009, 145, 766-772.
46. Work Group; Invited Reviewers, Kim J.Y.S., Kozlow J.H., Mittal B., Moyer J., Olenecki T., Rodgers P.: Guidelines of care for the management of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2018, 78, 560-578.
47. Bichakjian C., Olencki T., Aasi S., et al.: Squamous Cell Skin Cancer, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2016, 14, 574-597.
48. Alam M., Armstrong A., Baum C., et al. Guidelines of care for the management of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 2018 Mar; 78(3): 560–578.
49. Stratigos A.J., Garbe C., Dessinioti C., et al. European Interdisciplinary Guideline on Invasive Squamous Cell Carcinoma of the Skin: Part 1. Epidemiology, Diagnostics and Prevention. *Eur. J. Cancer.* 2020;128:60–82.
50. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/squamous.pdf
51. National Comprehensive Cancer Center NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology; Squamous Cell Carcinoma (V2. 2018) [(accessed on 13 September 2021)]. Available online: https://oncolife.com.ua/doc/nccn/Squamous_Cell_Skin_Cancer.pdf.
52. Mohs Micrographic Surgery. Prickett KA., Ramsey ML. 2022 Jan 21. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 28722863.

53. Jambusaria-Pahlajani A., Miller C.J., Quon H., et al. Surgical Monotherapy versus Surgery plus Adjuvant Radiotherapy in High-Risk Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review of Outcomes. *Derm. Surg.* 2009;35:574–585.
54. Harris B.N., Pipkorn P., Nguyen K.N.B., et al. Association of Adjuvant Radiation Therapy with Survival in Patients With Advanced Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2019;145:153–158.
55. Basset-Seguín N., Maubec E. Recent Advances in the Treatment of Advanced SCC Tumors. *Cancers(Basel)*. 2022 Feb; 14(3): 550.
56. Cañueto J., Cardenoso E., García J.L., et al. Epidermal Growth Factor Receptor Expression Is Associated with Poor Outcome in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Br. J. Derm.* 2017, 176, 1279–1287.
57. Maubec E. Update of the Management of Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *Acta. Derm. Venereol.* 2020, 100, adv00143.
58. Maubec E., Petrow P., Scheer-Senarich, I., et al. Phase II Study of Cetuximab as First-Line Single-Drug Therapy in Patients with Unresectable Squamous Cell Carcinoma of the Skin. *J. Clin. Oncol.* 2011, 29, 3419–3426.
59. Dereure O., Missan H., Girard C., et al. Efficacy and Tolerance of Cetuximab Alone or Combined with Chemotherapy in Locally Advanced or Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: An Open Study of 14 Patients. *Dermatology* 2016, 232, 721–730.
60. William W.N., Feng L., Ferrarotto R., et al. Gefitinib for Patients with Incurable Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Single-Arm Phase II Clinical Trial. *J. Am. Acad. Derm.* 2017, 77, 1110–1113.e2.
61. Gold K.A., Kies M.S., William W.N., et al. Erlotinib in the Treatment of Recurrent or Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Single-Arm Phase 2 Clinical Trial. *Cancer* 2018, 124, 2169–2173.
62. Rischin D., Khushalani N.I., Schmults C.D., et al. Integrated analysis of a phase 2 study of cemiplimab in advanced cutaneous squamous cell carcinoma: extended follow-up of outcomes and quality of life analysis. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2021;9:e002757. doi:10.1136/jitc-2021-002757
63. García-Foncillas J., Tejera-Vaquero A., Sanmartín O. et al. Update on Management Recommendations for Advanced Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2022 Jan 27;14(3):629.
64. How to Use Fluorouracil and Imiquimod for Non-Melanoma Skin Cancer in a General Practice Setting. 2017. Available online: <https://bpac.org.nz/2017/skin-cancer.aspx> (accessed on 28 July 2018).
65. Regno L., Catapano S., Stefani A., et al. A Review of Existing Therapies for Actinic Keratosis: Current Status and Future Directions. *Am J Clin Dermatol.* 2022 Feb 19. doi: 10.1007/s40257-022-00674-3. Online ahead of print.
66. Cullen JK., Simmons JL., Parsons PG., et al. Topical treatments for skin cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* Volume 153, 1 January 2020, Pages 54-64.
67. X.-H. Xu., G.-M. Yao., Y.-M. Li., et al. 5-fluorouracil derivatives from the sponge *Phakellia fusca*. *J. Nat. Prod.*, 66 (2003), pp. 285-288.

