

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 245449 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **435352**

(22) Data zgłoszenia: **2020.09.18**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.03.21 BUP 12/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.08.05 WUP 32/2024**

(51) MKP:

A61K 35/618 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

- | | |
|--|---|
| | <p>(73) Uprawniony z patentu:
SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA
WIEJSKIEGO W WARSZAWIE, Warszawa, PL</p> <p>(72) Twórca(-y) wynalazku:
MAGDALENA MATUSIEWICZ, Warszawa, PL
IWONA KOSIERADZKA, Warszawa, PL
TOMASZ NIEMIEC, Falenty, PL
KLARA ZGLIŃSKA, Warszawa, PL
KAROLINA MARCZAK, Koźmierz, PL
BARBARA KWIECIŃSKA, Warszawa, PL
JULIA KUPIS, Pułtusk, PL</p> <p>(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Anna Rożkowicz, Wrocław, PL</p> |
|--|---|

(54) Tytuł:

Sposób otrzymywania preparatu i wodnego ekstraktu z liofilizowanych jaj ślimaków *Helix aspersa aspersa* i zastosowanie otrzymanego preparatu i jego wodnego ekstraktu w terapii raka jelita grubego

PL 245449 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania preparatu i wodnego ekstraktu z liofilizowanych jaj ślimaków *Helix aspersa aspersa* i zastosowanie otrzymanych preparatów jako ważnego źródła naturalnych związków wykazujących działanie przeciwnowotworowe, zwłaszcza w terapii nowotworu jelita grubego.

W 2018 r. nowotwór jelita grubego zajął trzecie miejsce pod względem częstości występowania spośród nowotworów na świecie, z szacowaną liczbą 1,8 miliona nowych przypadków i drugie miejsce pod względem śmiertelności, z 881 000 zgonów (Bray, F. et al., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J. Clin. 2018, 68, 394–424). Predyspozycje do rozwoju nowotworu jelita grubego są dziedziczne, około 12–35% ryzyka przypisuje się czynnikom genetycznym (Rejhova, A. et al., Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. Eur. J. Med. Chem. 2018, 144, 582–594). Na wzrost zapadalności na nowotwór jelita grubego wpływają nieprawidłowe wzorce żywieniowe, otyłość i czynniki związane ze stylem życia, a ryzyko tej choroby można zmniejszyć poprzez odpowiednie nawyki żywieniowe i styl życia (Rejhova, A. et al., Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. Eur. J. Med. Chem. 2018, 144, 582–594; Arnold, M. et al., Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. Gut 2017, 66, 683–691). Nowotwór ten wykazuje liniową progresję od normalnego nabłonka jelita grubego do inicjacji gruczolaka i transformacji złośliwej do raka, a nawet do przerzutów (Vogelstein, B. et al., Cancer genome landscapes. Science 2013, 339, 1546–1558). Zapobieganie nowotworowi jelita grubego we wszystkich etapach, w tym inicjacji i progresji, ma znaczenie społeczne i kliniczne. Konwencjonalne leczenie oparte na operacji chirurgicznej z chemioterapią/bez chemioterapii i/lub radioterapią, przed operacją chirurgiczną lub po niej, jest często nieskuteczne ze względu na nawrót choroby (Redondo-Blanco, S. et al., New insights toward colorectal cancer chemotherapy using natural bioactive compounds. Front. Pharm. 2017, 8, 109; van der Stok et al., Surveillance after curative treatment for colorectal cancer. Nat. Rev. Clin. Oncol. 2017, 14, 297). Działania niepożądane, związane z tą terapią, obniżają jakość życia pacjentów i mogą mieć negatywny wpływ na przebieg, wynik i koszty leczenia (Rejhova, A. et al., Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. Eur. J. Med. Chem. 2018, 144, 582–594). Obiecującym podejściem w minimalizowaniu negatywnych skutków konwencjonalnego leczenia może być terapia kombinowana z zastosowaniem konwencjonalnych chemioterapeutyków lub radioterapii i związku naturalnego (związków naturalnych) o znaczącym działaniu farmakologicznym (Rejhova, A. et al., Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. Eur. J. Med. Chem. 2018, 144, 582–594; Redondo-Blanco, S. et al., New insights toward colorectal cancer chemotherapy using natural bioactive compounds. Front. Pharm. 2017, 8, 109; Nobili, S. et al., Natural compounds for cancer treatment and prevention. Pharm. Res 2009, 59, 365–378). Terapia kombinowana jest ukierunkowana na wiele szlaków metabolicznych, wykorzystuje wiele mechanizmów w celu zmniejszenia rozwoju oporności na chemioterapeutyki, zwiększa wrażliwość na działanie leków przeciwnowotworowych (Housman, G. et al., Drug resistance in cancer: an overview. Cancers 2014, 6, 1769–1792). Ostatnie badania podkreślają znaczenie terapii kombinowanej i wskazują na jej większą skuteczność w porównaniu do stosowania konwencjonalnych chemioterapeutyków (Singh, C.K. et al., Resveratrol-based combinatorial strategies for cancer management. Ann N. Y. Acad Sci 2013, 1290, 113–121).

Podkreślić należy, że niektóre związki naturalne mogą modulować szlaki sygnałowe i ekspresję genów związanych z proliferacją, apoptozą i różnicowaniem komórek, angiogenezą i przerzutami (Pan, M.H. et al., Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. Mol Nutr Food Res 2011, 55, 32–45).

Długotrwałe spożycie przeciwutleniaczy (antyoksydantów) może zmniejszać częstość występowania nowotworu jelita grubego u szczurów, poprzez zmniejszenie stresu oksydacyjnego (Cai, F. et al., Role of polyunsaturated fatty acids and lipid peroxidation on colorectal cancer risk and treatments. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 2012, 15, 99–106). Przeciwutleniacze mogą również wpływać korzystnie na nasilenie zapalenia jelita grubego, stan zapalny i stan przednowotworowy nowotworu jelita grubego, poprzez zmniejszenie podwyższonego poziomu dialdehydu malonowego (ang. malondialdehyde, MDA).

Jednymi z głównych związków stanowiących o potencjale antyoksydacyjnym są fenole (Dai, J. and Mumper, R.J., Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules 2010, 15, 7313–7352). Fenole to związki mogące w określonych warunkach inicjować

proces samoutlenienia, a dzięki temu mogą zachowywać się jak prooksydanty. Do takich warunków zalicza się np. wysokie pH, wysokie stężenia jonów metali przejściowych, Cu^{2+} , Fe^{3+} , obecność cząsteczek tlenu (Dai, J. and Mumper, R.J., Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 2010, 15, 7313–7352; León-González, A.J. et al., Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* 2015, 98, 371–380). Duże stężenie fenoli sprzyja także ich prooksydacyjnemu działaniu (León-González, A.J. et al., Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* 2015, 98, 371–380). Dodatkowo, fenole o małej masie cząsteczkowej są łatwo utleniane i wykazują aktywność prooksydacyjną (np. kwercetyna, kwas galusowy), w odróżnieniu od tych o dużej masie cząsteczkowej (np. garbniki skondensowane i hydrolizujące), które posiadają niewielką aktywność prooksydacyjną lub w ogóle jej nie posiadają (Dai, J.; Mumper, R.J., Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 2010, 15, 7313–7352).

Indukowana fenolami produkcja reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS) wydaje się odgrywać kluczową rolę w inicjacji apoptozy, chociaż ROS są także produkowane w jej konsekwencji (León-González, A.J. et al., Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* 2015, 98, 371–380). Dowody na powiązaną z działaniem prooksydacyjnym aktywność cytotoksyczną fenoli są liczne. Jest ona związana z indukcją apoptozy i zatrzymaniem cyklu komórkowego, na drodze różnych ścieżek.

Antrachinon emodyna, poprzez produkcję ROS, uwrażliwił oporne na cisplatynę komórki ludzkiego gruczolakoraka jajnika COC1/DDP na apoptozę indukowaną cisplatyną. Ponadto emodyna ograniczyła ekspresję białka oporności wielolekowej 1 (ang. multidrug resistance-related protein 1, MRP1), poprzez mechanizm powiązany z ROS (Ma, J. et al., Emodin augments cisplatin cytotoxicity in platinum-resistant ovarian cancer cells via ROS-dependent MRP1 downregulation. *Biomed Res Int*, 2014, 107671).

Aktywność prooksydacyjna niektórych polifenoli, w niecytotoksycznych stężeniach, może uwrażliwiać komórki nowotworowe na inne terapie nowotworowe (León-González, A.J. et al., Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* 2015, 98, 371–380).

Flawanole pochodzące z zielonej herbaty, katechiny i galusan epigallokatechiny, mogą działać jako prooksydanty i wykazywać aktywność cytotoksyczną przeciwko komórkom nowotworowym (Lambert, J.D. and Elias, R.J., The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Arch. Biochem. Biophys.* 2010, 501, 65–72). Traktowanie galusanem epigallokatechiny komórek nowotworowych jelita grubego HT-29 skutkowało zwiększoną produkcją ROS, ograniczeniem proliferacji i uwrażliwieniem chemioopornych komórek na 5-fluorouracyl (Hwang, J.T. and Kim, Y.M., Selenium regulates cyclooxygenase-2 and extracellular signalregulated kinase signaling pathways by activating AMP-activated protein kinase in colon cancer cells. *Cancer Res.* 2006, 66, 10057–10063).

Indukowane przez fenole ROS mogą wchodzić w interakcje z makromolekułami komórkowymi, przyczyniając się do niszczenia DNA, peroksydacji lipidów i oksydacji białek, samodzielnie lub w obecności metali przejściowych (Oikawa, S. et al., Catechins induce oxidative damage to cellular and isolated DNA through the generation of reactive oxygen species. *Free Radic. Res.* 2003, 37, 881–890).

Pomimo, że wykazano na modelach zwierzęcych, że fenole, takie jak katechiny, hamują tumorigenezę i wzrost komórek nowotworowych, rola ROS w tych procesach i potencjalne prooksydacyjne mechanizmy *in vivo* są nadal słabo poznane (León-González, A.J. et al., Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* 2015, 98, 371–380).

Galusan epigallokatechiny wykazał aktywność cytotoksyczną przeciw ludzkim komórkom nowotworu płuc H1299, zarówno *in vitro*, jak i w przypadku guzów *in vivo*. Po traktowaniu galusanem epigallokatechiny, odnotowano dawkozależne ograniczenie żywotności komórek nowotworowych *in vitro*, na drodze indukcji wewnątrzkomórkowych i mitochondrialnych ROS. Odnotowano dawkozależne zahamowanie wzrostu guzów, czemu towarzyszyła apoptoza komórek guza i uszkodzenia oksydacyjne DNA. Zwiększenia poziomu markera oksydacyjnych uszkodzeń DNA nie odnotowano natomiast w tkankach gospodarza (Li, G.X. et al., Pro-oxidative activities and dose-response relationship of (-)-epigallocatechin-3-gallate in the inhibition of lung cancer cell growth: a comparative study *in vivo* and *in vitro*. *Carcinogenesis* 2010, 31, 902–910). Sugeruje się, że prooksydacyjna

aktywność galusanu epigallokatechiny jest także związana ze wzrostem stężenia 5-fluorouracylu w osoczu szczurów, dzięki hamowaniu głównego enzymu zaangażowanego w jego katabolizm (Qiao, J. et al., Effect of green tea on pharmacokinetics of fluorouracil in rats and pharmacodynamics in human lines in vitro. *Food Chem. Toxicol.* 2011, 49, 1410–1415). Badania sugerują, że spożycie zielonej herbaty, bogatej w galusan epigallokatechiny, może wpływać na farmakokinetykę chemioterapeutyków.

