KOSMOS
PROBLEMY NAUK BIOLOGICZNYCH

Tom 65 **2016**
Numer 1 **(310)**
Strony **23–32**

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

SABINA MATEJKO[1], EWA POCHEĆ[2], JOANNA HOMA[1]

[1]*Zakład Immunologii Ewolucyjnej*
[2]*Zakład Biochemii Glikokonjugatów*
Instytut Zoologii
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
Uniwersytet Jagielloński
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
E-mail: joanna.homa@uj.edu.pl

DŻDŻOWNICE JAKO ŹRÓDŁO BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH CZĄSTECZEK – WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWE BIAŁEK DŻDŻOWNIC

WSTĘP

Immunologia bezkręgowców stała się obiektem zainteresowania naukowców dopiero w XIX w., kiedy to rosyjski zoolog i mikrobiolog Ilia I. Miecznikow rozpoczął swoje pionierskie badania między innymi nad zjawiskiem fagocytozy w organizmach larw szkarłupni, za której odkrycie otrzymał w 1908 r. nagrodę Nobla.

Dżdżownice (Lumbricidae), bezkręgowce należące do typu pierścienic (Annelida) i gromady skąposzczetów (Oligochaeta) „zadebiutowały" jako model do badań w dziedzinie immunologii porównawczej dopiero we wczesnych latach 60. Wykonane wtedy eksperymenty transplantacyjne potwierdziły zdolność dżdżownic do rozpoznawania obcych i własnych antygenów, torując tym samym drogę do obszernych badań nad ich odpornością.

UKŁAD ODPORNOŚCIOWY DŻDŻOWNIC

Dżdżownice mają dobrze rozwinięte mechanizmy odpornościowe ułatwiające bytowanie w zasiedlanym przez nie środowisku naturalnym. Sukces obrony przed patogenami jest warunkowany zarówno przez bariery mechaniczne, jak i przez wrodzone procesy odpornościowe, oparte na działaniu komórkowych i humoralnych składników płynu obecnego w ich wtórnej jamie ciała, czyli celomie, stąd płyn ten nosi nazwę celomatycznego, a komórki w nim zawarte to celomocyty (KAUSCHKE i współaut. 2007).

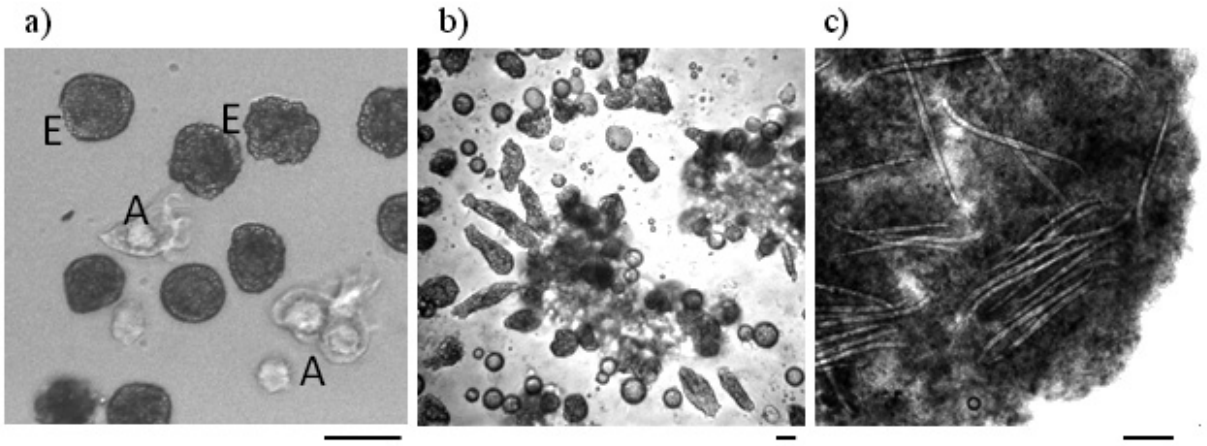
SKÓRA I ŚLUZ

Pierwszą barierę ochronną dżdżownic stanowi wór powłokowo-mięśniowy. Tworzy go jednowarstwowy nabłonek (oskórek) oraz mięśnie okrężne i podłużne. Komórki wydzielnicze pochodzące z naskórkowych gruczołów wydzielają śluz pod postacią kompleksu składającego się z mukopolisacharydów, lipidów oraz białek, który stanowi kolejną, silną przeszkodę na drodze patogenów (BILEJ i współaut. 2000). Ponadto, znajdujące się w ciele dżdżownic grzbietowe pory (celomodukty) wyposażone w mięśniowe zwieracze, kontrolują ciśnienie wewnątrz celomy i wymianę między środowiskiem zewnętrznym a jamą ciała (JURA 2007). Drobnoustroje dostające się do wnętrza organizmu w wyniku uszkodzenia powłok ciała lub poprzez pory grzbietowe wędrują dalej do płynu celomatycznego, natrafiając na kolejną linię obrony jaką są znajdujące się w płynie czynniki humoralne oraz celomocyty.

ODPOWIEDŹ KOMÓRKOWA

Celomocyty są najliczniejszą i najbardziej zróżnicowaną pod względem wielkości,

Słowa kluczowe: białka biologicznie aktywne, dżdżownice, *Eisenia fetida,* G-90, kompleks glikoproteinowy



Ryc. 1. Zdjęcia z mikroskopu świetlnego celomocytów dżdżownic *Eisenia Andrei.*

a) amebocyty (A) i eleocyty (E); b) zlepianie (aglutynacja) celomocytów po stymulacji i*n vitro* LPS; c) „ciało brunatne" z widocznymi w środku uwięzionymi nicieniami (fot. J. Homa). Skala 25 μm.

