

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **227923**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **411346**

(51) Int.Cl.  
**A61K 35/56 (2015.01)**  
**A61P 35/00 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **23.02.2015**

---

(54) **Płyn celomatyczny dżdżownicy Dendrobaena veneta do zastosowania  
w leczeniu raka płuc**

---

(43) Zgłoszenie ogłoszono:  
**29.08.2016 BUP 18/16**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:  
**31.01.2018 WUP 01/18**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Marii Curie-  
-SKŁODOWSKIEJ, Lublin, PL**  
**UNIwersytet Medyczny w Lublinie,  
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MARTA FIOŁKA, Lublin, PL**  
**JOLANTA RZYMOWSKA, Lublin, PL**  
**PRZEMYSŁAW KOŁODZIEJ, Radymno, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Maria Brodzicka**

---

**PL 227923 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest nowe, medyczne zastosowanie płynu celomatycznego wyizolowanego z dżdżownicy *Dendrobaena veneta* w leczeniu raka płuc.

Znana jest z publikacji jak np., Yanqin i wsp., „European Journal of Soil Biology” t.43, 2007; Dinesh i wsp. „Bioscience Biotechnology Research Asia”, t.10, 2013; Kauschke i Mohrig, Journal Comparative Physiology, B t. 157, 1987 czy też Yamaji i wsp. Journal of Biological Chemistry, t.273, 1998, przeciwnowotworowa aktywność białek z płynu celomatycznego wyizolowanego z dżdżownic *Eisenia fetida* i *Eudrilus eugeniae* na komórki raka szyjki macicy, raka mózgu, raka okrężnicy oraz złośliwą postać białaczki.

Z kolei z publikacji Kobayashi i wsp., Comparative Biochemistry and Physiology część C, 1.128, wiadomo, że prowadzono badania na rybach, kijankach i myszach, jedynie w kierunku cytotoksyczności płynu celomatycznego z dżdżownic należących do gatunku *Eisenia fetida* po podgrzaniu w 60°C przez 20 minut.

Z prac autorstwa S. Matejko pt. „Dżdżownice jako źródło aktywnie biologicznych cząstek – badania przeciwnowotworowych właściwości płynu celomatycznego” oraz „Przeciwnowotworowe właściwości białek dżdżownic”, zamieszczonych w archiwum prac dyplomowych Uniwersytetu Jagiellońskiego dostępnych na stronach internetowych [https://www.apd.uj.edu.pl/index.php?page=cert&cert\\_cid=55706](https://www.apd.uj.edu.pl/index.php?page=cert&cert_cid=55706) z dnia 2015-01-08, znany jest również wpływ płynu celomatycznego dwóch innych gatunków dżdżownic *Eisenia Andrei* i *Aporrectodea caliginosa*, na żywotność i aktywność proapoptotyczną komórek nowotworowych wątroby, raka szyjki macicy oraz czerniaka złośliwego skóry i błony naczyniowej gałki ocznej.

W wymienionych publikacjach wskazano jednocześnie na toksyczne działanie białek z płynu celomatycznego badanych gatunków dżdżownic na przykładzie fibroblastów kurcząt i leukocytów świnki morskiej oraz na lizę fibroblastów i erytrocytów kręgowców.

W znanym stanie techniki nie zostały ujawnione wyniki badań płynu celomatycznego uzyskane go z gatunku dżdżownic *Dendrobaena veneta*, będącego źródłem aktywnie biologicznych cząstek o działaniu przeciw nowotworom.

Dotychczasowe publikacje takie jak np., M. Fiołka i wsp., „Journal of Invertebrate Pathology” t.105, 2010, czy opisy patentowe PL 212077, PL 218745 oraz P. 405944 ujawniają aktywność przeciwdrobnoustrojową i przeciwnowotworową metabolitów szczepów bakterii z rodzaju *Raoultella ornithinolytica* i *Bacillus pumilus* wyizolowanych z jelita dżdżownicy *Dendrobaena veneta*.