Peroksydacja wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (ang. polyunsaturated fatty acids, PUFA) przyczynia się do zwiększenia stresu oksydacyjnego, a w konsekwencji do stanu zapalnego, jednego z czynników rozwoju nowotworu jelita grubego (Cai, F. et al., Role of polyunsaturated fatty acids and lipid peroxidation on colorectal cancer risk and treatments. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2012, 15, 99–106). Peroksydacja lipidów powoduje przerwanie błon komórkowych i wytworzenie reaktywnych związków karbonylowych, alkanów i ketonów. Ze związków tych powstają produkty końcowe, pośród których najbardziej mutageny jest MDA, a najbardziej toksyczny – 4-hydroksy-2-nonenal (4-HNE). Produkty końcowe mogłyby być wykorzystane do wykrywania nowotworu jelita grubego i nadzoru nad leczeniem. MDA reaguje z zasadami kwasów nukleinowych i tworzy addukty, co może skutkować apoptozą lub indukcją mutacji genetycznych. Co więcej, MDA i 4-HNE tworzą addukty z czynnikiem elongacji (ang. elongation factor two) w rybosomie, co w konsekwencji wpływa na ograniczenie lub zakłócenie syntezy białka, co często można zaobserwować podczas rozwoju nowotworu. Toksyczne właściwości 4-HNE są związane z jego wysoką reaktywnością chemiczną i długim okresem półtrwania. Reaguje głównie z białkami i receptorami związanymi z kinazą tyrozynową, ale także powoduje poważne uszkodzenia DNA. Prowadzi to do modyfikacji sygnalizacji komórkowej, cyklu komórkowego i inhibicji lub aktywacji powiązanych enzymów. 4-HNE hamuje wzrost komórek, w niskich stężeniach zwiększa ich proliferację. 4-HNE jest potencjalnym mediatorem przejścia przepuszczalności mitochondriów, reaguje z ATP-azą wapniową, co może zakłócać homeostazę wapnia i indukować śmierć komórki. 4-HNE może zwiększać stres oksydacyjny, promować zużycie glutationu w komórkach. 4-HNE modyfikuje aktywność białka supresorowego nowotworu, co wiąże się z przewlekłym stanem zapalnym.

4-HNE może hamować wzrost linii komórkowych nowotworu jelita grubego Caco-2 i HT-29. Działanie przeciwnowotworowe może być związane ze zmianą poziomu stresu oksydacyjnego, a w konsekwencji z indukcją apoptozy i hamowaniem aktywności telomerazy. Koniugaty glutationu z 4-HNE są już stosowane w niektórych modelach nowotworów jako środki chemioterapeutyczne.

Ze względu na fakt, że metabolizm komórek nowotworowych w dużej mierze jest oparty na glikolizie, zaprojektowano diety wysokobiałkowe i niskowęglowodanowe, w celu sprawdzenia, czy poziom glukozy we krwi i wzrost nowotworu mogą być ograniczone (Ho, V.W. et al., A low carbohydrate, high protein diet slows tumor growth and prevents cancer initiation. *Cancer Res.* 2011, 71, 4484–4493). Zarówno ludzki nowotwór jelita grubego, jak i nowotwór myszy (murine squamous cell carcinoma VII) wzrastały wolniej u myszy otrzymujących dietę wysokobiałkową i niskowęglowodanową w porównaniu z dietą zachodnią, niskobiałkową i bogatą w węglowodany.

Wykazano silną zależność między niskim poziomem witaminy D a chorobami przewlekłymi, a także ostrymi stanami i śmiertelnością. Zaobserwowano również powiązania witaminy D z homeostazą energetyczną oraz regulacją układu odpornościowego i hormonalnego (Bouillon, R. et al., Vitamin D and energy homeostasis: of mice and men. *Nat Rev Endocrinol* 2014, 10, 79–87).

Witamina D i wapń, jako ważne składniki odżywcze dla organizmu ludzkiego, zostały uznane jako potencjalne czynniki chemoprewencyjne i przyciągnęły znaczną uwagę onkologów (Huang, D. et al., Additively protective effects of vitamin D and calcium against colorectal adenoma incidence, malignant transformation and progression: A systematic review and meta-analysis. *Clin Nutr* 2019).

Wysoki poziom krążącej 25(OH)D zmniejszał ryzyko wystąpienia gruczolaka jelita grubego. Istniał negatywny związek między krążącą 25(OH)D a ryzykiem gruczolaka jelita grubego u kobiet (interakcja między estrogenem i witaminą D), ale nie u mężczyzn. Działanie ochronne krążącej 25(OH)D przeciw gruczolakowi jelita grubego było bardziej wyraźne w grupie o wysokim spożyciu wapnia, w porównaniu z grupą o niskim spożyciu wapnia. Ponadto częstość występowania gruczolaka jelita grubego była odwrotnie powiązana z poziomem 25(OH)D w populacji europejskiej i amerykańskiej, ale nie w populacji azjatyckiej.

Zaobserwowano zależność między występowaniem gruczolaka jelita grubego a całkowitym spożyciem witaminy D.

Całkowite spożycie wapnia, dietetyczne spożycie wapnia i suplementarne spożycie wapnia były negatywnie skorelowane z ryzykiem wystąpienia gruczolaka jelita grubego. Większe całkowite i dietetyczne spożycie wapnia było związane z mniejszym ryzykiem gruczolaka jelita grubego w populacji azjatyckiej, europejskiej i amerykańskiej.

Istniał silny negatywny związek między krążącą 25(OH)D a ryzykiem nowotworu jelita grubego. Wysoki poziom krążącej 25(OH)D był związany z tendencją do mniejszego ryzyka nowotworu jelita grubego u kobiet, ale efektu tego nie stwierdzono u mężczyzn. Ochronny efekt krążącej 25(OH)D stwierdzono w przypadku lewostronnego nowotworu jelita grubego (okrężnica dystalna i odbytnica), ale nie w przypadku prawostronnego nowotworu jelita grubego (okrężnica proksymalna). Wysokie stężenie krążącej 25(OH)D wykazało działanie ochronne przeciwko nowotworowi jelita grubego tylko przy wysokim poziomie spożycia wapnia. Dodatkowo, wyższe stężenie krążącej 25(OH)D było związane z niższą częstością występowania nowotworu jelita grubego w populacji europejskiej i amerykańskiej.

Istniał negatywny związek między ryzykiem wystąpienia nowotworu jelita grubego a całkowitym spożyciem witaminy D, dietetycznym spożyciem witaminy D i suplementarnym spożyciem witaminy D. Całkowite spożycie witaminy D wiązało się z efektem ochronnym przeciwko nowotworowi jelita grubego u kobiet i lewostronnemu nowotworowi jelita grubego. Wyższe dietetyczne spożycie witaminy D było również związane z niższym ryzykiem wystąpienia nowotworu jelita grubego u kobiet.

Stwierdzono znaczący efekt ochronny przeciwko nowotworowi jelita grubego dla całkowitego spożycia wapnia, dietetycznego spożycia wapnia i suplementarnego spożycia wapnia. Ponadto sprawdzono związek między każdym sposobem przyjmowania wapnia a ryzykiem wystąpienia nowotworu jelita grubego według płci, lokalizacji guza i grupy etnicznej, co wykazało, że wszystkie trzy sposoby przyjmowania wapnia mogą wpływać na zmniejszenie ryzyka nowotworu jelita grubego, z wyjątkiem całkowitego spożycia wapnia dla prawostronnego nowotworu jelita grubego.

Pacjenci z wyższym stężeniem krążącej 25(OH)D, w porównaniu z pacjentami z niższym stężeniem krążącej 25(OH)D, wykazywali korzystniejsze wyniki kliniczne z wyższą całkowitą przeżywalnością i przeżywalnością specyficzną dla nowotworu jelita grubego. Nie stwierdzono jednak związku między spożyciem wapnia a całkowitą przeżywalnością i przeżywalnością specyficzną dla nowotworu jelita grubego.

Zwiększenie całkowitego spożycia witaminy D o każde 200 IU/dobę wiązało się z 10% zmniejszeniem ryzyka wystąpienia gruczolaka jelita grubego i 5% spadkiem ryzyka wystąpienia nowotworu jelita grubego. Zwiększenie całkowitego spożycia wapnia o każde 400 mg/dobę wiązało się z 2% zmniejszeniem ryzyka wystąpienia gruczolaka jelita grubego i 5% spadkiem ryzyka wystąpienia nowotworu jelita grubego.

Witamina D i wapń odgrywają addytywnie rolę chemoprewencyjną wobec gruczolaka jelita grubego, przeciwdziałają jego złośliwej transformacji i progresji, szczególnie u kobiet i u pacjentów z jego lewostronną lokalizacją.

Kalcytriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) wpływa na większość typów komórek jelitowych, eksprymujących geny receptora witaminy D (ang. vitamin D receptor, VDR) i na wiele linii komórkowych nowotworu jelita grubego, które zawierają wystarczającą ilość VDR (Ferrer-Mayorga, G. et al., Mechanisms of action of vitamin D in colon cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2019, 185, 1–6). Kalcytriol hamuje proliferację, uwrażliwia na apoptozę i promuje różnicowanie komórek nowotworu jelita grubego i innych typów komórek nowotworowych, poprzez regulację genów i modulację szlaków sygnałowych związanych z tymi procesami.

Kalcytriol jest antagonistą szlaku sygnałowego Wnt/ β -kateniny, którego nieprawidłowa aktywacja jest głównym czynnikiem przyczyniającym się do progresji nowotworu jelita grubego (Larriba, M.J. et al., Vitamin D is a multilevel repressor of Wnt/b-catenin signaling in cancer cells. *Cancers* 2013, 5, 1242–1260).

Opisano niegenomowe (niezależne od transkrypcji) działanie kalcytriolu, w którym pośredniczą pozajądrowe VDR lub alternatywne receptory (Ferrer-Mayorga, G. et al., Mechanisms of action of vitamin D in colon cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2019, 185, 1–6). W komórkach nowotworu jelita grubego kalcytriol indukuje szlak sygnałowy niezależny od transkrypcji, który obejmuje szybki wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} (z pożywki zewnętrznej), a następnie aktywację małej GTPazy RhoA i kinaz ROCK, p38MAPK i MSK1. Aktywacja tego szlaku zależy od VDR i jest wymagana do

hamowania szlaku Wnt/ β -kateniny (Ordóñez-Morán, P. et al., RhoA-ROCK and p38MAPK-MSK1 mediate vitamin D effects on gene expression, phenotype, and Wnt pathway in colon cancer cells. *J. Cell Biol.* 2008, 183, 697–710).

Kalcytriol promuje różnicowanie nabłonkowe komórek nowotworu jelita grubego, w wyniku regulacji genów i ingerencji w szlak sygnałowy Wnt/ β -kateniny (Ferrer-Mayorga, G. et al., Mechanisms of action of vitamin D in colon cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2019, 185, 1–6). Wśród genów różnicowania, których ekspresja jest zwiększana przez kalcytriol, jest kilka kodujących markery nabłonka jelitowego oraz białka adhezji międzykomórkowej i cytoszkieletu (Pálmer, H.G. et al., Genetic signatures of differentiation induced by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 2003, 63, 7799–7806; Fujita, H. et al., Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca²⁺ absorption between enterocytes. *Mol Biol Cell* 2008, 19, 1912–1921).