własności cytochemicznych i funkcji immunologicznych populacją komórek krążących w płynie celomatycznym. Wyróżnia się dwa główne rodzaje tych komórek: amebocyty i eleocyty (Ryc. 1a), różniące się miejscem powstawania, morfologią i pełnionymi funkcjami. Oba rodzaje komórek zaangażowane są w różnym stopniu w funkcje odpornościowe, takie jak fagocytoza, czy cytotoksyczność, a także wpływają na procesy zapalne, powstawanie zakrzepów, gojenie ran i odrzucanie przeszczepów (COOPER 2010). Amebocyty pochodzą prawdopodobnie z mezenchymalnej podściółki celomy (HAMED i współaut. 2002). Wśród nich wyodrębnić można dwie subpopulacje: amebocyty hialinowe i granularne (ADAMOWICZ 2005, KUREK i współaut. 2007). Eleocyty natomiast różnicują się z tkanki chloragogenowej, która wyścieła zewnętrzną powierzchnię ściany jelita i wpukla się do tyflosolisu, czyli fałdu zwiększającego powierzchnię trawienną jelita środkowego oraz otacza główne naczynie krwionośne znajdujące się po grzbietowej stronie ciała (JURA 2007). Eleocyty, zwane również chloragocytami, w kulistych ziarnistościach, chloragosomach, mogą gromadzić materiały zapasowe: glikogen, lipidy (AFFAR i współaut. 1998) lub barwniki, np. ryboflawinę, która jest jednym z fluoroforów odpowiedzialnych za autofluorescencję tej populacji komórek (PŁYTYCZ i współaut. 2006). Eleocyty biorą udział w utrzymaniu równowagi jonowej i pH płynu celomatycznego, odżywianiu, mają właściwości bakteriostatyczne oraz biorą udział w detoksyfikacji tkanek i akumulacji metali ciężkich. Mogą też odgrywać rolę w reakcjach odpornościowych oraz biorą udział, wraz z amebocytami, w procesie enkapsulacji, prowadzącej w końcowym efekcie do formowania tzw. „ciał brunatnych" (PEETERS-JORIS 2000) (Ryc. 1b, c). Brunatny kolor kapsuł pochodzi od odkładanego barwnika, melaniny. Sam proces melanizacji związany jest z kaskadą układu profenoloksydazy, która jest ważnym elementem odpowiedzi immunologicznej u wielu grup bezkręgowców, a jego funkcja porównywana jest do pełnionej przez układ dopełniacza u kręgowców (BILEJ i współaut. 2000).

Mikroorganizmy mogą być eliminowanie z organizmu dżdżownic na kilka sposobów. Po pierwsze mogą być eliminowane na zewnątrz przez metanefrydia lub mogą być pochłaniane przez komórki nefrostomu. Drugą możliwością jest fagocytoza bakterii przez celomocyty, które następnie mogą być usuwane przez grzbietowe pory w ciele. Trzecią możliwością, w przypadku większych ciał obcych (np. nicieni) lub zlepionych bakterii, jest, wspomniana już, eliminacja na drodze enkapsulacji.

ODPOWIEDŹ HUMORALNA

Drugim, nie mniej ważnym składnikiem płynu celomatycznego pierścienic, obok komórek, są syntetyzowane m.in. przez te komórki czynniki humoralne wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Wśród nich można wyróżnić: czynnik G-90, lyzeninę (ang. lysenin), fetydyny (ang. fetidin), białko cytolityczne (ang. eiseniapore), cytolityczny czynnik celomatyczny (ang. coelomic cytolytic factor, CCF-1), mitogenny czynnik celomatyczny (ang. coelomic mitogenic factor, CMF), lumbrycynę I (ang. lumbricin I) oraz enzym fibrynolityczny, lumbrokinazę (ang. earthworm fibrynolityc enzyme, EFE; lumbrokinase, LK).

Składniki płynu celomatycznego pierścienic zdolne są m.in. do lizy erytrocytów, fibroblastów i komórek nowotworowych (BILEJ i współaut. 2010). Oprócz aktywności hemolitycznej, warunkowanej przez obecność hemolizyn, w obecności płynu celomatycznego obserwuje się także aglutynację spowodowaną obecnością hemaglutyniny. Obie te strategie obronne zaobserwowano u kilku gatunków dżdżownic (EUE i współaut. 1998). W analizie poszczególnych elementów humoralnej odpowiedzi odpornościowej nie można pominąć enzymów (BILEJ i współaut. 2010). Lizozym, którego obecność wykazano w celomocytach i płynie celomatycznym, jest enzymem hydrolizującym wiązanie β-1,4-D-glikozydowe w peptydoglikanowej ścianie komórkowej bakterii Gram-dodatnich, dzięki czemu skutecznie chroni gospodarza przed groźnymi infekcjami (BILEJ i współaut. 2000, 2010). Uwalnianie enzymów proteolitycznych z celomocytów odnotowano u *Lumbricus terrestris*. U tego gatunku zaobserwowano m.in. znaczny wzrost aktywności proteolitycznej płynu celomatycznego w ciągu 24-godzinnej inkubacji z erytrocytami, co wskazuje na zaangażowanie proteaz w obronę immunologiczną dżdżownic (KAUSCHKE i współaut. 1997). Proteazy o różnej wielkości i różnych właściwościach biochemicznych sklasyfikowane jako proteazy serynowe, przyczyniają się do destrukcji ciał obcych, a także są zaangażowane w apoptozę komórek oraz krzepnięcie krwi i aktywację kaskady profenoloksydazy (KAUSCHKE i współaut. 2007).

DŻDŻOWNICE W MEDYCYNIE ALTERNATYWNEJ

Rola dżdżownic w medycynie alternatywnej nie jest powszechnie znana, jednak różne kultury od setek lat wykorzystują lecznicze właściwości płynu celomatycznego tych bezkręgowców. W Birmie i Laosie są one stosowane jako lek na ospę. Mieszkańcy Iranu spożywają dżdżownice w celu usunięcia kamieni z pęcherza moczowego, natomiast Indianie z Delaware korzystając z nich, łagodzą ból związany z reumatyzmem (COOPER 2010). W Chinach składniki płynu celomatycznego używane są w leczeniu przewlekłego zapalenia oskrzeli, astmy oskrzelowej, choroby wrzodowej, pokrzywki, półpaśca, kamicy pęcherza moczowego, a nawet psychoz. Li Shizhen, chiński lekarz i farmaceuta, przedstawił w swej książce *Bencao Gangmu* czterdzieści chorób (YANQIN i współaut. 2007) leczonych w ten sposób. W badaniach stwierdzono np., że ekstrakt pozyskany z dżdżownic, stosowany w leczeniu chorób związanych z zakrzepicą, może znacznie zmniejszyć koagulację płytek krwi i ułatwiać rozpuszczanie skrzepów (CHEN i współaut. 2007). Składniki płynu celomatycznego dżdżownic są coraz intensywniej badane w szczególności pod kątem ich działania przeciwnowotworowego. Zainteresowanie może być tym bardziej uzasadnione, iż w prowadzonych do tej pory badaniach nie udało się wywołać nowotworu w organizmach dżdżownic, a w skutek stymulacji dochodziło jedynie do powstawania zmian zapalnych (COOPER 2010). Badania nad właściwościami białek pozyskiwanych z dżdżownic wskazują, że stosowanie ich przez ludzi należących do różnych kręgów kulturowych nie jest do końca bezpodstawne.

GLIKOPROTEINY

Do jednych z najczęściej opisywanych czynników pochodzących z dżdżownic, należy glikoproteinowy ekstrakt G-90, pozyskiwany jak dotąd z tkanek gatunku *Eisenia fetida*. Składają się na niego aminokwasy, cukry oraz glikolipidy o masie 20-95 kDa. G-90 posiada liczne właściwości, które mogą okazać się przydatne między innymi w pobudzeniu procesu gojenia ran (GRIDŠA i współaut. 2001). G-90 pobudza również proliferację i przyleganie komórek. Ma działanie fibrynolityczne, związane z rozkładem skrzepów krwi, a także właściwości antyoksydacyjne, chroniące przed działaniem wolnych rodników, oraz funkcje antybakteryjne związane z odpowiedzą przeciwzakaźną.