Przedstawione wyżej publikacje, potwierdzają ogromny immunologiczny potencjał dżdżownic, stąd podjęto dalsze badania w kierunku wyizolowania samego płynu celomatycznego *Dendrobaena veneta* w warunkach obiecujących zachowanie największej liczby jego składników białkowych i zbadania wpływu tego płynu na szczególnie agresywne i trudne w leczeniu komórki nowotworowe.

Nieoczekiwanie, w badaniach z wykorzystaniem różnych linii komórek nowotworowych, okazało się, że płyn celomatyczny w określonej postaci uzyskany z dżdżownicy *Dendrobaena veneta*, wykazuje bardzo efektywne działanie w znacznym stopniu uszkadzające komórki raka płuc, przy jednoczesnym braku cytotoksyczności w stosunku do fibroblastów - prawidłowych komórek skóry mysiej oraz komórek krwi człowieka zarówno erytrocytów, jak i leukocytów.

Istotą wynalazku jest płyn celomatyczny z dżdżownicy *Dendrobaena veneta* do zastosowania w leczeniu raka płuc, po oddzieleniu celomocytów i koagulacji toksycznych białek w temperaturze 70–80°C.

Wynalazek został przedstawiony w poniższych przykładach wykonania.

**P r z y k ł a d 1.** Pozyskiwanie płynu celomatycznego z dżdżownic *Dendrobaena veneta* do dalszych badań.

Hodowlę dżdżownic *Denrobaena veneta* prowadzono w ziemi ogrodowej o wilgotności ok. 80% i temperaturze 20–22°C, karmiąc je rozdrobnioną gotowaną marchewką. Do badań wybrano kilkadziesiąt dojrzałych osobników i po opłukaniu w wodzie destylowanej i osuszeniu, polewano niewielką ilością jałowego płynu fizjologicznego. Następnie w okolicę ciała każdej dżdżownicy przykładano na 30 sekund prąd z 2 ogniw baterii o mocy 4.5 V. W tym czasie dżdżownice wyrzucały przez otwory układu wydalniczego płyn z jamy ciała wraz komórkami krwi – celomocytami. Zebrane wydaliny odwirowywano w ciągu kilkunastu minut przy obrotach 3000 na minutę, przez co oddzielono skutecznie osadzone na dnie próbówki celomocyty. Supernatant przesączono przez sączone Millipore o średnicy porów 0,22 µm dla otrzymania sterylnego płynu, po czym metodą Bradford, spektrofotometrycznie

określono stężenie białka – 0,7 mg/ml dla utrzymania porównywalnych warunków w kolejnych eksperymentach.

Po 1 ml otrzymanego wyżej płynu celomatycznego przeniesiono do 6 probówek Eppendorfa, po czym wszystkie probówki inkubowano przez 10 minut w termobloku, kolejno w następujących temperaturach: 40, 50, 60, 70, 80, 90 i 100°C, wychładzając próbki do temp. pokojowej po każdorazowym ogrzewaniu.

Następnie z próbki płynu celomatycznego po określonej temperaturze inkubacji, pobierano 500  $\mu$ l i dodawano do 1 ml hodowli prawidłowych fibroblastów mysich pochodzenia tłuszczowego ECACC 85011425, uzyskując stężenie białka w płynie 250  $\mu$ g/ml.

W zależności od temperatury inkubacji, następował różny stopień koagulacji białek toksycznych, wpływający na uszkodzenie fibroblastów – tabela 1.

Jak wykazują wyniki tego eksperymentu, całkowita koagulacja białek toksycznych – 0% martwych komórek – następuje po inkubacji tego płynu w temp. 70–100°C.

Dodatkowo, naczynia z hodowlą kontrolną, a także z hodowlami zawierającymi fibroblasty z dodatkiem płynu według wynalazku, tj. po ogrzaniu w 70°C, 90°C i bez ogrzewania, poddano obserwacji pod mikroskopem optycznym z odwróconym polem.