Ponadto kalcytriol moduluje ekspresję wielu regulatorów różnicowania komórek (Ferrer-Mayorga, G. et al., Mechanisms of action of vitamin D in colon cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2019, 185, 1–6). Kalcytriol indukuje ekspresję *CST5*/cystatyny D, znanej z kodowania inhibitora endosomalnych proteaz cysteinowych z rodziny katepsyn, która częściowo lokalizuje się w jądrze i reguluje ekspresję kilku genów biorących udział w różnych funkcjach komórkowych (Valle, N. et al., Cystatin D is a candidate tumor suppressor gene induced by vitamin D in human colon cancer cells. *J. Clin. Invest.* 2009, 119, 2343–2358; Ferrer-Mayorga, G. et al., Cystatin D locates in the nucleus at sites of active transcription and modulates gene and protein expression. *J Biol Chem* 2015, 290, 26533–26548). Ponadto nadekspresja cystatyny D w komórkach nowotworu jelita grubego hamuje proliferację i migrację komórek, ale zwiększa ich adhezję. W biopsjach ludzkiego nowotworu jelita grubego poziomy białka cystatyny D i VDR są bezpośrednio skorelowane, co sugeruje regulację *in vivo* (Valle, N. et al., Cystatin D is a candidate tumor suppressor gene induced by vitamin D in human colon cancer cells. *J. Clin. Invest.* 2009, 119, 2343–2358). Kalcytriol hamuje w komórkach nowotworu jelita grubego ekspresję *SPROUTY-2*, onkogennego represora fenotypu nabłonkowego (Barbáchano, A. et al., *SPROUTY-2* and E-cadherin regulate reciprocally and dictate colon cancer cell tumorigenicity. *Oncogene* 2010, 29, 4800–4813). *SPROUTY-2* dereguluje E-kadherynę i ciasne połączenia oraz geny polaryzacji nabłonkowej, poprzez zwiększenie poziomu ekspresji *ZEB1*, promując przejście nabłonkowo-mezenchymalne i proliferację. Nadekspresja *SPROUTY-2* wiąże się ze złym wynikiem klinicznym pacjentów z nowotworem jelita grubego (Barbáchano, A. et al., *SPROUTY-2* and E-cadherin regulate reciprocally and dictate colon cancer cell tumorigenicity. *Oncogene* 2010, 29, 4800–4813; Barbáchano, A. et al., *SPROUTY-2* represses the epithelial phenotype of colon carcinoma cells via upregulation of *ZEB1* mediated by *ETS1* and *miR-200/miR-150*. *Oncogene* 2016, 35, 2991–3003; Ordóñez-Morán, P. et al., *SPROUTY2* is a β -catenin and *FOXO3a* target gene indicative of poor prognosis in colon cancer. *Oncogene* 2014, 33, 1975–1985). Kalcytriol zwiększa ekspresję *JMJD3* (ang. histone H3 lysine-27 demethylase Jumonji C domain-containing protein 3, *KDM6B*) i moduluje ekspresję innych regulatorów epigenetycznych, które mają istotny wpływ na biologię komórek nowotworowych jelita grubego (Pereira, F. et al., *KDM6B/JMJD3* histone demethylase is induced by vitamin D and modulates its effects in colon cancer cells. *Hum. Mol. Genet.* 2011, 20, 4655–4665; Meyer, M.B. et al., *VDR/RXR* and *TCF4*/ β -catenin cistromes in colonic cells of colorectal tumor origin: impact on *c-FOS* and *c-MYC* gene expression. *Mol. Endocrinol.* 2012, 26, 37–51; Padi, S.K. et al., *MicroRNA-627* mediates the epigenetic mechanisms of vitamin D to suppress proliferation of human colorectal cancer cells and growth of xenograft tumors in mice. *Gastroenterology* 2013, 145, 437–446; Pereira, F. et al., Vitamin D has wide regulatory effects on histone demethylase genes. *Cell Cycle* 2012, 11, 1081–1089). Co ważne, *JMJD3* częściowo pośredniczy w niektórych efektach kalcytriolu w komórkach nowotworu jelita grubego: promowaniu różnicowania, ograniczaniu proliferacji, regulacji genów i antagonizmie szlaku Wnt/ β -kateniny. Ponadto represja *JMJD3* zwiększa ekspresję kilku induktorów przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego i markerów mezenchymalnych oraz zmniejsza ekspresję białek nabłonkowych. Poziom RNA *JMJD3* koreluje bezpośrednio z poziomem RNA *VDR* w ludzkich nowotworach jelita grubego (Pereira, F. et al., *KDM6B/JMJD3* histone demethylase is induced by vitamin D and modulates its effects in colon cancer cells. *Hum. Mol. Genet.* 2011, 20, 4655–4665). Dane te pokazują, że kalcytriol jest silnym induktorem różnicowania nabłonkowego jelita grubego, który zapobiega przejściu nabłonkowo-mezenchymalnemu poprzez regulację genów zaangażowanych w kilka mechanizmów i szlaków sygnałowych (Larriba, M.J. et al., Muñoz, A. Vitamin D and the epithelial to mesenchymal transition. *Stem Cells Int.* 2016, 6213872).

Kalcytriol uwrażliwia komórki nowotworu jelita grubego na indukcję apoptozy poprzez zwiększenie ekspresji genów proapoptotycznych, zmniejszenie ekspresji genów przeżycia oraz, w sposób parakrynowy, poprzez zakłócenie sekrecji IL-1 β przez makrofagi (Kaler, P. et al., Macrophage-derived IL-1 β stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: a crosstalk interrupted by vitamin D3. *Oncogene* 2009, 28, 3892–3902). Agoniści VDR nasilają wpływ chemioterapeutyków na hodowle komórkowe i modele zwierzęce nowotworu jelita grubego (Barbáchano, A. et al., Feldman, D. (Ed.), *Vitamin D and Colon Cancer*, in *Vitamin D*, 2 Academic Press-Elsevier, 2018, pp. 837–862).

Kalcytriol hamuje ekspresję DKK-4, który promuje inwazję, angiogenezę i chemiooporność komórek nowotworu jelita grubego i którego ekspresja jest zwiększona w ludzkich nowotworach jelita grubego i odwrotnie koreluje z poziomem ekspresji RNA VDR (Pendás-Franco, N. et al., J.M. DICKKOPF-4 is induced by TCF/ β -catenin and upregulated in human colon cancer, promotes tumour cell invasion and angiogenesis and is repressed by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D³. *Oncogene* 2008, 27, 4467–4477; Ebert, M.P. et al., TFAP2E-DKK4 and chemoresistance in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2012, 366, 44–53). Ponadto kalcytriol reguluje angiogeny fenotyp komórek nowotworowych jelita grubego poprzez kontrolowanie ekspresji kilku genów, które są za to odpowiedzialne (Ben-Shoshan, M. et al., 1 α ,25-dihydroxyvitamin D³ (Calcitriol) inhibits hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway in human cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 2007, 6, 1433–1439; Fernandez-Garcia, N.I. et al., 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of Id1 and Id2 genes and the angiogenic phenotype of human colon carcinoma cells. *Oncogene* 2005, 24, 6533–6544).

Kalcytriol reguluje ekspresję kilku mikroRNA (miR) w ludzkich komórkach nowotworu jelita grubego SW480-ADFI (Alvarez-Diaz, S. et al., MicroRNA-22 is induced by vitamin D and contributes to its antiproliferative, antimigratory and gene regulatory effects in colon cancer cells. *Hum. Mol. Genet.* 2012, 21, 2157–2165). Jednym z nich jest miR-22, który jest indukowany przez kalcytriol w sposób zależny od czasu, dawki i VDR oraz częściowo pośredniczy w antyproliferacyjnym i antymigracyjnym działaniu kalcytriolu na komórki nowotworu jelita grubego. Wykazano, że miR-22 hamuje proliferację, migrację, inwazję, przejście nabłonkowo-mezenchymalne i wzrost heteroprzeszczepu guza w kilku systemach nowotworowych, w tym nowotworze jelita grubego (Liu, Y. et al., The Jun/miR-22/HuR regulatory axis contributes to tumourigenesis in colorectal cancer. *Mol. Cancer* 2018, 17, 11; Xu, M. et al., MiR-22 suppresses epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer by inhibiting snail and MAPK1/Slug/vimentin feedback loop. *Cell Death Dis* 2018, 9, 209; Wang, X. et al., Increased circular RNA hsa_circ_0012673 acts as a sponge of miR-22 to promote lung adenocarcinoma proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018, 496, 1069–1075).

Kultury pierwotne fibroblastów związanych z nowotworem (ang. cancer-associated fibroblasts, CAF), pochodzące ze świeżych biopsji pacjentów z nowotworem jelita grubego, ekspresyjają VDR i reagują na kalcytriol (Ferrer-Mayorga, G. et al., Vitamin D receptor expression and associated gene signature in tumour stromal fibroblasts predict clinical outcome in colorectal cancer. *Gut* 2017, 66, 1449–1462). Sygnatura genów CAF zmieniona pod wpływem kalcytriolu koreluje z korzystnymi wynikami pacjentów. Kalcytriol wpływa na ograniczenie dwóch właściwości pronowotworowych aktywowanych fibroblastów: zdolności do zmiany macierzy zewnątrzkomórkowej i zdolności do indukowania migracji komórek nowotworowych jelita grubego.

Jest wysoce prawdopodobne, że kalcytriol wpływa na nowotwór jelita grubego poprzez regulację komórek odpornościowych (Krishnan, A.V.; Feldman, D. Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2011, 51, 311–336).

Suplementacja witaminą D u pacjentów z gruczolakiem jelita grubego zmniejsza stan zapalny, określony na podstawie poziomu szeregu markerów prozapalnych i markera przeciwzapalnego IL-10 w osoczu (Bruns, F.I. et al., Vitamin D-dependent induction of cathelicidin in human macrophages results in cytotoxicity against high-grade B cell lymphoma. *Sci Transl Med* 2015, 7, 282ra47). We wpływie kalcytriolu na cytokiny ulegające nadekspresji u pacjentów z nowotworem jelita grubego pośredniczy przynajmniej częściowo wielopoziomowa inhibicja czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (Cohen-Lahav, M. et al., Vitamin D decreases NF κ B activity by increasing I κ B α levels. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006, 21, 889–897; Chen, Y. et al., Vitamin D receptor inhibits nuclear factor κ B activation by interacting with I κ B kinase β protein. *J. Biol. Chem.* 2013, 288, 19450–19458; Fekrmandi, F. et al., The hormone-bound vitamin D receptor enhances the FBW7-dependent turnover of NF- κ B subunits. *Sci Rep* 2015, 5, 13002). U mysiego modelu zapalenia jelita grubego delecja VDR nabłonka jelita grubego utrudniała apoptozę komórek nabłonkowych, co zmieniało przepuszczalność bariery śluzówkowej i promowało stan zapalny (He, L. et al., Gut epithelial

vitamin D receptor regulates Microbiota-dependent mucosal inflammation by suppressing intestinal epithelial cell apoptosis. *Endocrinology* 2018, 159, 967–979). Ostatnie badanie na zdrowych osobach wykazało, że suplementacja diety w stylu zachodnim, o niskim poziomie witaminy D, kalcytriolem wpłynęła na indukcję ekspresji genów biorących udział w zapaleniu i odpowiedzi immunologicznej, sugerując, że kalcytriol indukuje odporność nabytą (Protiva, P. et al., Calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulate genes of immune and inflammatory pathways in the human colon: a human crossover trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2016, 103, 1224–1231). Wskazuje to na złożoność związku między statusem witaminy D a układem odpornościowym, który prawdopodobnie zależy od dawki i charakteru agonisty VDR (witamina D / cholekalcyferol, kalcytriol) oraz drogi i reżimu podawania.

Innym korzystnym mechanizmem immunologicznym działania kalcytriolu w nowotworze jelita grubego może być nasilenie cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał u pacjentów poddawanych leczeniu przeciwciałami monoklonalnymi (receptor anty-EGF, anty-VEGF) (Bruns, H. et al., Vitamin D-dependent induction of cathelicidin in human macrophages results in cytotoxicity against high-grade B cell lymphoma. *Sci Transl Med* 2015, 7, 282ra47; Zeichner, S.B. et al., Improved clinical outcomes associated with vitamin D supplementation during adjuvant chemotherapy in patients with HER2+ nonmetastatic breast cancer. *Clin. Breast Cancer* 2015, 15, e1–e11; Bittenbring, J.T. et al., Vitamin D deficiency impairs rituximab-mediated cellular cytotoxicity and outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with but not without rituximab. *J. Clin. Oncol.* 2014, 32, 3242–3248).