MITOGENNA DZIAŁALNOŚĆ INSULINOPODOBNYCH BIAŁEK NALEŻĄCYCH DO G-90

Mitogeny to związki indukujące podziały/proliferację komórek, w tym zwłaszcza komórek układu odpornościowego (JAKÓBISIAK i GOŁĄB 2010). Należy do nich również insulina odgrywająca istotną rolę w metabolizmie organizmu, która u kręgowców pełni także funkcje w ontogenezie. Ponadto, regenerujące się nerwy, mięśnie i komórki śródbłonkowe angażują się w syntezę czynników podobnych do insuliny (GRDIŠA i HRŽENJAK 2007). Prawdopodobne jest, że insulina i cząsteczki o podobnej do niej budowie, które znaleziono również w tkankach wielu bezkręgowców, nie tylko stymulują i kontrolują wzrost i różnicowanie zdrowych komórek, ale mogą także brać udział w angiogenezie związanej z procesem gojenia się rany. Bardzo prawdopodobne jest, że G-90 zawiera cząsteczki mające możliwości regulowania proliferacji komórek (GRDIŠA i HRŽENJAK 2007). W badaniach czynnika G-90 nie wykazano obecności uniwersalnych czynników wzrostu, zarówno naskórkowego czynnika wzrostu (ang. epidermal

growth factor, EGF), jak i czynnika wzrostu fibroblastów (ang. fibroblast growth factor, FGF). Stwierdzono natomiast, że FGF stymuluje syntezę G-90 w hodowlach komórkowych, w efekcie zwiększając proliferację komórek. Eksperymenty na myszach wykazały wpływ czynnika G-90 na syntezę czynników wzrostu, których działanie przyspieszyło gojenie ran (GRDIŠA i HRŽENJAK 2007).

PEPTYDAZY SERYNOWE G-90. ZNACZENIE FIBRYNOLITYCZNE I ANTYKOAGULACYJNE

Zdolność pierścienic do wytwarzania substancji fibrynolitycznych i antykoagulacyjnych wynika prawdopodobnie z filogenetycznej bliskości pijawek i dżdżownic. Już w starożytności znano hirudynę, czyli serynową peptydazę wydzielaną ze ślinianek pijawki *Hirudo medicinalis*. Te fibrynolityczne enzymy wyizolowano także z tkanek pierścienic: *E. fetida, L. rubellus, L. terrestris*. Peptydazy PI (34 kDa) i PII (24 kDa), oprócz wymienionych już funkcji, pełnią także rolę mitogenną (GRDIŠA i HRŽENJAK 2007).

Dzięki badaniom klinicznym nad przebiegiem chorób nowotworowych wiadomo dziś, że istnieje związek pomiędzy rozwojem chorób nowotworowych a zaburzeniami hemostazy (ROSZKOWSKI i ZIÓŁKOWSKA 2005). Do utrzymania hemostazy potrzebna jest równowaga pomiędzy aktywatorami czynników krzepnięcia i ich inhibitorami, oraz aktywatorami fibrynolizy i ich inhibitorami (GRDIŠA i HRŽENJAK 2007). Wpływ nowotworów na organizm gospodarza może przejawiać się w nadkrzepliwości krwi, skazach krwotocznych i zaburzeniach układu fibrynolizy (ROSZKOWSKI i ZIÓŁKOWSKA 2005). Ekstrakt G-90 i jego pochodne, enzymy PI i PII, widocznie skracają czas lizy skrzepów fibryny, a także spowalniają ich formowanie. Badania *in vitro* i *in vivo* wskazują, że G-90 i pochodzące z niego enzymy widocznie skracają czas lizy skrzepów fibryny u psów cierpiących na złośliwego raka sutka (POPOVIĆ i współaut. 2001). Zależy to nie tylko od stężenia G-90, ale i rodzaju tkanki zaatakowanej przez nowotwór. Ten tkankowy ekstrakt, łącznie z dwoma peptydazami serynowymi, spowalnia czas krzepnięcia krwi u osobników cierpiących na chorobę nowotworową, w porównaniu do czasu krzepnięcia krwi u osobników zdrowych (POPOVIĆ i współaut. 2001).

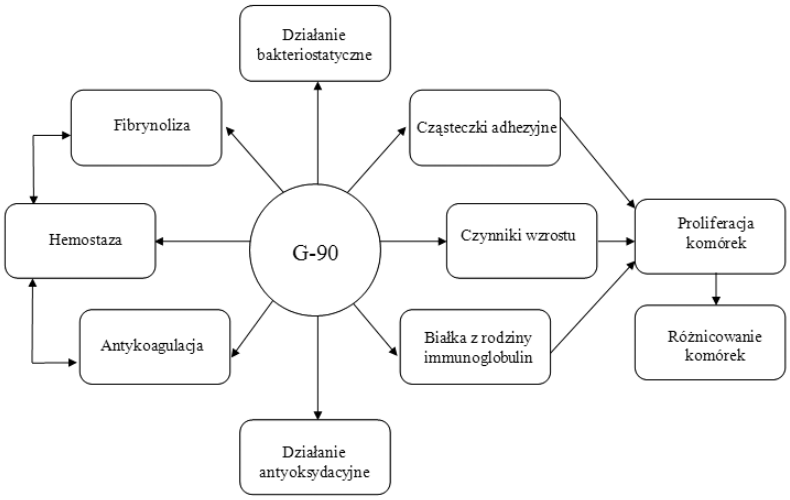
ANTYOKSYDACYJNE WŁAŚCIWOŚCI G-90

Przeciwutleniacze chronią DNA i białka przed uszkodzeniami, które przyczyniają się do starzenia się organizmu i powstawania różnych schorzeń, takich jak nowotwory czy schorzenia układu krążenia. Porównywano działanie czynnika G-90 i znanego przeciwutleniacza, jakim jest kwas askorbinowy i wykazano, że oba chroniły komórki przed stresem oksydacyjnym, ale tylko G-90 stymulował dodatkowo proliferację komórek. Działanie G-90 powoduje także zmiany w błonie komórek, umożliwiające ich ochronę przed uszkodzeniami wywołanymi przez reaktywne formy tlenu, uwalniane podczas przemiany materii. Dzięki temu, czynnik ten może być skuteczniejszym przeciwutleniaczem, który nie tylko w pełni chroni zdrowe komórki przed destrukcyjnym działaniem reaktywnych rodników tlenowych, ale także pełni funkcje ochronne względem komórek wcześniej uszkodzonych (GRDIŠA i współaut. 2001). Inkubacja ludzkich fibroblastów z czynnikiem G-90 i nadtlenkiem wodoru H_2O_2 wykazała antyoksydacyjne działanie G-90. W komórkach preinkubowanych 24 godziny z czynnikiem G-90 nie zaobserwowano toksycznego działania H_2O_2 (GRDIŠA i współaut. 2001).