Otrzymane obrazy uwidaczniają: fig. 1 – fibroblasty kontrolne, fig. 2 – fibroblasty po działaniu płynu ogrzanego w 70°C, fig. 3 – fibroblasty po działaniu płynu ogrzanego w 90°C i fig. 4 – fibroblasty z płynem bez ogrzewania.

Dalej wykazano wpływ płynu celomatycznego dżdżownicy *Denrobaena veneta* na lizę erytrocytów krwi ludzkiej – tabela 2.

2,5 ml krwi obwodowej ludzkiej zmieszano z antykoagulantem EDTA i rozdzielono do trzech probówek. Do pierwszej (I) z nich, jako próbki kontrolnej, dodano 250  $\mu$ l 0,9% NaCl, a do pozostałych dwóch dodano również po 250  $\mu$ l płynu celomatycznego dżdżownicy. Próbka II stanowiła tzw. płyn surowy nie poddawany inkubacji, zaś próbkę III inkubowano w ciągu 10 min. w temp. 80°C.

Po dokładnym wymieszaniu, próbki poddano analizie w aparacie hematologicznym po 5, 60 i 300 minutach.

Wyniki zawarte w tabeli 2 wskazują, iż płyn celomatyczny inkubowany w badanych czasach nie wpływa na zmiany parametrów hematologicznych, w przeciwieństwie do płynu surowego, powodującego prawie natychmiastową lizę erytrocytów, leukocytów i trombocytów.

Dodatkowo wykonano analizę mikroskopową rozmazów próbek krwi I, II i III barwionych metodą May-Gümwalda-Giemsy.

Wszystkie obrazy mikroskopowe krwi z płynem celomatycznym ogrzewanym (próbka III) nie wykazują różnic morfologicznych w porównaniu z kontrolną (próbka I), co dowodzi braku toksycznego działania tego płynu po obróbce termicznej na komórki krwi człowieka.

Przedstawione na rysunku obrazy mikroskopowe ilustrują niżej wymienione komórki krwi:

– neutrofil wraz z erytrocytami - fig. 5 – kontrola (próbka I ) oraz fig. 6 – próbka III z dodatkiem płynu inkubowanego w 80°C.

– limfocyt z erytrocytami - fig. 7 – kontrola (próbka I ) oraz fig. 8 – próbka III z dodatkiem płynu inkubowanego w 80°C.

– neutrofil i limfocyt bez erytrocytów po działaniu nieogrzanego płynu (próbka II) – fig. 9.

**P r z y k ł a d 2.** Określenie cytotoksyczności płynu celomatycznego względem komórek raka płuc.

Badania prowadzono na linii komórek nabłonkowych raka płuc A549. Hodowle wszystkich komórek prowadzono w standardowych warunkach – 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 90% wilgotność powietrza, na pożywce RPMI z dodatkiem 8% płodowej surowicy bydlęcej. Gęstość wyjściowa zawiesiny wynosiła 104 komórek w mililitrze podłoża.

Założono 5 hodowli zawierających komórki nabłonkowe raka płuc wraz z płynem celomatycznym o różnej temperaturze inkubacji – 70, 80, 90 i 100°C, a także z płynem nieogrzewanym.

Do 1 ml każdej hodowli dodawano 0,5 ml płynu celomatycznego, uzyskując stężenie białka 250  $\mu$ g/ml w każdej z nich.

Po inkubacji w czasie 24, 48 i 72 godziny, do hodowanych komórek dodawano trypsynę, celem całkowitego oderwania komórek od naczynia hodowlanego, a następnie błękit trypanu dla zabarwienia komórek martwych. Następnie liczono ilość martwych i żywych komórek nowotworowych w komorze Börkera. Badanie powtarzano trzykrotnie. Procent komórek martwych w stosunku do kontroli stanowiącej 100% komórek nowotworowych, przedstawiono jako współczynnik cytotoksyczności w tabeli 3.