68. Pomerantz H., Hogan D., Eilers D., et al. Long-term efficacy of topical fluorouracil cream, 5%, for treating actinic keratosis: a randomized clinical trial. *JAMA Dermatol.*, 151 (2015); 952-960.
69. Loven K., Stein L., Furst K., et al. Evaluation of the efficacy and tolerability of 0.5% fluorouracil cream and 5% fluorouracil cream applied to each side of the face in patients with actinic keratosis. *Clin. Ther.*, 24 (2002); 990-1000.
70. Morton C., Horn M., Leman J., et al. Comparison of topical methyl Aminolevulinic acid photodynamic therapy with cryotherapy or fluorouracil for treatment of squamous cell carcinoma in situ: results of a multicenter randomized trial. *JAMA Dermatol.*, 142 (2006); 729-735.
71. Salim A., Leman J.A., McColl J.H., et al. Randomized comparison of photodynamic therapy with topical 5-fluorouracil in Bowen's disease. *Br. J. Dermatol.*, 148 (2003); 539-543.
72. Micali G., Lacarrubba F., Nasca MR., et al. Topical pharmacotherapy for skin cancer: part I. Pharmacology. *J Am Acad Dermatol.* 2014;70(965):e1-12.
73. Moscarella E., Di Brizzi EV., Casari A., et al. Italian expert consensus paper on the management of patients with actinic keratoses. *Dermatol Ther.* 2020;33: e13992.
74. Emmerich VK., Cull D., Kelly KA., et al. Patient assessment of 5-fluorouracil and imiquimod for the treatment of actinic keratoses: a retrospective study of real-world effectiveness. *J Dermatol Treat.* 2021;2021:1-4.
75. Nelson C., Rigel D., Smith S., et al. Phase IV, open-label assessment of the treatment of actinic keratosis with 3.0% diclofenac sodium topical gel (Solaraze). *J Drugs Dermatol.* 2004;3:401-7.
76. Gupta AK., Paquet M., Villanueva E., et al. Interventions for actinic keratoses. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;12:CD004415.
77. Nisticò S., Del-Duca E., Torchia V., et al. Cost-efficacy analysis of 3% diclofenac sodium, ingenol mebutate, and 3.75% imiquimod in the treatment of actinic keratosis. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2018;32:925.
78. Noels EC., Hollestein LM., Van Egmond S., et al. Healthcare utilization and management of actinic keratosis in primary and secondary care: a complementary database analysis. *Br J Dermatol.* 2019;181:544-53.
79. Clebak KT., Mendez-Miller M., Croad J. Cutaneous cryosurgery for common skin conditions. *Am Fam Phys.* 2020;101:399-406.
80. Heppt MV., Steeb T., Ruzicka T., et al. Cryosurgery combined with topical interventions for actinic keratosis: a systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol.* 2019;180:740-8.
81. De Berker D., McGregor JM., Mohd Mustapa MF., et al. British Association of Dermatologists' guidelines for the care of patients with actinic keratosis 2017. *Br J Dermatol.* 2017;176:20-43.
82. Salim A., Leman J.A., McColl J.H., et al. Randomized comparison of photodynamic therapy with topical 5-fluorouracil in Bowen's disease. *Br J Dermatol* 2003, 148: 539-543.
83. Zaar O., Fouglerberg J., Hermansson A., et al. Effectiveness of photodynamic therapy in Bowen's disease: a retrospective observational study in 423 lesions. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2017, 31:1289-1294.
84. Habli Z., Toumeh G., Fatfat M., et al. Emerging Cytotoxic Alkaloids in the Battle against Cancer: Overview of Molecular Mechanisms. *Molecules.* 2017 Feb 8;22(2):250.

85. Bishayee A., Sethi G. Bioactive natural products in cancer prevention and therapy: Progress and promise. *Semin Cancer Biol.* 2016 Oct; 40-41:1-3.
86. Taraphdar AK., Roy M., Bhattacharya RK. Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. *Curr Sci.* 2001;80(11):1387–96.
87. Qi F., Li A., Inagaki Y., et al. Chinese herbal medicines as adjuvant treatment during chemo- or radio-therapy for cancer. *Biosci Trends.* 2010 Dec; 4(6):297-307.
88. Wheat J., Currie G. Herbal medicine for cancer patients: An evidence based review. *Int J Altern Med* 2008;5(2).
89. HemaIswarya S., Doble M. Potential synergism of natural products in the treatment of cancer. *Phytother Res.* 2006 Apr; 20(4):239-49.