ANTYBAKTERYJNE DZIAŁANIE G-90

G-90 ma także właściwości bakteriobójcze. Wykazuje hamujący wpływ na wzrost bakterii niechorobotwórczych i fakultatywnie chorobotwórczych, chociaż należy zaznaczyć, że przy wyższych stężeniach następuje stymulacja wzrostu bakterii (POPOVIĆ i współaut. 2005). Na podstawie opisanych powyżej cech została wysnuta hipoteza, mówiąca o udziale G-90 w procesie gojenia ran (GRDIŠA i współaut. 2001). W przeprowadzonych eksperymentach G-90 przyspieszył fazę wzrostu i odnowy komórek naskórka u eksperymentalnie zranionych szczurów. G-90, stymulując regenerację uszkodzonego naskórka, zapewniał też ochronę przeciwbakteryjną, co daje możliwość stosowania go jako potencjalnego środka w gojeniu ran (MATAUSIJĆ-PISL i współaut. 2010). W eksperymentach *in vivo* na myszach w wyniku zadziałania czynnikiem G-90 stwierdzono pobudzenie syntezy białek wspomagających proces gojenia ran, w tym nabłonkowego czynnika wzrostu i czynnika wzrostu fibroblastów (GRDIŠA i współaut. 2004).

Biologicznie czynne glikoproteiny pochodzące z tkanek dżdżownic *E. fetida* nie są mutagenne ani rakotwórcze, a także nie wywołują alergii (POPOVIĆ i współaut. 2001). Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że G-90 wpływa na tempo wzrostu nowotworowo zmienionych mysich komórek *in vitro* oraz spowalnia wzrost tych komórek w badaniach *in vivo* (COOPER 2010).



Ryc. 2. Aktywność i skutki działania G-90 (wg GRDIŠA I HRŽENJAK 2007, zmodyfikowana).

Podsumowując, dotychczas przeprowadzone badania wykazały, że czynnik G-90 zawiera makrocząsteczki o różnych właściwościach (Ryc. 2), z których przynajmniej część może mieć zastosowanie w medycynie i farmacji. Głównym celem dalszych badań musi stać się izolacja białek odpowiedzialnych za konkretne funkcje. Izolacja poszczególnych frakcji białkowych jest zadaniem trudnym i czasochłonnym, co wynika z niewielkiego stężenia białek występujących w całkowitym ekstrakcie czynnika G-90. Z drugiej strony, możliwe jest też, że te biologicznie czynne cząsteczki mogą mieć działanie synergistyczne, a użycie poszczególnych białek będzie miało inny efekt.

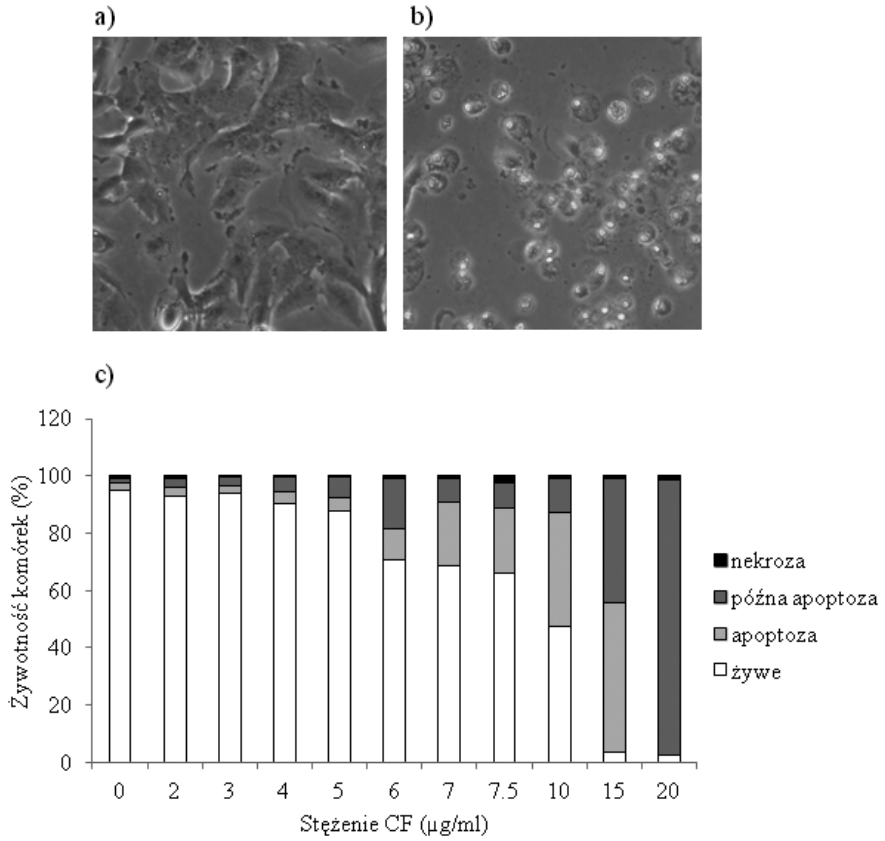
WPŁYW BIAŁEK PŁYNU CELOMATYCZNEGO DŻDŻOWNIC NA KOMÓRKI NOWOTWOROWE

Najbardziej interesującą, i jak dotąd jeszcze słabo poznaną właściwością płynu celomatycznego dżdżownic jest zdolność do zabijania komórek nowotworowych. W ostatnich kilku latach wraz z rozwojem biotechnologii coraz więcej badań koncentruje się właśnie na składnikach o właściwościach przeciwnowotworowych pochodzących z tych organizmów (CHEN i współaut. 2007, COOPER i BALAMURUGAN 2010, HUA i współaut. 2011, DINESH i współaut. 2013).

WPŁYW PŁYNU CELOMATYCZNEGO *EIESENIA FETIDA* NA KOMÓRKI NOWOTWOROWE

HeLa to linia ludzkich komórek nabłonkowych wywodzących się z nowotworu szyjki macicy, która została transformowana przez wirusa brodawczaka ludzkiego. HeLa jest najczęściej używaną w badaniach z dziedziny biologii molekularnej linią komórkową na świecie. O jej niezwykłości przesądza fakt, że była to pierwsza linia komórek nowotworowych, która przetrwała w sztucznych warunkach poza ludzkim organizmem. Wśród wielu badań na komórkami linii HeLa, prowadzone były również testy dotyczące pro-apoptotycznych właściwości płynu celomatycznego *E. fetida* (YANQIN i współaut. 2007). Wykazano, że różne stężenia płynu celomatycznego wywierają różny efekt cytotoksyczny na komórki nowotworowe. W przypadku komórek inkubowanych z najwyższym stężeniem płynu celomatycznego wykazano śmierć komórek na drodze nekrozy, natomiast przy niższych stężeniach śmiertelność oraz zmiany morfologiczne komórek wskazywały na ich śmierć apoptotyczną (np. fragmentacja chromatyny jądrowej). Otrzymane przez naukowców wyniki wykazują również, że im dłuższy czas działania płynu celomatycznego, tym więcej cech apoptotycznych w komórkach nowotworowej linii HeLa (YANQIN i współaut. 2007).