Dodatkowo, naczynia z hodowlą kontrolną zawierającą same komórki rakowe oraz hodowle komórek nowotworowych z płynami według wynalazku inkubowanymi w temp. 75 i 90°C, a także z płynem surowym, poddano obserwacji pod mikroskopem optycznym z odwróconym polem.

Obrazy mikroskopowe oznaczone na rysunku jako fig. 10 do 13, przedstawiają kolejno:

fig. 10 – kontrola – komórki raka płuc,

fig. 11 – komórki raka płuc po działaniu płynu celomatycznego inkubowanego w temp. 75°C,

fig. 12 – komórki raka płuc po działaniu płynu celomatycznego inkubowanego w temp. 90°C,

fig. 13 – komórki raka płuc po działaniu płynu celomatycznego surowego, bez ogrzewania.

Jak wykazano w powyższych przykładach, płyn celomatyczny z dżdżownicy *Dendrobaena veneta*, po oddzieleniu celomocytów i inkubacji w temp. 70–80°C, wykazuje bardzo efektywne działanie uszkodzające komórki raka płuc, przy jednoczesnym braku cytotoksyczności w stosunku do fibroblastów i komórek krwi ludzkiej.

Wprawdzie płyn celomatyczny surowy, bez inkubacji, wykazuje dużą aktywność przeciwnowotworową, ale jest jednocześnie toksyczny względem fibroblastów i komórek krwi.

Z kolei płyn inkubowany w temperaturach 90 i 100°C, nie wykazuje cytotoksyczności w stosunku do fibroblastów i komórek krwi ludzkiej, ale jednocześnie nie wykazuje działania cytotoksycznego w stosunku do komórek raka płuc.

### **Zastrzeżenie patentowe**

1. Płyn celomatyczny dżdżownicy *Dendrobaena veneta* do zastosowania w leczeniu raka płuc, po oddzieleniu celomocytów i koagulacji toksycznych białek w temperaturze 70–80°C.

## Rysunki

Tabela 1.

Temperatura inkubacji ( °C)	% MARTWYCH KOMÓREK FIBROBLASTÓW		
	CZAS INKUBACJI (godz.)		
	24 h	48 h	72 h
40	70	80	90
50	50	60	70
60	10	20	30
70	0	0	0
80	0	0	0
90	0	0	0
100	0	0	0
płyn surowy /nieogrzew./	80	90	90