Kalcytriol przyczynia się do procesu detoksykacji w jelicie poprzez kontrolę ekspresji antyoksydacyjnych enzymów fazy I i II, zaangażowanych w katabolizm ksenobiotyków, sterydów, kwasów żółciowych i innych związków, które promują rozwój nowotworu jelita grubego (Beyerle, J. et al., Biotransformation of xenobiotics in the human colon and rectum and its association with colorectal cancer. *Drug Metab. Rev.* 2015, 47, 199–221).

Chociaż przeprowadzono dotychczas jedynie kilka badań na ludziach, zarówno eksperymentalna, jak i ogólnogenomowa analiza asosjacyjna wspierają istnienie wzajemnej regulacji między VDR/ statusem witaminy D a mikrobiomem jelitowym (Wang, J. et al., Genome-wide association analysis identifies variation in vitamin D receptor and other host factors influencing the gut microbiota. *Nat. Genet.* 2016, 48, 1396–1406).

W badaniu fazy 2 SUNSHINE, przeprowadzonym w Ameryce Północnej, u 139 pacjentów z nieoperacyjnym zaawansowanym lub przerzutowym nowotworem jelita grubego, testowano doustną suplementację witaminą D₃ wraz ze standardową chemioterapią i porównywano wysoką dawkę witaminy D₃ (8000 IU/dobę przez 2 tygodnie i następnie 4000 IU/dobę) ze standardową dawką witaminy D₃ (400 IU/dobę) (Barry, E.L. et al., J.A. Vitamin D as cancer therapy?: Insights from 2 new trials. *JAMA* 2019, 321, 1354–1355; Ng, K. et al., Effect of high-dose vs standard-dose vitamin D3 supplementation on progression-free survival among patients with advanced or metastatic colorectal cancer: the SUNSHINE Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2019, 321, 1370–1379). Uczestnicy otrzymujący wysoką dawkę witaminy D₃ doświadczyli nieistotnego statystycznie 2-miesięcznego wzrostu mediany czasu przeżycia bez progresji w porównaniu z uczestnikami otrzymującymi standardową dawkę (13 vs 11 miesięcy). Skorygowane analizy wykazały, że pacjenci w grupie otrzymującej wysoką dawkę rzadziej doświadczali progresji lub śmierci w dowolnym momencie podczas obserwacji (mediana 22,9 miesiąca). Nie wykazano korzystnego wpływu wysokiej dawki witaminy D₃ na całkowite przeżycie (mediana przeżycia, 24,3 miesiąca w obu grupach).

Badanie AMATERASU, przeprowadzone w Japonii, objęło 417 pacjentów z nowotworami żołądkowo-jelitowymi w stadium I do III (48% pacjentów z nowotworem jelita grubego, 42% z nowotworem żołądka i 10% z nowotworem przełyku), którzy przeszli operację chirurgiczną z całkowitą resekcją guza (Barry, E.L. et al., Vitamin D as cancer therapy?: Insights from 2 new trials. *JAMA* 2019, 321, 1354–1355; Urashima, M. et al., Effect of vitamin D supplementation on relapse-free survival among patients with digestive tract cancers: the AMATERASU randomized clinical trial. *JAMA* 2019, 321, 1361–1369). Uczestnicy otrzymywali doustną suplementację witaminą D₃ w ilości 2000 IU/dobę lub placebo. Suplementacja witaminą D₃ nie spowodowała istotnej statystycznie poprawy przeżycia wolnego od nawrotów podczas mediany obserwacji wynoszącej 3,5 roku. Analiza post hoc wykazała jednak statystycznie istotną korzyść z suplementacji. Nie stwierdzono pozytywnego wpływu podawania witaminy D₃ na całkowite przeżycie.

Cavuto i Fenech wykazali, że ograniczenie metioniny (Met) w diecie człowieka może być główną strategią kontroli wzrostu nowotworu, szczególnie w przypadku nowotworów wykazujących zależność przeżywalności i proliferacji od Met (Cavuto, P.; Fenech, M.F. A review of methionine dependency and

the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer Treat. Rev.* 2012, 38, 726–736). Ograniczenie Met skutkowało selektywnym zabiciem komórek nowotworowych zależnych od Met, w kokulturze z komórkami nienowotworowymi. W kilku badaniach na zwierzętach, w których testowano dietę z ograniczoną zawartością Met, stwierdzono zahamowanie wzrostu nowotworu i przedłużenie zdrowego okresu życia. Zmniejszenie zawartości Met w komórkach nowotworowych zależnych od Met może prowadzić do zatrzymania cyklu komórkowego w późnej fazie S/G2, *in vitro* i *in vivo*. Komórki zatrzymane w późnej fazie S/G2 są podatne na śmierć i nadwrażliwe na chemioterapię.

Badanie opublikowane w *Nature* wykazało, że ograniczenie glicyny (Gly) i seryny (Ser) w diecie wpływa na zahamowanie wzrostu niektórych nowotworów, w tym nowotworu jelita (Sullivan, M.R.; Vander Heiden, M.G. When cancer needs what's non-essential. *Nat. Cell Biol.* 2017, 19, 418–420; Maddocks, O.D. et al., Modulating the therapeutic response of tumours to dietary serine and glycine starvation. *Nature* 2017, 544, 372–376). To, czy interwencja zakończy się powodzeniem, zależy od kontekstu onkogenego i pochodzenia tkanki nowotworowej. Ograniczenie Gly w diecie ogranicza jedną drogę syntezy Ser, a usunięcie Gly i Ser z diety prowadzi do niższego ich poziomu w osoczu. Ograniczenie Gly i Ser może zmniejszać zdolność nowotworu do radzenia sobie z ROS. Co więcej, skuteczne może się okazać połączenie ograniczenia Gly i Ser z leczeniem indukującym ROS, jak radioterapia. Ograniczenie Gly i Ser ogranicza jednostki jednowęglowe do biosyntezy nukleotydów i ta interwencja może wzmocnić skuteczność leków ukierunkowanych na syntezę nukleotydów.

Niektóre aminokwasy mogą hamować kancerogenezę głównie poprzez inhibicję angiogenezy (De Mejia, E.G.; Dia, V.P. The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells. *Cancer Metast. Rev.* 2010, 29, 511–528). Przykładem jest aktywność arginy (Arg) w ludzkich komórkach nowotworu jelita grubego SW480 i w mysim modelu przeszczepu heterogenicznego ludzkich komórek nowotworu jelita grubego SW480. Wyniki doświadczenia, w którym podawano otyłym szczurom z cukrzycą aminokwasy rozgałęzione ((leucynę (Leu), izoleucynę (Ile) i walinę (Val)) wskazywały na ich zdolność do hamowania rozwoju zmian przednowotworowych i angiogenezy.

Zbadano dwie mieszanki aminokwasów, z których pierwsza składała się z aminokwasów egzogennych (ang. essential amino acids, EAA), a druga składała się w 85% z EAA i w 15% z aminokwasów endogennych (ang. non-essential amino acids, NEAA), w celu określenia ich wpływu na żywotność komórek nabłonkowych, MCF 10A i komórek nowotworowych (ludzkiego nowotworu jelita grubego HCT 116, ludzkiego gruczolakoraka szyjki macicy HeLa, ludzkiego raka wątrobowokomórkowego HepG2, MCF7 i Caco-2) oraz wyjaśnienia molekularnych mechanizmów działania (Bonfili, L. et al., Essential amino acid mixtures drive cancer cells to apoptosis through proteasome inhibition and autophagy activation. *FEBS J.* 2017, 284, 1726–1737). Obie mieszanki wykazały zależne od komórek działanie antyproliferacyjne i cytotoksyczne, obejmujące inhibicję aktywności proteasomów, a w konsekwencji aktywację autofagii i apoptozy. Wyniki wykazały, że różne stosunki EAA i NEAA mogą wpływać na przeżywalność komórek nowotworowych. Dostosowanie poprzez mieszanki aminokwasów stosunków EAA i NEAA może stanowić strategię przeciwnowotworową, która może w sposób selektywny prowadzić do śmierci komórek nowotworowych. Z kolei podawanie EAA z chemioterapeutyką dokсорubicyną, lub bez niej, wpłynęło na zwiększenie śmiertelności kilku linii komórek nowotworowych: HCT 116, MCF7 i M14 (czerniak) (Corsetti, G. et al., Protect and Counter-attack: Nutritional Supplementation with Essential Amino acid Ratios Reduces Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in vivo and promote Cancer Cell Death in vitro. *J. Cytol. Histol.* 2015, 6, 354). EAA spowodowały wzrost stężenia markerów apoptotycznych, odszczepionej Kaspazy-3 i Bax. „Pozytywna nierównowaga” między EAA a NEAA może zmieniać środowisko komórek nowotworowych i wyzwać kaskadę sygnałową indukującą zdarzenia, które nie są zgodne z przeżywalnością i proliferacją komórek nowotworowych.

Ca posiada właściwości przeciw nowotworowi jelita grubego, w tym stymuluje różnicowanie, ogranicza proliferację i indukuje apoptozę (Zhang, X.; Giovannucci, E. Calcium, vitamin D and colorectal cancer chemoprevention. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2011, 25, 485–494). Co więcej, Ca wykazał działanie ochronne na niektórych etapach sekwencji gruczolak-rak (Kesse, E. et al., Dietary calcium, phosphorus, vitamin D, dairy products and the risk of colorectal adenoma and cancer among French women of the E3N-EPIC prospective study. *Int. J. Cancer* 2005, 117, 137–144).

Cu indukowała cytotoksyczność w ludzkich komórkach nowotworu jelita grubego HT-29, co było związane z indukcją apoptozy, zwiększeniem stresu oksydacyjnego, ze zmianami w β -oksyda-

cji w mitochondriach i konfiguracji metabolizmu lipidów i energii (Xiao, Y. et al., Metabolomics analysis reveals heavy metal copper-induced cytotoxicity in HT-29 human colon cancer cells. RSC Adv. 2016, 6, 78445–78456). Co więcej, Cu wykazała działanie wewnątrzkomórkowe, toksykologiczne na komórki Caco-2, a efekt ten wydawał się bardziej widoczny w komórkach postkonfluentnych niż w prekonfluentnych (Zödl, B. et al., Pharmacological levels of copper exert toxic effects in Caco-2 cells. Biol. Trace Elem. Res. 2003, 96, 143–152). Z kolei szczury, którym podawano niskie stężenie Cu w diecie miały większe indukowane zmiany przednowotworowe nowotworu jelita grubego niż zwierzęta, które otrzymywały odpowiednie stężenie Cu w diecie (Davis, C.D.; Feng, Y. Dietary copper, manganese and iron affect the formation of aberrant crypts in colon of rats administered 3, 20-dimethyl-4-aminobiphenyl. J. Nutr. 1999, 129, 1060–1067).

Częstość występowania nowotworów przełyku indukowanych przez *N*-metylo-*N*-benzylonitrozaminę i ich rozwój były istotnie mniejsze u szczurów na diecie o wysokiej koncentracji Mo w porównaniu do szczurów na diecie o niskiej koncentracji tego pierwiastka (Komada, H. et al., Effect of dietary molybdenum on esophageal carcinogenesis in rats induced by *N*-methyl-*N*-benzyl-nitrosamine. Cancer Res. 1990, 50, 2418–2422). Wyniki wskazują, że oksydaza ksantynowa odgrywa istotną rolę w hamowaniu procesu kancerogenezy w przełyku przez Mo.

Trójwartościowy Cr korzystnie wpływał na zapalenie jelita grubego u myszy, poprzez promowanie aktywności przeciwutleniającej, hamowanie ROS i stanu zapalnego (Odukanmi, O.A. et al., Trivalent Chromium Promotes Healing of Experimental Colitis in Mice by Suppression of Inflammation and Oxidative Stress. J. Biosci. Med. 2017, 5, 108–126).