Podobne wyniki uzyskaliśmy badając działanie płynu celomatycznego dwóch różnych gatunków dżdżownic, *Eisenia andrei* i *Aporectodea caliginosa*, na komórki nowotworowe czerniaka pierwotnego i metastatycznego skóry (linia IGR-39 i A375) oraz oka (linia mel-202). Zastosowane stężenia płynu celomatycznego obniżyły żywotność komórek nowotworowych we wszystkich badanych liniach, powodując apoptozę i nekrozę komórek czerniaka (Ryc. 3a–c) (wyniki własne, niepublikowane).



Ryc. 3. Przykładowe wyniki uzyskane w badaniach wpływ płynu celomatycznego (CF) dżdżownic gatunku *Eisenia andrei* na komórki pierwotnej linii nowotworowej czerniaka skóry (IGR-39) po 24 godzinach inkubacji w warunkach *in vitro*. Reprezentatywny obraz morfologii komórek czerniaka.

a) kontrolnych oraz b) po inkubacji z płynem celomatycznym (CF, 20 µg/ml); c) analiza cytometryczna komórek IGR-39, test z użyciem Aneksyny V i 7AAD dla określenia apoptozy oraz nekrozy (fot. E. Pocheć).

CELOMATYCZNY CZYNNIK CYTOLITYCZNY

Cytolityczny czynnik celomatyczny, to białko o masie 42 kDa, stanowiące około 40% aktywności cytolitycznej całego płynu celomatycznego dżdżownic *E. fetida*, z których został po raz pierwszy wyizolowany. Obecność tego czynnika została wykryta w stymulowanych lipopolisacharydem (LPS) celomocytach oraz w mezenchymalnych komórkach błony śluzowej jamy celomatycznej (BILEJ i współaut. 1998). Czynnik CCF ma dwie odrębne domeny lektynopodobne, z których pierwsza zlokalizowana jest w centralnej części cząsteczki i wykazuje homologię do struktury glukanazy (β-1,3-glukanaza) i struktury wiążącej polisacharyd, dzięki którym może wchodzić w interakcje z LPS (*E.coli* 055:B5) i β-1,3-glukanem (nierozpuszczalnym pochodzącym z bakterii i rozpuszczalnym pochodzącym z brunatnic). Druga domena bogata jest w tryptofan i umożliwia interakcje z N,N'-diacetylchitobiozą i dipeptydem muramylowym (składnik ścian bakterii *Mycobacterium*) (ŠILEROVÁ i współaut. 2006). Ponadto, dzięki wiązaniu wyżej wymienionych struktur, CCF zdolny jest do aktywacji kaskady profenoloksydazy.

Stwierdzono ponadto, że CCF-1 powoduje lizę różnych linii komórek nowotworowych ssaków. np. linii L929 mysich komórek włókniakomięsaka. Prawdopodobny jest również jego udział w hemolitycznych mechanizmach obronnych oraz udział w opsonizacji (BILEJ i współaut. 1995).

WPŁYW ENZYMU FIBRYNOLITYCZNEGO NA KOMÓRKI NOWOTWOROWE WĄTROBY CZŁOWIEKA

Rak wątroby (rak wątrobowo-komórkowy; ang. hepatocellular carcinoma, HCC) znajduje się na piątym miejscu. co do częstości występowania i jest trzecią najczęstszą przyczyną śmiertelności związanej z nowotworami (AHN i FLAMM 2004). Fibrynolityczny enzym EFE (ang. earthworm fibrinolityc enzyme), zwany także lumbrokinazą. jest kompleksem enzym-białko, który występuje w

przewodzie pokarmowym dżdżownic *Eiesenia fetida* i *Lumbricus rubellus* (CHEN i współaut. 2007, COOPER 2010). EFE wykazuje wysoką aktywność hydrolityczną w stosunku do białek, m.in. ma nie tylko bezpośredni wpływ na fibrynę, ale również zdolny jest do aktywacji czynnika fibrynolitycznego, plazminogenu. Takie działanie możliwe jest dzięki aktywatorowi plazminogenu (e-Pa) występującemu w EFE, który wykazuje podobieństwo do aktywatora plazminogenu u innych gatunków (t-Pa).

Do funkcjonalnych właściwości EFE zaliczyć można m.in. rozpuszczanie skrzepów, chroniące przed chorobami niedokrwiennymi serca i mózgu, obniżenie poziomu fibrynogenu (spadek lepkości krwi, zmniejszenie agregacji płytek krwi), co u osobników cierpiących na nowotwór hamuje wzrost komórek rakowych i zmniejsza ryzyko wystąpienia przerzutów. EFE wpływa również na rozpuszczanie bakteryjnego biofilmu obecnego w przewlekłych zakażeniach, umożliwiając tym samym efektywne działanie antybiotyku (COOPER i BALAMURUGAN 2010).

W celu analizy wpływu EFE na wzrost nowotworowych komórek wątroby, przeprowadzano testy badające jego wpływ na proliferację czterech różnych rodzajów linii komórkowych: HLE, Huh7, PLC/PRF/5 (linie ludzkich komórek HCC) i HepG2 (linia ludzkich komórek hepatoblastomy). Po inkubacji komórek z różnymi stężeniami EFE zanotowano zahamowanie proliferacji we wszystkich testowanych liniach, choć wrażliwość dla każdej z nich była inna (CHEN i współaut. 2007). Inne badania prowadzone nad wpływem EFE dotyczyły eksperymentów *in vivo*, w których myszom szczepu Huh7 przeszczepiono komórki raka wątroby. Cztery tygodnie od rozpoczęcia podawania zwierzętom EFE stwierdzono, że proliferacja komórek guza zmniejszyła się, w porównaniu ze zwierzętami, którym nie podawano EFE. Wykazano także, że zahamowanie wzrostu guza było zależne od stężenia enzymu. W trakcie badań wykazano również zależną od dawki indukcję apoptozy komórek nowotworowych (CHEN i współaut. 2007).