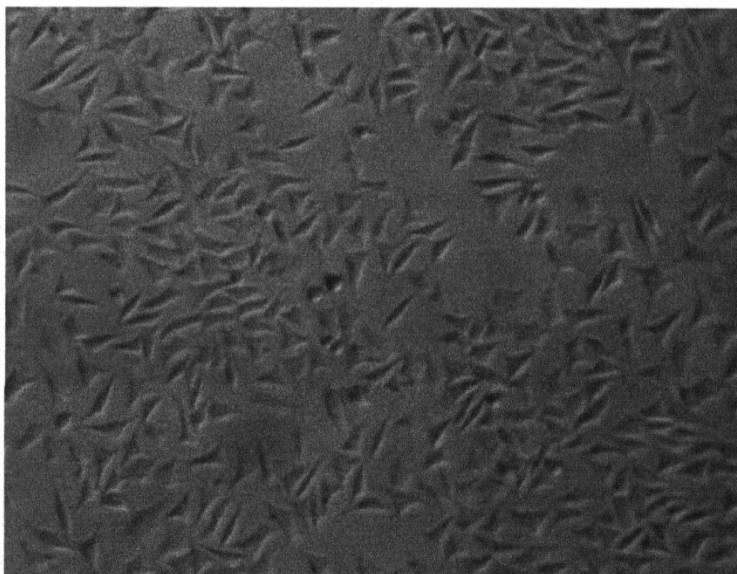


Fig.1

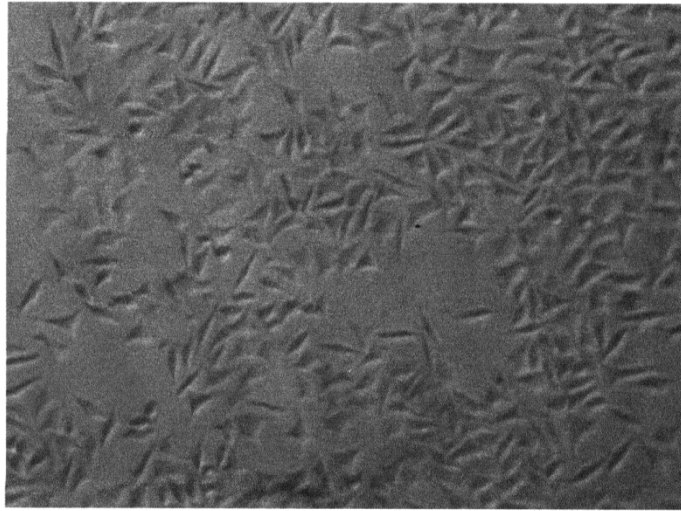


Fig.2

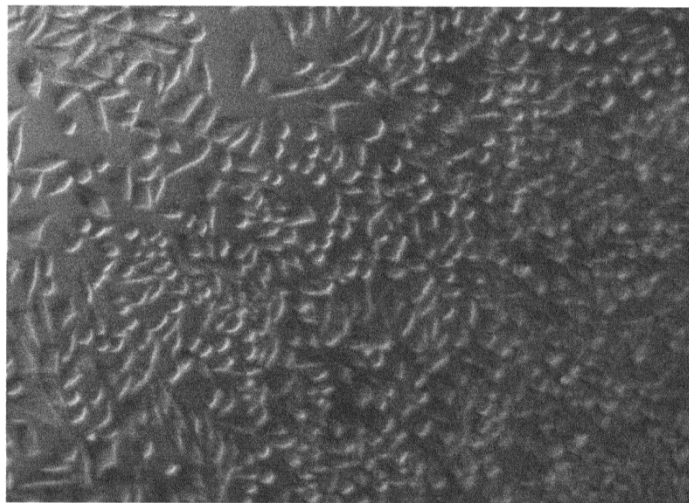


Fig. 3

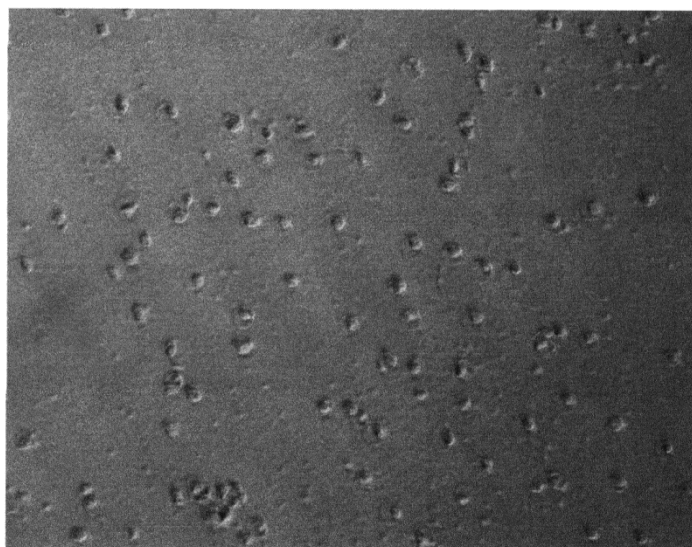


Fig. 4

Tabela 2

PARAMETRY	CZAS	Próbka I (kontrola)	Próbka II (płyn surowy)	Próbka III płyn ogrzany 80°C
RBC – ilość erytrocytów ( $\times 10^6$ kom/ $\mu$ l)	5 min.	3,73	0	3,74
	60 min.	3,77	0	3,72
	300 min.	3,93	0	3,65
MCV – średnia objętość erytrocytów (fL)	5 min.	81,6	0	81,2
	60 min.	81,0	0	82,0
	300 min.	83,0	0	82,0
MCH – średnia masa hemoglobiny w erytrocytach (Pg)	5 min.	28,7	0	28,8
	60 min.	28,6	0	28,6
	300 min.	28,1	0	28,8
WBC – ilość leukocytów ( $\times 10^3$ kom/ $\mu$ l)	5 min.	4,37	0	4,5
	60 min.	4,21	0	4,8
	300 min.	4,20	0	4,9
PLT – ilość trombocytów ( $\times 10^3$ kom/ $\mu$ l)	5 min.	159	0	152
	60 min.	153	0	145
	300 min.	155	0	151