Najczęściej hodowanymi podgatunkami ślimaków są *H. aspersa aspersa* i *H. aspersa maxima*. Ich jaja również są przeznaczone do celów spożywczych (Szkucik, K. et al., Ślimaki jadalne – użytkowość, wartość odżywcza i bezpieczeństwo dla zdrowia konsumenta. Życie Wet 2011, 86, 631–635). Do tej pory informacje dotyczące składu chemicznego i wartości odżywczej jadalnych części powyższych ślimaków są ograniczone. Jaja *H. aspersa maxima* zawierają dużą ilość wody i białka oraz cechują się niską zawartością tłuszczu i cholesterolu (Górka, A. et al., Nutrient Content and Antioxidant Properties of Eggs of the Land Snail *Helix aspersa maxima*. J Nutr Food Sci 2017, 7, 3). Jaja nie zawierają glukozy, charakteryzują się występowaniem Ca, Cu i Fe oraz posiadają potencjał przeciwutleniający.

Produkt pochodzący z jaj *H. aspersa aspersa* ma właściwości regeneracyjne i chroni przed czynnikami starzenia, co czyni go potencjalnym środkiem terapeutycznym w leczeniu lub zapobieganiu starzeniu się skóry (Juhász, M.L. et al., The use of natural ingredients in innovative Korean cosmeceuticals. J Cosmet Dermatol 2018, 17, 305–312; Espada, J. et al. *Cryptomphalus aspersa* mollusc eggs extract promotes migration and prevents cutaneous ageing in keratinocytes and dermal fibroblasts in vitro. Int J Cosmet Sci 2015, 37, 41–55).

W ostatnich latach przeprowadzono badania proteomiczne jaj wybranych gatunków ślimaków (Ip, J.C. et al., Understanding the transition from water to land: insights from multi-omic analyses of the perivitelline fluid of apple snail eggs. J Proteomics 2019, 194, 79–88; Heras, H. et al., Apple snail perivitellins, multifunctional egg proteins. Biology and management of invasive apple snails 2017).

Za pomocą analizy proteomicznej zidentyfikowano białka płynu periwitelinowego jaj słodkowodnego ślimaka *Pomacea maculata* (Mu, H.; Sun, J.; Heras, H.; Chu, K.H.; Qiu, J. W. An integrated proteomic and transcriptomic analysis of perivitelline fluid proteins in a freshwater gastropod laying aerial eggs. J Proteomics 2017, 155, 22–30). Białka sklasyfikowano w następujących grupach funkcjonalnych: główne wielofunkcyjne podjednostki periwitelinowe, odpowiedź immunologiczna, metabolizm energetyczny, degradacja białek, utlenianie–redukcja, sygnalizacja i wiązanie, transkrypcja i translacja, i inne. Zidentyfikowano białka gruczołu białkowego (ang. albumen gland) inwazyjnego ślimaka słodkowodnego *Pomacea canaliculata* i sklasyfikowano je w pięciu grupach funkcjonalnych: metabolizm, przetwarzanie informacji genetycznej, przetwarzanie informacji środowiskowej, procesy komórkowe i układy organizmu (Xiong, Y.M. et al., Analysis of albumen gland proteins suggests survival strategies of developing embryos of *Pomacea canaliculata*. Molluscan Res. 2018, 38, 99–104). Analizy wykazały obecność białek związanych z odpornością wrodzoną i obroną przed drapieżnikami. Białka płynu periwitelinowego *P. canaliculata* zidentyfikowano wcześniej (Sun, J. et al., First proteome of the egg perivitelline fluid of a freshwater gastropod with aerial oviposition. J. Proteome Res. 2012, 11, 4240–4248). Funkcje większości tych białek były nieznane, związane z przetwarzaniem informacji środowiskowej, wrodzoną odpornością i metabolizmem. Zidentyfikowano białka płynu periwitelinowego jaj słodkowodnego ślimaka *Pomacea diffusa* (Ip, J.C.

et al., Egg perivitelline fluid proteome of a freshwater snail (Caenogastropoda): insight into the transition from aquatic to terrestrial egg deposition. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2019, doi: 10.1002/rcm.8605). Sklasyfikowano je jako podjednostki PV1-like, białka odpowiadające za reakcję immunologiczną, degradację białka, sygnalizację i wiązanie, transkrypcję i translację, metabolizm, utlenianie–redukcję i o nieznanej funkcji.

Ze stanu techniki wiadomo, że dwie frakcje chromatograficzne śluzu ślimaka *Achatina fulica* zmniejszyły żywotność komórek gruczolakoraka gruczołu sutkowego (MCF7) i komórek nabłonkowych (Vero) (Teerasak, E. et al. Prediction of anticancer peptides against MCF-7 breast cancer cells from the peptidomes of *Achatina fulica* mucus fractions. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2016, 14, 49–57). We frakcjach zidentyfikowano 16 domniemanych kationowych i amfipatycznych peptydów przeciwnowotworowych. Większość tych peptydów (9) miała masę cząsteczkową mniejszą niż 3 kDa, 3 peptydy – 3–10 kDa, 2 z nich – 10–50 kDa, a 2 miały masę cząsteczkową większą niż 50 kDa. Peptydy przeciwnowotworowe składały się z 5–25 aminokwasów.

Ekstrakty z tkanek *H. aspersa aspersa* wykazują działanie przeciwnowotworowe wobec komórek raka piersi (Hs578T) (El Ouar et al., Effect of *Helix aspersa* extract on TNF α , NF- κ B and some tumor suppressor genes in breast cancer cell line Hs578T. *Pharmacogn. Mag.* 2017, 13, 281–285).

Z kolei śluz *Actinia equina* wykazał cytotoksyczne działanie na komórki ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej (K592) (Stabili, L. et al., The mucus of *Actinia equina* (Anthozoa, Cnidaria): An unexplored resource for potential applicative purposes. *Mar. Drugs* 2015, 13, 5276–5296).

Hemocyjany, metaloproteiny hemolimfy przenoszące tlen i ich izoformy ze ślimaka lądowego *H. lucorum* i ślimaka morskiego *Rapana venosa* wykazały działanie przeciwnowotworowe na ludzkie komórki raka pęcherza moczowego T-24 (Dolashka, P. et al., Bioactive compounds isolated from garden snails. *J. Bio Sci. Biotechnol.* 2015, SE, 147–155).

Hemocyjany pochodzące z *H. aspersa aspersa* i *H. lucorum* oraz strukturalna podjednostka hemocyjaniny *H. aspersa aspersa* zmniejszyły żywotność komórek raka pęcherza moczowego (T-24 i CAL-29) (Antonova, O. et al., In vitro antiproliferative effect of *Helix aspersa* hemocyanin on multiple malignant cell lines. *Z. Naturforsch. C* 2014, 69, 325–334).

Ponadto hemocyjaniny wyizolowane z *H. aspersa aspersa* zmniejszyły żywotność komórek raka jajnika (FraWü), komórek raka prostaty (DU-145), komórek ostrej białaczki monocytowej (THP-1), komórek chłoniaka Burkitta (Daudi) i komórek glejaka (LN-18). Hemocyjany wyizolowane ze ślimaka lądowego *H. pomatia* i ślimaka morskiego *Rapana thomasi* wykazały silne działanie przeciwnowotworowe i antyproliferacyjne w mysim modelu raka jelita grubego (Gesheva, V. et al., Anti-cancer properties of gastropod hemocyanins in murine model of colon carcinoma. *BMC Immunol.* 2014, 15, 34).

Immunizacja hemocyjaninami przedłużyła przeżycie, zwiększyła przeciwnowotworową odpowiedź humoralną oraz spowolniła wzrost guza i przerzuty do płuc. Lektyny ze ślimaków zostały zastosowane jako markery dla tkanek przerzutowych w raku jelita grubego i piersi (Walker, R.A. *Helix pomatia* and prognosis of breast cancer. *Br. J. Cancer* 1993, 68, 453–454; Lescar, J. et al., Structural basis for recognition of breast and colon cancer epitopes Tn antigen and Forssman disaccharide by *Helix pomatia* lectin. *Glycobiology* 2007, 17, 1077–1083).

Matusiewicz, M. et al. (In Vitro Influence of Extracts from Snail *Helix aspersa* Müller on the Colon Cancer Cell Line Caco-2. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 1064) ujawnia zmniejszenie żywotności komórek nowotworu jelita grubego linii Caco-2 po zastosowaniu wodnego ekstraktu ze śluzu i tkanek nóg ślimaków *H. aspersa aspersa*.

Zapewnienie efektywnej terapii nowotworu jelita grubego pozostaje nadal problemem nie rozwiązany w stanie techniki. Celem wynalazku jest dostarczenie alternatywnego rozwiązania dla terapii jednoskładnikowych i kombinowanych.

Nieoczekiwanie okazało się, że preparat z liofilizowanych jaj ślimaków *H. aspersa aspersa* i wodny ekstrakt z tego preparatu mogą być ważnym źródłem naturalnych związków wykazujących działanie przeciwko nowotworowi jelita grubego. Badania przedstawione poniżej, dotyczące mechanizmów przeciwnowotworowego działania bioaktywnych składników zawartych w wodnym ekstrakcie z preparatu wskazują na potencjał preparatu i ekstraktu do zastosowania jako elementu terapii kombinowanej nowotworu jelita grubego.

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania preparatu z liofilizowanych jaj ślimaka *Helix aspersa aspersa*, zgodnie z którym dwudniowe oczyszczone jaja ślimaka *Helix aspersa aspersa* homogenizuje się, po czym zamraża się w temperaturze -80°C a następnie liofilizuje w ciemności w liofilizatorze i mieli na drobny proszek.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania wodnego ekstraktu z preparatu z liofilizowanych jaj ślimaka *Helix aspersa aspersa* otrzymanego sposobem jak określono powyżej, obejmujący następujące etapy:

- (a) preparat z liofilizowanych jaj ślimaka *Helix aspersa aspersa* homogenizuje się w wodzie dejonizowanej przy użyciu wortexu,
- (b) homogenat pozostawia się na 30 min w temperaturze 4°C,
- (c) homogenat wiruje się przy obrotach 1600 x g, przez 10 min. w 4°C,
- (d) po czym powstały supernatant filtruje się, korzystnie na filtrze strzykawkowym z membraną z polifluorku winylidenu o średnicy porów 0,22 µm pod komorą laminarną,
- (e) następnie supernatant rozcieńcza się sterylną wodą dejonizowaną do odpowiedniego stężenia, korzystnie 2,5–25 mg/ml.

Innym przedmiotem wynalazku jest preparat z liofilizowanych jaj ślimaka *Helix aspersa aspersa* otrzymany sposobem jak określono powyżej lub jego wodny ekstrakt otrzymany sposobem jak określono powyżej do zastosowania w leczeniu nowotworu jelita grubego.

Korzystnie, dzienna porcja preparatu z liofilizowanych jaj wynosi 6–7 g.

Przykłady

Przykład 1

Materiał zwierzęcy i przygotowanie preparatu z liofilizowanych jaj

Dwudniowe jaja (0,5 kg) *Helix aspersa aspersa*, 1774 ((*Cornu aspersum aspersum* (Müller, 1774)) pochodzą z komercyjnej hodowli (Grudziądz, Polska). Jaja (oczyszczone) zhomogenizowano, zamrożono (-80°C), zliofilizowano (ciemność, liofilizator Lyovac GT 2, SRK Systemtechnik GmbH, Riedstadt, Niemcy), zmielono na drobny proszek i przechowywano (-80°C).