Ważną cechą komórek nowotworowych jest ich zdolność do inwazji tkanek oraz tworzenie przerzutów do odległych miejsc organizmu. Powszechnie uważa się, że adhezja komórek nowotworowych do błony podstawnej naczyń krwionośnych, degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. extracellular matrix, ECM) i przechodzenie komórek do krwi, są trzema zasadniczymi etapami postępu inwazji nowotworowej i w konsekwencji powstawania przerzutów. W ich powstawaniu biorą udział metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. matrix metallopeptidases, MMPs). Jest to rodzina cynko-zależnych peptydaz, których podstawową funkcją jest uczestniczenie w procesach przebudowy składników macierzy zewnątrzkomórkowej. MMPs biorą udział w pobudzaniu wzrostu komórek raka, migracji, inwazji, tworzeniu przerzutów i nowych naczyń krwionośnych (ŚLIWOWSKA I KOPCZYŃSKI 2005). Spośród nich, MMP-2 (żelatynaza A) i MMP-9 (żelatynaza B) są odpowiedzialne m.in. za degradację kolagenu typu IV i V błony podstawnej (KWIATKOWSKI i współaut. 2008). W badaniach wykazano istotny wpływ EFE na obniżenie (zahamowanie) ekspresji MMP-2, co może wiązać się z jego rolą w ograniczeniu inwazji i przerzutów komórek nowotworowych (CHEN i współaut. 2007).

BADANIA KLINICZNE LUMBROKINAZY

Badania kliniczne dotyczące wpływu czynników pozyskiwanych od dżdżownic prowadzone są na bardzo niewielką skalę. W przeprowadzonych do tej pory eksperymentach we krwi pobranej od zdrowych wolontariuszy po doustnym podawaniu przez 17 dni lumbrokinazy analizowano produkty rozpadu fibrynogenu, białka związanego z powstawaniem skrzepów, oraz poziom zwiększającego fibrynolizę tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA). W trakcie trwania eksperymentu wykazano zwiększenie zdolności fibrynolitycznych oraz wzrost poziomu plazminogenu w pobranych próbkach krwi (COOPER 2010). W innych badaniach, przeprowadzonych w 2000 r. na Uniwersytecie Medycznym w Szanghaju u pacjentów z udarem mózgu, w grupie, której podano lumbrokinazę odnotowano wzrost aktywności t-PA, aktywność fibrynogenu znacząco się zmniejszyła, a inne badane parametry, jak aktywność inhibitora aktywatora plazminogenu i wartości czasu protrombinowego, pozostały bez zmian. Wyniki wskazują, że lumbrokinaza hamuje szlak krzepnięcia i aktywuje fibrynolizę poprzez zwiększenie aktywności t-PA. To sugeruje, że może być ona z dobrym skutkiem stosowana w przypadku udaru niedokrwiennego. Warto też zaznaczyć, że jej stosowanie nie zwiększało ryzyka powstania nadmiernego krwawienia, które występuje w przypadku stosowania leków przeciwzakrzepowych (COOPER 2010).

Inne składniki płynu celomatycznego o potencjalnym działaniu przeciwzapalnym i przeciwnowotworowym to:

– ryboflawina (witamina B2) obecna w celomocytach różnych gatunków dżdżownic posiada właściwości przeciwzapalne (MAZUR i współaut. 2008);

– fetydyny białka (40 kDa, 45 kDa) odnalezione w płynie celomatycznym gatunku

Eisenia andrei o działaniu hemolitycznym i przeciwbakteryjnym (MILOCHAU i współaut. 1996);

– lyzenina (41 kDa), białko specyficznie wiążące sfingomielinę, o aktywności podobnej do fetydyny, produkowane przez duże celomocyty, w tym chloragocyty. Przez wzgląd na swoje właściwości hemolityczne jest bardzo toksyczne dla komórek kręgowców, a w szczególności dla erytrocytów i plemników (YAMAJI i współaut. 1998);

– eiseniapore (38 kDa), cytolityczne białko wyizolowane z płynu celomatycznego *E. fetida*. Dzięki właściwościom cytolitycznym i perforacyjnym, niszczy błony obcych komórek. Białko to uwalniane jest z ziarnistości cytoplazmatycznych, a analiza sekwencji perforyn wykazała ich strukturalne podobieństwo z białkami układu dopełniacza C9 kręgowców, wchodzącymi w skład kompleksu atakującego błonę komórkową (Lichtenheld i współaut. 1988, Lowrey i współaut. 1989 cyt. za LANGE i współaut. 1999).

– Lumbrycyna I to bogate w prolinę białko przeciwbakteryjne (działające zarówno na bakterie Gram dodatnie jak i Gram ujemne, a także na grzyby, bez hemolitycznej aktywności wobec ludzkich komórek krwi), syntetyzowane przez dżdżownice z gatunku *L. rubellus.* Geny dla tego białka wykazują ekspresję tylko u starszych osobników (CHO i współaut. 1998);

– H_1, H_2, H_3, czyli hemolizyny pochodzące z płynu celomatycznego gatunku *E. fetida.* Zaobserwowano, że H_1 i H_2 wykazują aktywność hemolityczną, w przeciwieństwie do H_3 zaangażowanej w hemaglutynację erytrocytów ssaków (EUE i współaut. 1998).

TRUDNOŚCI W PRAKTYCZNYM ZASTOSOWANIU BIAŁEK DŻDŻOWNIC W MEDYCYNIE

Mimo postępu w badaniach związanych z potencjalną rolą przeciwnowotworową białek dżdżownic, istnieje wiele pytań oczekujących dalszych, bardziej szczegółowych odpowiedzi. Wynika to między innymi z faktu, że przeciwnowotworowe właściwości niektórych czynników wyizolowanych z organizmów dżdżownic mogą być skierowane nie tylko w kierunku komórek nowotworu, ale również na zdrowe, niezmienione chorobowo komórki.

W przypadku innych badanych właściwości białek dżdżownic można również napotkać na kłopoty z zastosowaniem ich jako skutecznego leku. Przykładowo, pozyskane z dżdżownic proteazy mogą w warunkach *in vivo* hydrolizować nie tylko fibrynogen czy fibrynę, ale również inne białka. Poza tym, okres półtrwania proteaz dżdżownic jest krótki, podczas gdy z punktu widzenia medycznego idealny czynnik fibrynolityczny powinien spełniać warunki silnej aktywności fibrynolitycznej, swoistości dla fibrynogenu i fibryny, niskiej immunogenności oraz wykazywać długi okres półtrwania *in vivo,* jak również niski wskaźnik reokluzji (ponowne zasklepianie udrożnionych wcześniej naczyń) i, co równie ważne, generować niskie koszty produkcji. A koszty w tym przypadku są dość wysokie, ze względu na procedurę pozwalającą pozyskać odpowiednią ilość poszczególnych składników z ekstraktu białkowego dżdżownic. Niemniej jednak, w ciągłym poszukiwaniu skutecznych metod walki z chorobami nowotworowymi, wydaje się interesujące przynajmniej dokładniejsze poznanie właściwości bogatej gamy biologicznie aktywnych białek tych bezkręgowców.