90. Yang HL., Chen CS., Chang WH., et al. Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by *Antrodia camphorata*. *Cancer Lett.* 2006 Jan 18; 231(2):215-27.
91. Hozzein WN., Mohany M., Alhawsawi SMM., et al. Flavonoids from Marine-Derived Actinobacteria as Anticancer Drugs. *Curr Pharm Des.* 2021;27(4):505-512.
92. Sur S., Ray R.B. Diverse roles of bitter melon (*Momordica charantia*) in prevention of oral cancer. *J Cancer Metastasis Treat.* 2021; 7: 12.
93. Wang Z., Wang N., Chen J., et al. Emerging glycolysis targeting and drug discovery from chinese medicine in cancer therapy. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 2012():873175.
94. Mukherjee AK., Basu S., Sarkar N., et al. Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Curr Med Chem.* 2001 Oct; 8(12):1467-86.
95. Zhu L., Chen L. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. *Cell Mol Biol Lett.* 2019; 24: 40.
96. Golpich M., Amini E., Kefayat A., et al. In vitro and in vivo anti-cancer effects of hibernating common carp (*Cyprinus carpio*) plasma on metastatic triple-negative breast cancer. *Sci Rep.* 2022; 12: 2855.
97. Jeyamogan S., Khan NA., Sagathevan K., et al. Anticancer Properties of Asian Water Monitor Lizard (*Varanus salvator*), Python (*Malayopython reticulatus*) and Tortoise (*Cuora kamaroma amboinensis*). *Anticancer Agents Med Chem.* 2020;20(13):1558-1570.
98. Lai-Cheong J.E., McGrath J.A. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine.* 2017;45:347–351.
99. Pan X., Hobbs R.P., Coulombe P.A. The expanding significance of keratin intermediate filaments in normal and diseased epithelia. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2013, 25, 47–56.
100. Oshima R.G. Apoptosis and keratin intermediate filaments. *Cell Death Differ.* 2002, 9, 486–492.
101. Kim S., Wong P., Coulombe P.A. A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *Nature,* 2006, 441, 362–365.
102. Heid H.W., Moll I., Franke W.W. Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. I. Human and bovine hair follicles. *Differentiation* 1988, 37, 137–157.
103. Han W., Hu Ch., Zhao-Jun Fan., Guo-Liang Shen. Transcript levels of keratin 1/5/6/14/15/16/17 as potential prognostic indicators in melanoma patients. *Sci Rep.* 2021; 11: 1023.
104. Werner S., Keller L., Pantel K. Epithelial keratins: Biology and implications as diagnostic markers for liquid biopsies. *Mol. Asp. Med.* 2020, 72, 100817.

105. Kakkar P., Madhan B. Fabrication of keratin-silica hydrogel for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C* 2016, 66, 178–184.
106. Husain M.S.B., Gupta A., Alashwal B.Y. Development of keratin based hydrogels for biomedical applications. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*; IOP Publishing: Bristol, UK, 2019; Volume 702, p. 012031.
107. Morais J.M., Papadimitrakopoulos F., Burgess D.J. Biomaterials/tissue interactions: Possible solutions to overcome foreign body response. *AAPS J.* 2010, 12, 188–196.
108. Reichl S. Films based on human hair keratin as substrates for cell culture and tissue engineering. *Biomaterials* 2009, 30, 6854–6866.
109. Zafar K., Jamal S., Ghafoor R. Bio-active cements-Mineral Trioxide Aggregate based calcium silicate materials: A narrative review. *J. Pak. Med. Assoc.* 2020, 70, 497–504.
110. Bochynska-Czyz M., Redkiewicz P., Kozłowska H., et al. Can keratin scaffolds be used for creating three-dimensional cell cultures? *Open Med.* 2020, 15, 249–253.
111. Yamauchi K., Maniwa M., Mori, T. Cultivation of fibroblast cells on keratin-coated substrata. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1998, 9, 259–270.
112. Konop M., Czuwara J., Kłodzińska E., et al. Evaluation of keratin biomaterial containing silver nanoparticles as a potential wound dressing in full-thickness skin wound model in diabetic mice. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2020, 14, 334–346.
113. Amajuoyi J.N., Ilomuanya M.O., Asantewaa-Osei Y., et al. Development of electrospun keratin/coenzyme Q10/poly vinyl alcohol nanofibrous scaffold containing mupirocin as potential dressing for infected wounds. *Future J. Pharm. Sci.* 2020, 6, 25.