Przygotowanie wodnych ekstraktów z preparatu z liofilizowanych jaj

W celu przygotowania wodnych ekstraktów z preparatu z liofilizowanych jaj, preparat homogenizowano w wodzie dejonizowanej (stężenie 25 mg/ml) przy użyciu wortexu, pozostawiano na 30 min. (4°C) i wirowano (1600 x g, 10 min., 4°C). Supernatant filtrowano z użyciem filtra strzykawkowego z membraną z polifluorku winylidenu (ang. polyvinylidene fluoride, PVDF) o średnicy porów 0,22 µm (EuroClone, Pero, Włochy), pod komorą laminarną (TopSafe™ 1.2, class II, BIOAIR, Pavia, Włochy). Wodny ekstrakt z preparatu z liofilizowanych jaj o stężeniu 2,5 mg/ml otrzymywano poprzez dziesięciokrotne rozcieńczenie sterylną wodą dejonizowaną powyższego ekstraktu o stężeniu 25 mg/ml.

Przykład 2

Hodowla komórek Caco-2

Linie komórkową ludzkiego gruczolakoraka jelita grubego (ang. human epithelial colorectal adenocarcinoma, Caco-2) (ECCC, 55 pasaż, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) hodowano na polistyrenowych płytkach przeznaczonych do hodowli komórek adherentnych ((do testu żywotności i testu integralności błony komórkowej opartego na oznaczeniu aktywności dehydrogenazy mleczanowej (ang. lactate dehydrogenase, LDH) – w 96-dołkowych płytkach, przy początkowej gęstości 1 x 10⁴ komórek/100 µl, do testu określającego liczbę żywych komórek z wykorzystaniem błękitu trypanu – w 12-dołkowych płytkach, przy początkowej gęstości 5,94 x 10⁴ komórek/594 µl, a do testu rodzajów śmierci komórki – w 6-dołkowych płytkach, przy początkowej gęstości 0,75 x 10⁵ komórek/1,5 ml)) w pożywce MEM (ang. Minimum Essential Medium) zawierającej 2 mM L-glutaminę, 10% płodowej surowicy bydlęcej (ang. fetal bovine serum, FBS), 1% aminokwasów endogennych (ang. non-essential amino acids, NEAA) i 1% antybiotyku-antymykotyku (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Matusiewicz, M. et al., Effect of Juice and Extracts from Saposchnikovia divaricata Root on the Colon Cancer Cells Caco-2. Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 4526). Komórki umieszczono w inkubatorze CO₂ (INCO 108 med, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Niemcy) w temperaturze 37°C (5% CO₂, 95% wilgotności względnej). Po inkubacji przez 24 h i osiągnięciu około 70% konfluencji, komórki głodzono przez noc w pożywce MEM z 1% FBS i 1% antybiotyku-antymykotyku.

Przykład 3

Wpływ wodnego ekstraktu z preparatu z liofilizowanych jaj na żywotność komórek

Do komórek dodano 90 µl świeżej pożywki MEM zawierającej 1% FBS i 1% antybiotyku-antymykotyku i 10 µl wodnego ekstraktu z preparatu z liofilizowanych jaj, o stężeniach 25 i 2,5 mg/ml. Do komórek kontrolnych wprowadzono tę samą objętość sterylnej wody dejonizowanej. Uwzględniono również dodatkowe kontrole. Po inkubacji przez 24 h i 72 h, przeprowadzono test MTT ((bromek 3-(4,5-

-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy, ang. methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide)) zgodnie ze zmodyfikowaną procedurą Tada, H. et al. (An improved colorimetric assay for interleukin 2. J. Immunol. Methods 1986, 93, 157–165). Żółty roztwór MTT jest przekształcany przez dehydrogenazy mitochondrialne żywych komórek do ciemnoniebieskiego, nierozpuszczalnego w wodzie formazanu MTT. W skrócie, 15 μ l odczynnika MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) w buforze PBS (sól fizjologiczna buforowana fosforanem, ang. phosphate-buffered saline) o stężeniu 5 mg/ml wprowadzono do komórek i płytki inkubowano (37°C, 4 h). Następnie wprowadzono 100 μ l buforu lizującego (10% sól sodowa siarczanu dodecyłu w 0,01 M HCl), płytki inkubowano (37°C, przez noc) i dokonano odczytu absorbancji przy długości fali 570 nm, wykorzystując czytnik mikropłytek (Infinite M200, Tecan, Männedorf, Szwajcaria). Analizę przeprowadzono w sześciu powtórzeniach ($n = 6$).

Wpływ wodnego ekstraktu z preparatu z liofilizowanych jaj na liczbę żywych komórek z wykorzystaniem błękitu trypanu

Test wykluczenia barwnika – błękitu trypanu opiera się na zasadzie, że żywe komórki posiadają nie-naruszoną błonę komórkową, która wyklucza barwnik, w przeciwieństwie do martwych komórek ((Strober, W. (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability. Current protocols in immunology, 111(1), A3-B)). Do komórek dodano 535 μ l świeżej pożywki i 59 μ l wodnego ekstraktu z preparatu z liofilizowanych jaj, o stężeniu 25 mg/ml. Do komórek kontrolnych wprowadzono tę samą objętość sterylnej wody dejonizowanej. Płytki inkubowano przez 24 h. Komórki zebrano, przepłukano buforem PBS i zawieszono w tym buforze (100 μ l), następnie zawiesinę komórek zmieszano z barwnikiem w stosunku 1:1. Po upływie 5 min. zawiesinę naniesiono na komorę Bürkera i obliczono liczbę żywych komórek (z jasną cytoplazmą) i martwych komórek (z niebieską cytoplazmą), z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego odwróconego, $n = 5$.

Wpływ wodnego ekstraktu z preparatu z liofilizowanych jaj na integralność błony komórkowej opartego na oznaczeniu aktywności LDH

Uszkodzenie błony komórkowej powoduje uwolnienie do pożywki enzymu cytozolowego, dehydrogenazy mleczanowej (LDH). LDH jest katalizatorem konwersji mleczanu do pirogronianu, poprzez redukcję NAD⁺ do NADH. Następnie, diaforaza wykorzystuje NADH do redukcji INT (soli terazoliowej) do czerwonego formazanu, którego zawartość rejestruje się przy długości fali 490 nm. Test LDH przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta zestawu komercyjnego (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Do komórek dodano 100 μ l świeżej pożywki i 10 μ l wodnego ekstraktu z preparatu z liofilizowanych jaj, o stężeniach 25 i 2,5 mg/ml. Do komórek kontrolnych wprowadzono tę samą objętość sterylnej wody dejonizowanej. Uwzględniono różne dodatkowe kontrole. Po inkubacji przez 24 h określono aktywność LDH w pożywce i wyrażono ją jako % maksymalnej aktywności LDH (w pożywce po lizie komórek), $n = 6$.

Wpływ wodnego ekstraktu z preparatu z liofilizowanych jaj na rodzaje śmierci komórki

Do komórek dodano 1,5 ml świeżej pożywki i 150 μ l wodnego ekstraktu z preparatu z liofilizowanych jaj, o stężeniu 25 mg/ml. Do komórek kontrolnych wprowadzono tę samą objętość sterylnej wody dejonizowanej. Po inkubacji przez 24 h określono rodzaje śmierci komórki, zgodnie z instrukcją producenta zestawu komercyjnego do cytometrii przepływowej, wykorzystującego Alexa Fluor® 488 Aneksynę V i jodek propidyny (ang. propidium iodide, PI) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). PI jest barwnikiem fluorescencyjnym, który barwi martwe komórki wiążąc się z kwasami nukleinowymi, a Aneksyna V sprzężona z fluoroforem Alexa Fluor® 488 wiąże się z fosfatydyloseryną eksponowaną na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej komórek apoptotycznych. Żywe komórki nie są wybarwione, komórki Aneksyna V-dodatnie są uważane za wczesnoapoptotyczne, komórki PI/Aneksyna V-dodatnie jako późnoapoptotyczne, a komórki PI-dodatnie jako nekrotyczne. Komórki analizowano za pomocą cytometru przepływowego BDFACSCalibur™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Zarejestrowano dziesięć tysięcy komórek na próbkę, $n = 6$.

Traktowanie wodnym ekstraktem z preparatu z liofilizowanych jaj ślimaków *H. aspersa aspersa* o stężeniu 25 mg/ml i 2,5 mg/ml przez 24 h skutkuje statystycznie istotnym zmniejszeniem żywotności komórek nowotworowych jelita grubego Caco-2 w porównaniu do komórek kontrolnych, traktowanych wodą dejonizowaną (Tabela 1). Po tym czasie traktowania obserwuje się brak tego efektu dla wodnego ekstraktu z liofilizowanego śluzu tych ślimaków (2,5 mg/ml) i efekt nieistotny statystycznie dla wodnego ekstraktu z liofilizowanych tkanek nóg (2,5 mg/ml). Efekt ten utrzymuje się przez 72 h w przypadku wodnego ekstraktu z preparatu z liofilizowanych jaj ślimaków *H. aspersa aspersa* o stężeniu 25 mg/ml. Ponadto, traktowanie wodnym ekstraktem z preparatu z liofilizowanych jaj ślimaków *H. aspersa aspersa*

o stężeniu 25 mg/ml przez 24 h skutkuje statystycznie istotnym zmniejszeniem liczby żywych komórek Caco-2 w stosunku do komórek kontrolnych.

Traktowanie wodnym ekstraktem z preparatu z liofilizowanych jaj ślimaków *H. aspersa aspersa* o stężeniu 25 mg/ml i 2,5 mg/ml przez 24 h powoduje odpowiednio zwiększenie i statystycznie istotne zwiększenie stopnia uszkodzenia błon komórek Caco-2, aktywności dehydrogenazy mleczanowej (ang. lactate dehydrogenase, LDH) uwolnionej z komórek, w porównaniu do komórek kontrolnych. Traktowanie komórek Caco-2 wodnym ekstraktem z preparatu z liofilizowanych jaj ślimaków *H. aspersa aspersa* o stężeniu 25 mg/ml przez 24 h wpływa na indukcję apoptozy i ograniczenie nekrozy – istotne zwiększenie liczby komórek wczesnoapoptycznych i zmniejszenie liczby komórek nekrotycznych w porównaniu do kontroli.

Tabela 1. Wskaźniki komórek Caco-2 po ich traktowaniu przez 24 h lub 72 h wodnym ekstraktem z preparatu z liofilizowanych jaj *Helix aspersa aspersa*, o dwóch stężeniach. W dwóch ostatnich kolumnach uwzględniono wartości żywotności komórek traktowanych wodnym ekstraktem z liofilizowanego śluzu i tkanek nóg *H. aspersa aspersa* (Matusiewicz, M. et al., In Vitro Influence of Extracts from Snail *Helix aspersa* Müller on the Colon Cancer Cell Line Caco-2. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 1064). Komórki kontrolne traktowano wodą dejonizowaną¹.

Wskaźnik (%)	Kontrola	Ekstrakt 25 mg/ml	Ekstrakt 2,5 mg/ml	Ekstrakt ze śluzu 2,5 mg/ml	Ekstrakt z tkanek nóg 2,5 mg/ml
<i>Metody kolorymetryczne</i>					
Żywotność komórek po 24 h	100,00 ± 1,54	62,39 ± 3,92 ***	75,95 ± 5,59 **	114,03 ± 4,98 *	88,53 ± 5,13
Żywotność komórek po 72 h	100,00 ± 3,46	89,18 ± 3,14 *	106,30 ± 5,18	78,23 ± 8,26 *	74,34 ± 2,88 ***
Liczba żywych komórek po 24 h	100,00 ± 8,72	67,80 ± 10,75 *	-	-	-
Aktywność LDH po 24 h	20,82 ± 1,35	25,29 ± 2,64	38,14 ± 1,42 ***	-	-
<i>Metoda cytometryczna</i>					
Liczba komórek żywych po 24 h	84,89 ± 0,98	84,80 ± 0,90	-	-	-
Liczba komórek wczesnoapoptycznych po 24 h	2,56 ± 0,07	3,50 ± 0,25 **	-	-	-
Liczba komórek późnoapoptycznych po 24 h	10,56 ± 1,01	10,52 ± 1,06	-	-	-
Liczba komórek nekrotycznych po 24 h	1,99 ± 0,50	1,18 ± 0,26	-	-	-

¹Wyniki wyrażono jako średnią ± błąd standardowy średniej. Efekt istotny statystycznie: * reprezentuje wartości, które różnią się od kontroli przy $p < 0,05$, ** reprezentuje wartości, które różnią się od kontroli przy $p < 0,01$, *** reprezentuje wartości, które różnią się od kontroli przy $p < 0,001$. $n = 5$ (liczba żywych komórek po 24 h), $n = 6$ (pozostałe wskaźniki). LDH – dehydrogenaza mleczanowa.