PODSUMOWANIE

Co sprawia, że dżdżownice i inne bezkręgowce są odporne na nowotwory pierwotne i metastatyczne? Istnieją dwie teorie na ten temat. Jedna z nich głosi, że długość życia bezkręgowców jest tak krótka, że nie ma czasu na rozwój choroby nowotworowej. Inną możliwością jest to, że bezkręgowce potrafią reagować natychmiast poprzez działalność immunokompetentnych komórek i biologicznie czynnych substancji płynu celomatycznego, niszcząc komórki nowotworowe. Wizja potencjalnego zastosowania dżdżownic do unieszkodliwiania komórek nowotworowych jest obiecująca, ale z pewnością potrzeba więcej analiz i eksperymentów zarówno *in vitro*, jak i na modelach zwierzęcych przed rozpoczęciem dokładniejszych badań na poziomie klinicznym (COOPER 2010). Biorąc pod uwagę opisane zagadnienia możliwe jest, że zdanie, które napisał o dżdżownicach Karol Darwin w 1881 r.: "It may be doubted whether there are many other animals which have played so important a part in the history of the world" („Można wątpić, czy istnieje wiele innych zwierząt, które odegrały tak ważną rolę w historii świata") w przyszłości zyska inny wymiar.

PODZIĘKOWANIA

Autorki dziękują bardzo dr hab. Magdalenie Chadzińskiej z Zakładu Immunologii Ewolucyjnej Uniwersytetu Jagiellońskiego za cenne wskazówki. Badania realizowane były z środków K/ZDS/004831.

Streszczenie

Dżdżownice posiadają silne, bardzo efektywnie funkcjonujące komórkowe i humoralne mechanizmy odpornościowe pozwalające przetrwać im w ich naturalnym, bogatym w patogeny środowisku. Z badań licznych zespołów wynika, że w tkankach dżdżownic występują

białka, które wykazują między innymi właściwości bakteriostatyczne, cytolityczne, antyoksydacyjne oraz przeciwnowotworowe. Cytotoksyczne składniki (m.in. cytolityczny czynnik celomatyczny czy białko cytolityczne – *eiseniapore*) wypełniającego wtórną jamę ciała płynu celomatycznego powodują między innymi lizę fibroblastów i erytrocytów kręgowców. Białka płynu celomatycznego mogą także stymulować ekspresję czynników wzrostu i pomagać w gojeniu ran, poprzez stymulację proliferacji i różnicowania fibroblastów i komórek nabłonkowych. Ponadto, zawarte w płynie celomatycznym dżdżownic peptydazy serynowe (np. peptydazy PI i PII) wykazują bardzo silne działanie fibrynolityczne i antykoagulacyjne, Coraz częściej białka dżdżownicowe bada się także w kontekście ich właściwości przeciwnowotworowych. Pozwoliło to między innymi na stwierdzenie, że płyn celomatyczny w sposób zależny od stężenia pobudza w warunkach *in vitro* apoptozę nowotworowych linii komórkowych.

Omówione w niniejszej pracy zagadnienia przybliżają potencjał tkwiący w cząsteczkach biologicznie czynnych pozyskanych z organizmów dżdżownic. Stwierdzić jednak należy, że aczkolwiek wizja potencjalnego zastosowania dżdżownic w terapiach przeciwnowotworowych jest kusząca, z pewnością przed rozpoczęciem badań na poziomie klinicznym potrzeba więcej analiz i eksperymentów zarówno *in vitro,* jak i na modelach zwierzęcych.

LITERATURA

ADAMOWICZ A., 2005. *Morphology and ultrastructure of the earthworm Dendrobaena veneta (Lumbricidae) coelomocytes.* Tissue and Cell 37, 125-133.

AFFAR E. B., DUFOUR M., POIRIER P. P., NADEAU D., 1998. *Isolation, purification and partial characterization of chloragocytes from the earthworm species Lumbricus terrestris.* Mol. Cell. Biochem. 185, 123-133.

AHN J., FLAMM S. L., 2004. *Hepatocellular carcinoma.* Dis. Month 50, 556-573.

BILEJ M., BRYS L., BESCHIN A., LUCAS R., VERCAUTEREN E., HANUŠOVÁ R., DE BAETSELIER P., 1995. *Identification of a cytolytic protein in a coelomic fluid of Eisenia foetida earthworms.* Immunol. Lett. 45, 123-128.

BILEJ M., ROSSMANN P., ŠINKORA M., HANUŠOVÁ R., BESCHIN A., RAES G., DE BAETSELIER P., 1998. *Cellular expression of the cytolytic factor in earthworms Eisenia foetida.* Immunol. Lett. 60, 23-29.

BILEJ M., DE BAETSELIER P., BESCHIN A., 2000. *Antimicrobial defense of the earthworm.* Folia Microbiol. 45, 283-300.

BILEJ M., PROCHÁZKOVÁ P., ŠILEROVÁ M., JOSKOVÁ R., 2010. *Earthworm Immunity.* Adv. Exp. Med. Biol. 708, 66-79.

CHEN H., TAKAHASHI S., IMAMURA M., OKUTANI E., ZHANG Z.G., CHAVAMA K., CHEN B.A., 2007. *Earthworm fibrinolytic enzyme: anti-tumor activity on human hepatoma cells in vitro and in vivo.* Chinese Med. J. 120, 898-904.

CHO J. H., PARK C. B., YOON Y. G., KIM S. C., 1998. *Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization.* Biochim. Biophys. Acta 1408, 67-76.

COOPER E. L., 2010. *Earthworms: Harnessing one of nature's cancer killers.* Oncol. News Internat. 19, 21.

COOPER E. L., BALAMURUGAN M., 2010. *Unearthing a source of medicinal molecules.* Drug Dis. Today 15, 21-22.

DARWIN C. R., 1881. *The formation of vegetable mould, through the action of worms, with observations on their habits.* Cambridge University Press, New York (2009).

DINESH M. S., SRIDHAR S., CHANDANA P. G., VINAYA P., GEETHA K. S., HEGDGE R. N., 2013. *Anticancer Potentials of Peptides of Coelomic Fluid of Earthworm Eudrilus eugeniae.* Biosci. Biotechnol. Res. Asia, 10, 601-606.

EUE I., KAUSCHKE E., MOHRIG W., COOPER E. L., 1998. *Isolation and characterization of earthworm hemolysins and agglutinins.* Dev. Comp. Immunol. 22, 13-25.

GRDIŠA M., HRŽENJAK T., 2007. *Glycolipoprotein extract of Eisenia foetida (G-90): A source of biological active molecules.* Eur J. Soil Biol. 43, 104-109.

GRDIŠA M., POPOVIC M., HRŽENJAK T., 2001. *Glycolipoprotein extract (G-90) from earthworm Eisenia foetida exerts some antioxidative activity.* Comp. Biochem. Physiology A 128, 821-825.

GRDIŠA M., POPOVIĆ M., HRŽENJAK T., 2004. *Stimulation of growth factor synthesis in skin wounds using tissue extract (G-90) from the earthworm Eissenia foetida.* Cell Biochem. Funct. 22, 373-378.