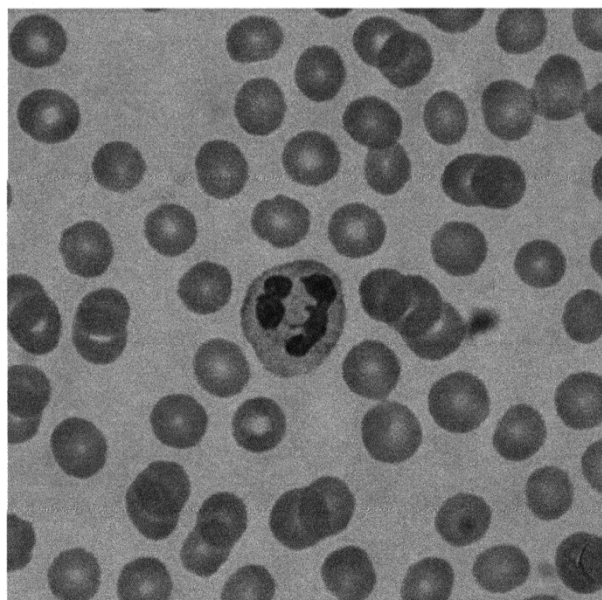


Fig.5

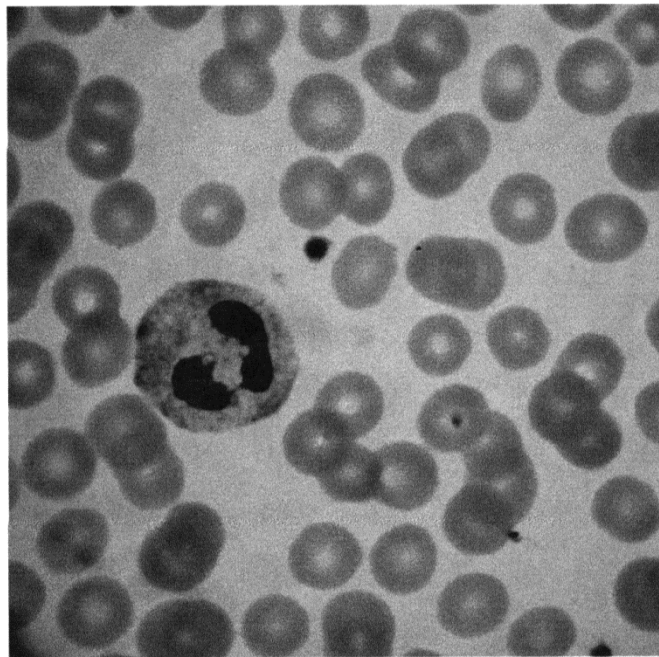


Fig.6

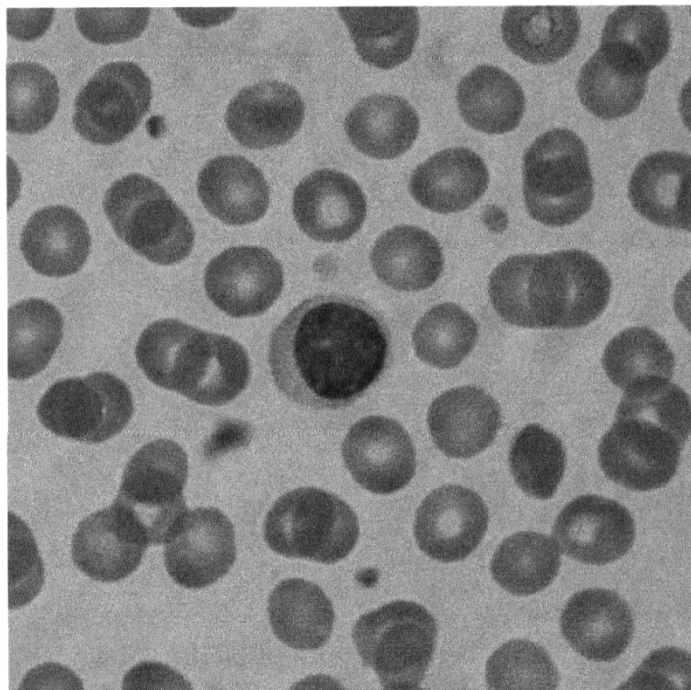


Fig.7

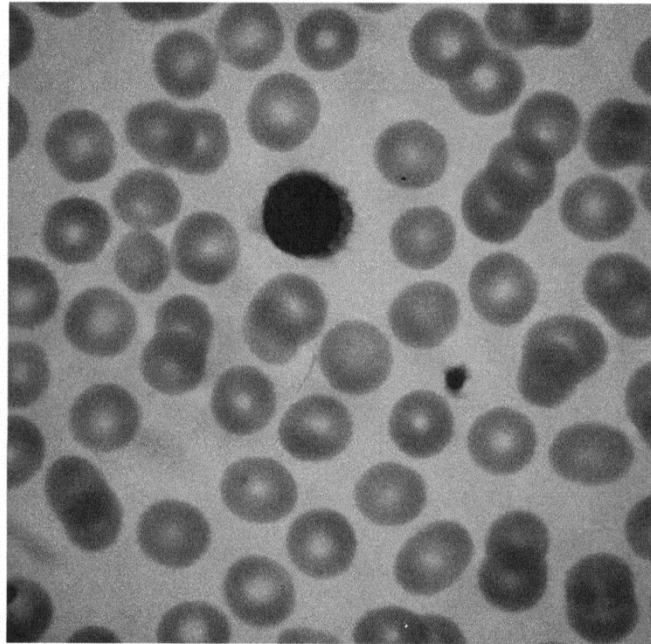


Fig.8

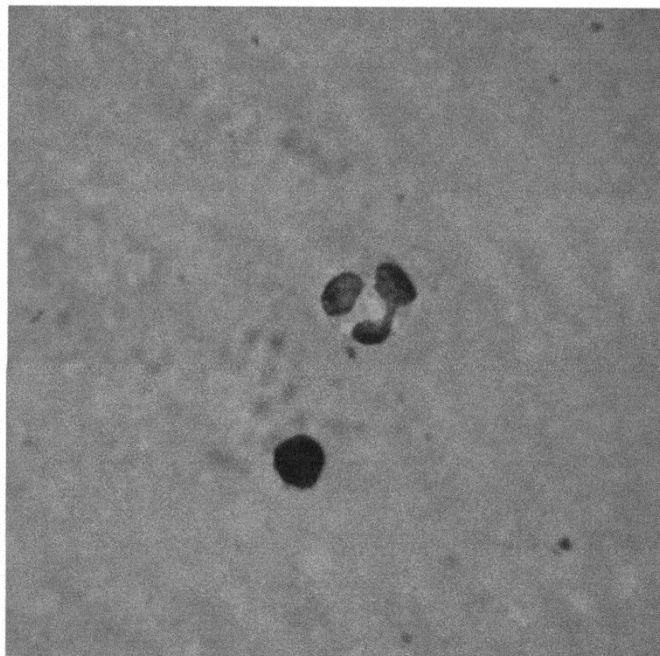


Fig. 9

Tabela.3

Hodowla komórek rakowych A549 z płynem celomatycznym inkubowanym w temperaturach	% MARTWYCH KOMÓREK RAKA PŁUC CZAS INKUBACJI (GODZ)		
	24h	48h	72h
	KONTROLA same komórki A549	0	0
70 <sup>0</sup> C	50	65	75
80 <sup>0</sup> C	45	50	60
90 <sup>0</sup> C	0	0	0
100 <sup>0</sup> C	0	0	0
płyn nieogrzewany	80	90	95