114. Konop M., Czuwara J., Kłodzińska E., et al. Development of a novel keratin dressing which accelerates full-thickness skin wound healing in diabetic mice: In vitro and in vivo studies. *J. Biomater. Appl.* 2018, 33, 527–540.
115. Mokrejs P., Hutta M., Pavlackova J., et al. The cosmetic and dermatological potential of keratin hydrolysate. *J Cosmet Dermatol.* 2017 Dec;16(4).
116. Peřa-Criřan S., Ursachi CS., Gavriłař S., et al. Closing the Loop with Keratin-Rich Fibrous Materials. *Polymers (Basel).* 2021 Jun 7;13(11):1896.
117. Villa A.L.V., Aragão M.R.S., dos Santos E.P., et al. Feather keratin hydrolysates obtained from microbial keratinases: effect on hair fiber. *BMC Biotechnol* 13, 15 (2013).
118. Gaidau C., Epure D-G., Enascuta CE., et al. Wool keratin total solubilisation for recovery and reintegration - An ecological approach. *Journal of Cleaner Production*, Volume 236, 2019, 117586.
119. Lipkowski AW., Gajkowska B., Grabowska A., Kurzepa K. Keratin-associated protein micromaterials for medical and cosmetic applications. *Polimery.* 2009;54(5):386–8.
120. Callegaro K., Brandelli A., Joner D.D. Beyond plucking: Feathers bioprocessing into valuable protein hydrolysates. *Waste Manag.* 2019 Jul 15;95:399-415. doi: 10.1016/j.wasman.2019.06.040. Epub 2019 Jun 25.
121. Kornilłowicz-Kowalska T., Bohacz J. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Manag.* 2011 Aug;31(8):1689-701. doi: 10.1016/j.wasman.2011.03.024. Epub 2011 May 6.

122. Reddy C.C., Irshad Ahamad Khilji I.A., Gupta A., et al. Valorization of keratin waste biomass and its potential applications. *J. Water Process. Eng.* 2021;40:101707. doi: 10.1016/j.jwpe.2020.101707.
123. Lipkowski A., Grabowska A., Kurzepa K., Szczucinska A. Novel microstructural protein preparations containing adsorbed biologically active substances and their application in medicine and cosmetics. Patents: US20100047196; 2010.
124. Lipkowski A., Jurga M., Domanska-Janik K., Lukomska B. New structural protein preparations. Patents: WO2007149000A3; 2008.
125. Lipkowski AW., Markowicz S. Peptide preparations and peptides with antitumour activity. United States Patent 9,365,633 B2. June 14, 2016.
126. Van Dyke ME., Timmons SF., Blanchard CR., et al. Absorbent keratin wound dressing. Patents: US6270793. 2001.
127. Jakubczyk A., Karaś M., Rybczyńska-Tkaczyk K., et al. Current Trends of Bioactive Peptides—New Sources and Therapeutic Effect. *Foods.* 2020 Jul; 9(7): 846.
128. Kim S.-K., Ngo D.-H., Vo T.-S. Marine fish-derived bioactive peptides as potential antihypertensive agents. In: Jeya H., editor. *Advances in Food and Nutrition Research. Volume 65.* Academic Press; Cambridge, MA, USA: 2012:249–260.
129. Abdelhedi O., Jridi M., Jemil I., et al. Combined biocatalytic conversion of smooth hound viscera: Protein hydrolysates elaboration and assessment of their antioxidant, anti-ACE and antibacterial activities. *FRIN.* 2016;86:9–23. doi: 10.1016/j.foodres.2016.05.013.
130. Salas C.E., Badillo-Corona J., Ramírez-Sotelo G., et al. Biologically Active and Antimicrobial Peptides from Plants. *BioMed Res. Int.* 2015;2015:1–11.
131. Amadou I., Le G.-W., Amza T., et al. Purification and characterization of foxtail millet-derived peptides with antioxidant and antimicrobial activities. *Food Res. Int.* 2013;51:422–428.
132. Lei J., Sun L., Huang S., et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am. J. Transl. Res.* 2019;11:3919–3931.
133. Bahar A.A., Ren D. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals.* 2013;6:1543–1575.
134. Moravej H., Moravej Z., Yazdanparast M., et al. Antimicrobial peptides: features, action, and their resistance mechanisms in bacteria. *Microb Drug Resist.* 2018;24:747–67.