HAMED S. S., KAUSCHKE E., COOPER E. L., 2002. *Cytochemical properties of earthworm coelomocytes enriched by Percol.* [W:] *New Model for Analyzing Antimicrobial Peptides with Biomedical Applications.* COOPER E.L. (red.). A. IOS Press, Ohmsha, 29-37.

HUA Z., WANG Y. H., CAO H. W., PU L. J., CUI Y. D., 2011. *Purification of a protein from coelomic fluid of the earthworm Eisenia foetida and evaluation of its hemolytic, antibacterial, and antitumor activities.* Pharmaceut. Biol. 49, 269-275.

JAKÓBISIAK M., GOŁĄB J., 2010. *Mitogeny i superantygeny.* [W:] *Immunologia.* GOŁĄB J., JAKÓBISIAK M., LASEK W., STOKŁOSA Z. (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 221-222.

JURA CZ., 2007. *Podstawy morfologii funkcjonalnej, systematyki i filogenezy.* [W:] *Bezkręgowce.* JURA CZ. (red.).Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 331-382.

KAUSCHKE E., PAGLIARA P., STABILI L., COOPER E. L., 1997. *Characterization of Proteolytic Activity in Coelomic Fluid of Lumbricus terrestris L. (Annelida, Lumbricidae).* Comp. Biochem. Physiol. B 116, 235-242.

KAUSCHKE E., MOHRIG W., COOPER E. L., 2007. *Coelomic fluid proteins as basic components of innate immunity in earthworms.* Eur. J. Soil Biol. 43, 110-115.

KUREK A., HOMA J., KAUSCHKE E., PLYTYCZ B., 2007. *Characteristics of coelomocytes of the stubby earthworm, Allolobophora chlorotica (Sav.).* Eur. J. Soil Biol. 43, 121-126.

KWIATKOWSKI P., GODLEWSKI J., ŚLIWINSKA-JEWSIEWICKA A., KMIEĆ Z., 2008. *Rola metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w procesie inwazji nowotworu.* Polish Ann. Med. 15, 67-76.

LANGE S., KAUSCHKE E., MOHRIG W., COOPER E. L., 1999. *Biochemical characteristics of Eiseniapore, a pore-forming protein in the coelomic fluid of earthworms.* Eur. J. Biochem. 262, 547-556.

MATAUSIJĆ-PISL M., CUPIĆ H., KASUBA V., MIKECIN A.M., GRDISA M., 2010. *Tissue extract from*

Eisenia foetida as a wound-healing agent. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 14, 177-184.

MAZUR A. I., NATORSKA J., WYPASEK E., KOŁACZKOWSKAE., PŁYTYCZ B., 2008. *Experimental imunology Anti-inflammatory effects of riboflavin and morphine on zymosan-induced peritonitis in Swiss mice.* Central Eur. J. Immunol. 33, 98-101.

MILOCHAU A., LASSÈGUE S M., VALEMBOIS P., 1996. *Purification, characterization and activities of two hemolytic and antibacterial proteins from coelomic fluid of the annelid.* Biochim. Biophys. Acta 1337, 123-132.

PEETERS-JORIS CH., 2000. *The lysosomes of earthworm chloragocyes: biochemical and morphological charcterization.* Comp. Biochem. Physiol. 126, 323-340.

PŁYTYCZ B., HOMA J., KOZIOŁ B., RÓZANOWSKA M., MORGAN A.J., 2006. *Riboflavin content in autofluorescent earthworm coelomocytes is species-specific.* Folia Histoche. Cytobiol. 44, 275-80.

POPOVIĆ M., HRZENJAK T. M., BABIĆ T., KOS J., GRDISA M., 2001. *Effect of earthworm (G-90) extract on formation and lysis of clots originated from venous blood of dogs with cardiopathies and with malignant tumors.* Pathol. Oncol. Res. 7, 197-202.

POPOVIĆ M., GRDIŠA M., HRŽENJAK T., 2005. *Glycolipoprotein G-90 obtained from the earthworm Eisenia foetida exerts antibacterial activity.* Veterinarski Arhiv 75, 119-128.

ROSZKOWSKI K., ZIÓŁKOWSKA E., 2005. *Fibrynoliza w procesie nowotworowym.* Współczesna Onkologia 9, 196-198.

ŠILEROVÁ M., PROCHÁZKOVÁ P., JOSKOVÁ R., JOSENS G., BESCHIN A., DE BAETSELIER P., BILEJ M., 2006. *Comparative study of the CCF-like pattern recognition protein in different Lumbricid species.* Dev. Comp. Immunol. 30, 765-771.

ŚLIWOWSKA I., KOPCZYŃSKI Z., 2005. *Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej – charakterystyka biochemiczna i kliniczna wartość oznaczania u chorych na raka piersi.* Współczesna Onkologia 9,8, 327-335.

YAMAJI A., SEKIZAWA Y., EMOTO K., SAKURABAI H., INOUE K., KOBAYASHI H., UMEDA M., 1998. *Lysenin, a Novel Sphingomyelin-specific Binding Protein.* J. Biol. Chem. 273, 5300-5306.

YANQIN L., YAN S., ZHENJUN S., SHIJIE L., CHONG W., YAN L., YUHONG G., 2007. *Coelomic fluid of the earthworm Eisenia fetida induces apoptosis of HeLa cells in vitro.* Eur. J. Soil Biol. 43, 143-148.

KOSMOS Vol. 65, 1, 23–32, 2016

EARTHWORMS AS A SOURCE OF BIOACTIVE MOLECULES: ANTITUMOR PROPERTIES OF THE EARTHWORM PROTEINS

SABINA MATEJKO, EWA POCHEĆ, JOANNA HOMA

Department of Evolutionary Immunology, Institute of Zoology, Jagiellonian University, Gronostajowa 9, 30-387 Krakow, e-mail: joanna.homa@uj.edu.pl

Summary

Earthworms have strong and very efficient cellular and humoral immune mechanisms adapting them to survive in their natural environment which is rich in pathogens. Numerous studies showed that earthworm proteins exhibit bacteriostatic, cytolytic, antioxidant and anticancer properties. Cytotoxic components of coelomic fluid (including cytolytic factor or coelomic cytolytic factor – eiseniapore), cause lysis of vertebrate fibroblasts and erythrocytes. Moreover, proteins from coelomic fluid may also increase expression of growth factors and assist in wound healing by stimulating proliferation and differentiation of fibroblasts and epithelial cells. In addition, the coelomic fluid contains serine peptidases (eg. peptidase PI and PII) with very strong fibrinolytic and anticoagulant properties. Recently, numerous studies reported that earthworm proteins, in a concentration dependent manner, stimulate apoptosis of tumor cell lines *in vitro* and therefore are a potential source of anticancer agents.

Issues discussed in this paper indicate healing potential of biologically active molecules derived from earthworms. However, it should be noted that although the idea of their application in anti-cancer therapies is alluring, certainly more analyses and experiments, both *in vitro* and in animal models, are required before any clinical testing can be performed.