Przykład 4

Siła redukująca jony żelaza

Siłę redukującą jony żelaza w ekstrakcie z preparatu z liofilizowanych jaj określono zgodnie ze zmodyfikowaną kolorymetryczną metodą Oyaizu, M. (Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn. J. Nutr. 1986, 44, 307–315). Metoda jest oparta na redukcji Fe^{3+} będących w nadmiarze stechiometrycznym w porównaniu do przeciwutleniaczy, dzięki dostarczaniu elektronów przez te związki. Ekstrakt z preparatu z liofilizowanych jaj pozyskano poprzez ich homogenizację w wodzie dejonizowanej, pozostawienie na 30 min. (4°C) i wirowanie (1600 x g, 10 min., 4°C). Krzywą standardową przygotowano przy użyciu kwasu (±)-6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromano-2-karboksylowego (ang. ((±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid, TROLOX), $n = 3$).

Zdolność wymiatania ABTS^{•+} ((kationorodnik kwasu 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego))

Zdolność wymiatania ABTS^{•+} w ekstrakcie z preparatu z liofilizowanych jaj, przygotowanym jak powyżej, oznaczono zgodnie ze zmodyfikowaną procedurą Sun, Y et al. (Antioxidant properties of custard pudding dessert containing rare hexose, D-psicose. Food Control 2007, 18, 220–227). Metoda polega na dodaniu przeciwutleniaczy do roztworu ABTS^{•+}, a pozostały niezredukowany ABTS^{•+} jest oznaczany kolorymetrycznie. Krzywą standardową skonstruowano przy użyciu TROLOX, $n = 3$.

Zdolność wymiatania DPPH[•] (rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu)

Aby określić zdolność wymiatania DPPH[•] w ekstrakcie z preparatu z liofilizowanych jaj, jak powyżej, zastosowano zmodyfikowaną kolorymetryczną procedurę Li, Y et al. (Formation of aldehyde and ketone compounds during production and storage of milk powder. Molecules 2012, 17, 9900–9911). W metodzie tej przeciwutleniacze dostarczają wodór lub elektron do niesparowanego elektronu DPPH[•] i obserwuje się zmniejszenie absorbancji, proporcjonalnie do zwiększenia ilości nierodnikowej formy DPPH. Krzywą standardową sporządzono przy użyciu TROLOX, $n = 3$.

Zawartość fenoli

Zawartość fenoli w ekstrakcie z preparatu z liofilizowanych jaj, jak powyżej, oznaczono kolorymetryczną metodą Folina-Ciocalteu, polegającą na pomiarze absorbancji kompleksu powstałego na skutek redukcji soli heteropolikwasów fosforomolibdenowego i fosforowolframowego (Singleton, V.L. et al., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 1999, 299, 152–178). Podczas reakcji jony Mo (VI) są redukowane do Mo (V). Krzywą standardową przygotowano przy użyciu kwercetyny, $n = 3$.

Oznaczanie GSH

GSH (glutation), tiolowy tripeptyd, stanowi blisko 97% niebiałkowych związków tiolowych w komórkach. Poprzez oznaczenie koncentracji niebiałkowych grup – SH w odbiałczonym ekstrakcie z preparatu z liofilizowanych jaj ślimaków, GSH został oznaczony ilościowo. Do oznaczenia niebiałkowych grup -SH użyto kolorymetryczną metodę Ellmana, w której kwas 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy) jest redukowany przez związki tiolowe z powstaniem kwasu 2-nitro-5-merkaptobenzoesowego (Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 1959, 82, 70–77). Krzywą standardową przygotowano przy wykorzystaniu GSH, $n = 6$.

Poziom TBARS

Poziom TBARS w ekstrakcie z preparatu z liofilizowanych jaj ślimaków oznaczono według procedury kolorymetrycznej (Uchiyama, M.; Mihara, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal. Biochem. 1978, 86, 271–278). TBARS wyrażono jako równoważniki dialdehydu malonowego, a jako standard zastosowano jego prekursor – 1,1,3,3-tetraetoksypentan, $n = 6$.

Preparat z liofilizowanych jaj cechuje się aktywnością przeciwutleniającą – siłą redukującą jony żelaza, zdolnością wymiatania ABTS^{•+} ((kationorodnik kwasu 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego)) i DPPH[•] (rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu) (Tabela 2). Zawartość fenoli w preparacie to około 0,406%. W preparacie wykryto również glutation (GSH) oraz produkty peroksydacji lipidów – substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym (ang. thiobarbituric acid reactive substances, TBARS).

Tabela 2. Koncentracja wskaźników statusu redoks, fenoli, glutationu (GSH) i substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w preparacie z liofilizowanych jaj *Helix aspersa aspersa*¹.

Wskaźnik	Wartość
Siła redukująca jony żelaza ($\mu\text{g TROLOX/mg}$)	$6,87 \pm 0,68$
Zdolność wymiatania ABTS ^{•+} ($\mu\text{g TROLOX/mg}$)	$0,75 \pm 0,02$
Zdolność wymiatania DPPH [•] ($\mu\text{g TROLOX/mg}$)	$1,71 \pm 0,17$
Fenole ($\mu\text{g kwercetyny/mg}$)	$4,06 \pm 0,04$
GSH (ng/mg)	44.58 ± 3.15
TBARS (ng/mg)	$0,482 \pm 0,034$

¹Wyniki wyrażono jako średnią $\pm$ błąd standardowy średniej. $n = 3$ (wskaźniki statusu redoks, fenole), $n = 6$ (GSH, TBARS). ABTS^{•+} – kationorodnik kwasu 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego), DPPH – rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu.

Przykład 5

Zawartość białka ogólnego

Zawartość białka ogólnego w preparacie z liofilizowanych jaj oznaczono metodą Kjeldahla, zgodnie z AOAC International (AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International, 19th ed.; AOAC International: Gaithersburg, MD, USA, 2012), $n = 2$.

Koncentracja węglowodanów

Koncentrację węglowodanów ogółem w preparacie z liofilizowanych jaj określono przy pomocy kolorymetrycznej metody wykorzystującej fenol i kwas siarkowy (Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.T.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 1956, 28, 350–356). Do konstrukcji krzywej standardowej użyto glukozę, $n = 3$.

Tłuszcz surowy

Tłuszcz surowy wyekstrahowano z preparatu z liofilizowanych jaj z użyciem eteru naftowego, metodą Soxhleta (AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International, 19th ed.; AOAC International: Gaithersburg, MD, USA, 2012), $n = 2$.

Oznaczenie zawartości witaminy D₃

Oznaczenie zawartości witaminy D₃ w preparacie z liofilizowanych jaj poprzedziła cieczowa metoda ekstrakcji, z wykorzystaniem ultradźwięków. Koncentrację witaminy D₃ określono przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV-Vis (ang. high-performance liquid chromatography coupled with UV-Vis detection, HPLC/UV-Vis), na podstawie krzywej wzorcowej dla standardu. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem systemu HPLC/UV-Vis Altus A-10 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) oraz kolumny LiChroCART 125-4, C18 (Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA). Oznaczenie wykonano w prywatnym laboratorium analitycznym, $n = 3$.

Preparat z liofilizowanych jaj ślimaków zawiera głównie białko ogólne i zawiera $13,75 \pm 0,32\%$ węglowodanów ogółem (Tabela 3). Ponadto preparat ten nie zawiera tłuszczu surowego (ilość < 0,2%). Koncentracja witaminy D₃ w preparacie to $0,8048 \pm 0,0028 \mu\text{g/g}$.

Tabela 3. Zawartość białka ogólnego, węglowodanów ogółem, tłuszczu surowego i witaminy D₃ w preparacie z liofilizowanych jaj *Helix aspersa aspersa*¹.

Wskaźnik	Wartość
Białko ogólne (%)	$29,0 \pm 0,0$
Węglowodany ogółem (%)	$13,75 \pm 0,32$
Tłuszcz surowy (%)	< 0,2
Witamina D ₃ (μg/g)	$0,8048 \pm 0,0028$

¹Wyniki wyrażono jako średnią $\pm$ błąd standardowy średniej. $n = 2$ (białko ogólne, tłuszcz surowy), $n = 3$ (węglowodany ogółem, witamina D₃).

Przykład 6

Analiza aminokwasów

Zawartość wszystkich aminokwasów białkowych oprócz tryptofanu (Trp) w preparacie z liofilizowanych jaj określono metodą chromatografii jonowymiennej z detekcją spektrofotometryczną (ang. ion-exchange chromatography with spectrophotometric detection, IEC-VIS) (Commission Regulation (EC) No. 152/2009 of 27 January 2009; Annex III F; European Union: Brussels, Belgium, 2009). Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem automatycznego analizatora aminokwasów AAA 400 i kolumny jonowymiennej (Ingos, Praga, Czechy). Zawartość Trp w preparacie z liofilizowanych jaj oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną (ang. high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, HPLC-FLD, Agilent 1100 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (Commission Regulation (EC) No. 152/2009 of 27 January 2009; Annex III G; European Union: Brussels, Belgium, 2009). Wykorzystano kolumnę Zorbax® ODS C18, 4,6 mm ID x 250 mm (5 μm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Analizę aminokwasów przeprowadzono w laboratorium akredytowanym przez Polskie Centrum Akredytacji.

Wskaźnik aminokwasu ograniczającego AAS (ang. amino acid score, AAS), wskaźnik aminokwasu ograniczającego CS (ang. chemical score, CS) i wskaźnik niezbędnych aminokwasów (ang. essential amino acid index, EAAI) obliczono poprzez zastosowanie następujących wzorów:

$$AAS = \frac{aa}{AA \text{ (standardy)}}$$

$$CS = \frac{aa}{AA \text{ (jajo)}}$$

$$EAAI = \sqrt[n]{\frac{100A}{AS} \times \frac{100B}{BS} \times \frac{100C}{CS} \times \dots \times \frac{100H}{HS}}$$

gdzie aa to ilość aminokwasu w przeliczeniu na badane białko (%); AA (standardy) to ilość aminokwasu w przeliczeniu na białko referencyjne FAO (Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa, ang. the Food and Agriculture Organization of the United Nations)/WHO (Światowa Organizacja Zdrowia, ang. the World Health Organization) dla dzieci przedszkolnych w wieku 2–5 lat (%), AA (jajo) to ilość aminokwasu w przeliczeniu na białko całego jaja jako białko referencyjne (%); n oznacza liczbę aminokwasów; A, B, C, ..., H to ilość aminokwasów egzogennych (ang. essential amino acids, EAA) w przeliczeniu na badane białko (%); AS, BS, CS, ..., HS to ilość aminokwasów egzogennych w przeliczeniu na białko referencyjne (%).