135. Pelegrini P.B., Del Sarto R.P., Silva O.N., et al. Antibacterial Peptides from Plants: What They Are and How They Probably Work. *Biochem. Res. Int.* 2011;2011:1–9.
136. Silva LN., Zimmer KR., Macedo AJ., Trentin DS. Plant natural products targeting bacterial virulence factors. *Chem Rev* 116 (2016) 9162–236.
137. Wang WF., Xie XY., Huang Y., et al. Identification of a Novel Antimicrobial Peptide From the Ancient Marine Arthropod Chinese Horseshoe Crab, *Tachypleus tridentatus*. *Front Immunol.* 2022 Mar 23;13:794779.
138. Chaturvedi P., Bhat R. A. H., Pande A. Antimicrobial peptides of fish: innocuous alternatives to antibiotics. 2020. *Rev. Aquac.* 12 85–106.
139. Wu R., Patocka J., Nepovimova E., et al. Marine Invertebrate Peptides: Antimicrobial Peptides. *Front Microbiol* (2021) 16:785085.

140. Tran CD., Prosenč F., Franko M., Benzi G. Synthesis, structure and antimicrobial property of green composites from cellulose, wool, hair and chicken feather. *Carbohydr Polym.* 2016 Oct 20;151:1269-1276.
141. Caven B., Redl B., Bechtold T. An investigation into the possible antibacterial properties of wool fibers. *Text. Res. J.* 2019;89:510–516.
142. Ivankovic T., Rajic A., Razic S.E., et al. Antibacterial Properties of Non-Modified Wool, Determined and Discussed in Relation to ISO 20645:2004 Standard. *Molecules.* 2022 Mar 14;27(6):1876.
143. Wood DLA., Lachner N., Tan J-M., et al. A Natural History of Actinic Keratosis and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Microbiomes. *mBio* . 2018 Oct 9;9(5):e01432-18. doi: 10.1128/mBio.01432-18.
144. Mottaghi S., Abbaszadeh H. Natural Lignans Honokiol and Magnolol as Potential Anticarcinogenic and Anticancer Agents. A Comprehensive Mechanistic Review. *Nutr Cancer.* 2022;74(3):761-778.
145. Chilampalli S., Zhang X., Fahmy H., et al. Chemopreventive effects of honokiol on UVB-induced skin cancer development. *Anticancer Res.* 2010;30:777–783.
146. You Q., Li M., Jiao G. Magnolol induces apoptosis via activation of both mitochondrial and death receptor pathways in A375-S2 cells. *Arch. Pharm. Res.* 2009;32:1789–1794.
147. Markowicz S., Nowecki ZI., Rutkowski P., et al. Adjuvant vaccination with melanoma antigen-pulsed dendritic cells in stage III melanoma patients. 2012. *Med Oncol*, 29: 2966–2977.
148. Vang Mouritzen M, Jenssen H. Optimized Scratch Assay for In Vitro Testing of Cell Migration with an Automated Optical Camera. *J Vis Exp.* 2018 Aug 8;(138):57691.
149. Frederick JW., Sweeny L., Hartman Y., et al. Epidermal growth factor receptor inhibition by anti-CD147 therapy in cutaneous squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2016 Feb;38(2):247-52.
150. Moilanen JM., Löffek S., Kokkonen N., et al. Significant Role of Collagen XVII And Integrin $\beta 4$ in Migration and Invasion of The Less Aggressive Squamous Cell Carcinoma Cells. *Sci Rep.* 2017 Mar 22;7:45057.
151. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-617>
152. Wei Y., Yang P., Cao S., Zhao L. The combination of curcumin and 5-fluorouracil in cancer therapy. *Arch Pharm Res.* 2018 Jan;41(1):1-13.
153. Pendleton EG, Jamasbi RJ, Geusz ME. Tetrahydrocurcumin, Curcumin, and 5-Fluorouracil Effects on Human Esophageal Carcinoma Cells. *Anticancer Agents Med Chem.* 2019;19(8):1012-1020.
154. Conforti C., Giuffrida R., Dianzani C., et al. Effectiveness and tolerability of treatment for isolated actinic keratoses: A retrospective comparison between cryotherapy, CO2 laser and 5-fluorouracil 0.5%/salicylic acid 10. *Dermatol Ther.* 2021 Mar;34(2):e14846.
155. Wawrocka-Pawlak M. How 5-fluorouracil acts. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia.* 2005;9(10):414-423.