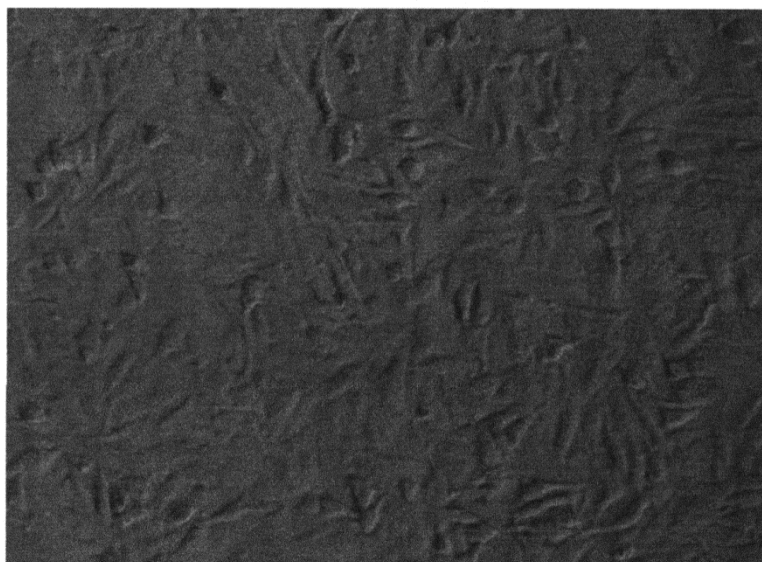


Fig. 10

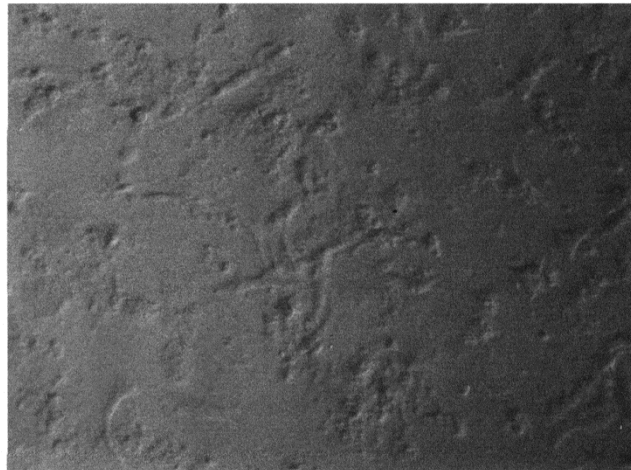


Fig.11

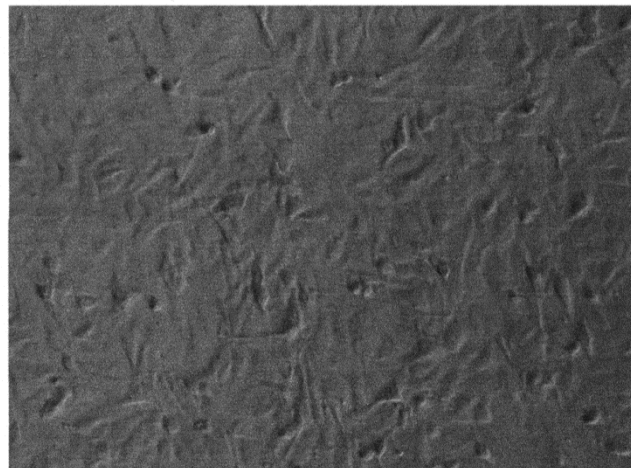


Fig. 12



Fig.13