W preparacie z liofilizowanych jaj ślimaków *H. aspersa aspersa* zidentyfikowano osiemnaście aminokwasów, z których osiem to aminokwasy egzogenne dla ludzi – leucyna (Leu), lizyna (Lys), walina (Val), treonina (Thr), fenyloalanina (Phe), izoleucyna (Ile), metionina (Met) i tryptofan (Trp) (Tabela 4). Wskaźnik aminokwasu ograniczającego AAS jest <1,00 dla Lys i zgodnie z AAS jest to pierwszy aminokwas ograniczający (Tabela 5). Zawartość Phe + Tyr (tyrozyna), Val i Ile w preparacie z liofilizowanych jaj jest największa w porównaniu z białkiem standardowym FAO/WHO. Wskaźnik aminokwasu ograniczającego CS dla aminokwasów preparatu jest <1,00, a zgodnie z CS pierwszym aminokwasem ograniczającym jest Met + Cys (cysteina). Zawartość metioniny w preparacie jest niewielka w porównaniu do większości aminokwasów (Tabela 4). EAAI obliczony z wykorzystaniem wartości dla białka wzorcowego FAO/WHO jest >100, natomiast EAAI obliczony z wykorzystaniem wartości dla jaja kurzego jako białka wzorcowego jest <100 (Tabela 5).

Spośród aminokwasów endogennych (ang. non-essential amino acids, NEAA) w preparacie jest największa koncentracja kwasu glutaminowego (Glu), kwasu asparaginowego (Asp) i seryny (Ser) (Tabela 4).

Preparat cechuje się wysoką łączną zawartością aminokwasów aromatycznych (ang. delicious amino acids, DAA) – Glu, Asp, Ala (alanina) i Gly (glicyna). Koncentracja Gly jest najmniejsza w tej grupie aminokwasów.

DAA/TAA (aminokwasy całkowite, ang. total amino acids) wynosi 0,33, EAA/TAA – 0,41, natomiast EAA/NEAA – 0,81.

Tabela 4. Skład aminokwasowy preparatu z liofilizowanych jaj *Helix aspersa aspersa* (mg/g białka ogólnego)¹.

Aminokwasy egzogenne (EAA) *	
Leucyna	65,90 ± 0,04
Lizyna	53,81 ± 0,26
Walina	49,48 ± 0,07
Treonina	45,90 ± 0,07
Fenyloalanina	45,57 ± 0,02
Izoleucyna	38,64 ± 0,09
Metionina	15,78 ± 0,10
Tryptofan	13,43 ± 0,13
Aminokwasy semiegzogenne (HEAA) *	
Arginina	44,52 ± 0,45
Histydyna	20,12 ± 0,23

Aminokwasy endogenne (NEAA) *	
Kwas glutaminowy #	105,71 ± 1,12
Kwas asparaginowy #	90,12 ± 1,19
Seryna	59,16 ± 0,30
Tyrozyna	42,98 ± 1,23
Alanina #	36,07 ± 0,01
Prolina	28,21 ± 0,39
Glicyna #	27,95 ± 0,03
Cysteina	14,17 ± 0,42
Grupy i stosunki aminokwasów	
Aminokwasy całkowite (TAA)	797,50 ± 2,95
Aminokwasy egzogenne (EAA)	328,51 ± 0,02
Aminokwasy semiegzogenne (HEAA)	64,63 ± 0,23
Aminokwasy endogenne (NEAA)	404,36 ± 3,19
Aminokwasy aromatyczne (DAA)	259,84 ± 2,29
EAA/TAA	0,41
EAA/NEAA	0,81
DAA/TAA	0,33

¹Wyniki wyrażono jako średnią ± błąd standardowy średniej. * dla ludzi, # aminokwasy aromatyczne. *n* = 2.

Tabela 5. Wskaźnik aminokwasu ograniczającego AAS (AAS), wskaźnik aminokwasu ograniczającego CS (CS) i wskaźnik niezbędnych aminokwasów (EAAI) preparatu z liofilizowanych jaj *Helix aspersa aspersa*¹.

Aminokwasy	AAS	CS
Leucyna	1,00	0,77
Lizyna ¹	0,93	0,77
Walina	1,41	0,75
Treonina	1,35	0,98
Fenylalanina + tyrozyna	1,41	0,95
Izoleucyna	1,38	0,72
Metionina + cysteina ¹	1,20	0,53
Tryptofan	1,22	0,79
Histydyna	1,06	0,91
EAAI	120,38	78,37

¹ – Pierwsze aminokwasy ograniczające.

Przykład 7

Analiza składników mineralnych

Stężenie Ca, P, Na, K, Mg, Cu, Fe, Mn i Zn w preparacie z liofilizowanych jaj ślimaków oznaczono metodą atomowej spektroskopii emisyjnej z plazmą sprzężoną indukcyjnie (ang. inductively coupled plasma—atomic emission spectroscopy, ICP-AES, iCAP6500, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) (Procedura Analityczna Centrum Analitycznego Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (Warszawa, Polska); PB 34 wydanie 7 z dnia 08.03.2017 r.; Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie: Warszawa, Polska, 2017). Zawartość Ni, B, Mo, Cr, Co, Se, V i Sn w preparacie z liofilizowanych jaj określono metodą spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ang. mass spectrometry with ionization in inductively coupled plasma, ICP-MS, Varian 820-MS, Varian, Inc., Palo Alto, CA, USA) (Procedura Analityczna Centralnego Laboratorium Badawczego Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie (Lublin, Polska); CLA/ESA/5/2014 wersja 2 z dnia 03.03.2014 r.; Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie: Lublin, Polska, 2014). Poziom S, Cl, Si, I i F w preparacie z liofilizowanych jaj oznaczono metodą fluorescencji rentgenowskiej z dyspersją długości fali (ang. wavelength-dispersive

X-ray fluorescence, WDXRF, Axios, PANalytical, Almelo, the Netherlands) (Procedura Analityczna Centralnego Laboratorium Badawczego Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie (Lublin, Polska); CLA/ESA/3/2014 wersja 1 z dnia 03.03.2014 r.; Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie: Lublin, Polska, 2014). Analizy wykonano w laboratoriach akredytowanych przez Polskie Centrum Akredytacji.

Zawartość makroelementów w preparacie jest następująca (szereg malejący): Ca, P, Na, K, Mg, S, Cl (Tabela 6). Zawartość mikroelementów w preparacie jest następująca (szereg malejący): Si, Cu, Fe, Mn, Ni, B, Zn, Mo, Cr, Co, Se, I, V, Sn.

Tabela 6. Składniki mineralne zawarte w preparacie z liofilizowanych jaj *Helix aspersa aspersa*¹.

Makroelementy (mg/g)	
Ca	116 ± 2
P	4,776 ± 0,038
Na	1,337 ± 0,011
K	0,745 ± 0,031
Mg	0,685 ± 0,009
S	0,374 ± 0,005
Cl	0,1006 ± 0,0028
Mikroelementy (µg/g)	
Si	31,6 ± 0,8
Cu	27,6 ± 0,6
Fe	18,5 ± 1,6
Mn	10,05 ± 0,05
Ni	6,15 ± 0,07
B	4,95 ± 0,10
Zn	2,85 ± 0,04
Mo	1,65 ± 0,02
Cr	1,48 ± 0,02
Co	0,255 ± 0,002
Se	0,119 ± 0,004
I	0,108 ± 0,003
V	0,040 ± 0,002
Sn	0,023 ± 0,000
F	< 10

¹Wyniki wyrażono jako średnią ± błąd standardowy średniej. $n = 3$.

Przykład 8

Zalecana do spożycia dzienna porcja preparatu z liofilizowanych jaj

Zawartość składników mineralnych i witaminy D₃ przeliczono na zalecaną do spożycia dzienną porcję preparatu z liofilizowanych jaj oraz wyrażono w procentach dziennych referencyjnych wartości spożycia (DRWS) ((Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 9 października 2007 r. w sprawie składu oraz oznakowania suplementów diety (Dz. U. z 2015 r. poz. 2032 oraz z 2017 r. poz. 979 i 2236; Pkt 1 części A załącznika XIII do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169/2011 z dnia 25 października 2011 r.)).

Zalecana do spożycia dzienna porcja preparatu z liofilizowanych jaj *H. aspersa aspersa* wynosi 6–7 g (Tabela 7).

Tabela 7. Zawartość składników mineralnych i witaminy D₃ w przeliczeniu na zalecaną do spożycia dzienną porcję preparatu z liofilizowanych jaj *Helix aspersa aspersa* oraz w procentach dziennych referencyjnych wartości spożycia (DRWS)¹.

Makroelementy	Dzienna porcja 6 g		Dzienna porcja 7 g	
	Zawartość (mg)	Zawartość (% DRWS)	Zawartość (mg)	Zawartość (% DRWS)
Ca	696	87,0	812	101,5
P	28,656	4,1	33,432	4,8
K	4,470	0,2	5,215	0,3
Mg	4,110	1,1	4,795	1,3
Cl	0,6036	0,1	0,7042	0,1
Mikroelementy	Zawartość		Zawartość	
	(μg)	(% DRWS)	(μg)	(% DRWS)
Cu	165,6	16,6	193,2	19,3
Fe	111,0	0,8	129,5	0,9
Mn	60,30	3,0	70,35	3,5
Zn	17,10	0,2	19,95	0,2
Mo	9,90	19,8	11,55	23,1
Cr	8,88	22,2	10,36	25,9
Se	0,714	1,3	0,833	1,5
I	0,648	0,4	0,756	0,5
Witaminy	Zawartość		Zawartość	
	(μg)	(% DRWS witaminy D)	(μg)	(% DRWS witaminy D)
Witamina D ₃	4,8288	96,6	5,6336	112,7

Analiza statystyczna. Wyniki wyrażono jako średnia ± błąd standardowy średniej (ang. standard error of the mean, SEM). Wyniki testów na komórkach poddano jednoczynnikowej analizie wariancji (ang. one-way analysis of variance, ANOVA). Średnie wartości dla grup traktowanych wodnym ekstraktem z preparatu z liofilizowanych jaj ślimaków porównano z grupą traktowaną wodą dejonizowaną za pomocą testu post-hoc Dunnetta. W doświadczeniu Matusiewicz et al. (2018), średnie wartości dla grup traktowanych wodnym ekstraktem z liofilizowanego śluzu i tkanek nóg ślimaków porównano z grupą traktowaną wodą dejonizowaną za pomocą testu post-hoc Tukeya. Zastosowano oprogramowanie Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), a w przypadku doświadczenia z wodnym ekstraktem z liofilizowanego śluzu i tkanek nóg – oprogramowanie Statgraphics Centurion (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Różnicę między średnimi przy $p < 0,05$ przyjęto za istotną statystycznie.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania preparatu z liofilizowanych jaj ślimaka *Helix aspersa aspersa*, **znamienny tym**, że dwudniowe oczyszczone jaja ślimaka *Helix aspersa aspersa* homogenizuje się, po czym zamraża się w temperaturze -80°C a następnie liofilizuje w ciemności w liofilizatorze i mieli na drobny proszek.
2. Sposób otrzymywania wodnego ekstraktu z preparatu z liofilizowanych jaj ślimaka *Helix aspersa aspersa* otrzymanego sposobem jak określono w zastrz. 1, **znamienny tym**, że obejmuje następujące etapy:
 - (a) preparat z liofilizowanych jaj ślimaka *Helix aspersa aspersa* homogenizuje się w wodzie dejonizowanej przy użyciu wortexu,

- (b) homogenat pozostawia się na 30 min w temperaturze 4°C,
 - (c) homogenat wiruje się przy obrotach 1600 x g, przez 10 min. w 4°C,
 - (d) po czym powstały supernatant filtruje się, korzystnie na filtrze strzykawkowym z membraną z polifluorku winylidenu o średnicy porów 0,22 µm pod komorą laminarną,
 - (e) następnie supernatant rozcieńcza się sterylną wodą dejonizowaną do odpowiedniego stężenia, korzystnie 2,5–25 mg/ml.
3. Preparat z liofilizowanych jaj ślimaka *Helix aspersa aspersa* otrzymany sposobem jak określono w zastrz. 1 lub jego wodny ekstrakt otrzymany sposobem jak określono w zastrz. 2 do zastosowania w leczeniu nowotworu jelita grubego.
4. Preparat do zastosowania według zastrz. 3, **znamienny tym**, że dzienna porcja preparatu z liofilizowanych jaj wynosi 6–7 g.