



UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Imię i nazwisko doktoranta:

Anna Leśków

Miejsce pracy i zajmowane stanowisko:

Asystent

Zakład Chorób Układu Nerwowego

Wydział Nauk o Zdrowiu

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Tytuł rozprawy doktorskiej:

„Ocena właściwości związków biologicznie czynnych zawartych w słuźach wyizolowanych ze ślimaków *Limax maximus*, *Arion rufus* i *Helix pomatia*”

Promotor:

dr hab. Dorota Diakowska, prof. nadzw.

Recenzenci:

dr hab. Łukasz Łaczmański, prof. nadzw.

dr hab. inż. Mariusz Korczyński, prof. nadzw.

Wrocław 2020 r.

Wyniki

Opracowana metoda własna izolacji śluzów ślimaków jest bezpieczna dla środowiska oraz samych zwierząt, a otrzymany śluz jest produktem jadalnym. Badane śluz różnią się od siebie w obrazie morfologicznym, uwiódcono także 2 typy śluzu produkowane przez ślimaki, tj. śluz służący do poruszania się oraz okrywający. Śluz *Limax maximus* zawiera więcej polisacharydów, niż śluz *Arion rufus*. Obraz morfologiczny pokrywa się również z wynikami analizy składu chemicznego śluzów wskazując na brak obecności związków o charakterze lipidowym w badanym materiale. Wyniki badań fizykochemicznych wskazują na występowanie istotnych różnic w parametrach fizykochemicznych śluzów *Limax maximus*, *Arion rufus* i *Helix pomatia*. Wykazano również istotne różnice w tych parametrach w zależności od czasu, w jakim pozyskano materiał, co tłumaczyć można wpływem zmian klimatycznych i środowiskowych na właściwości fizykochemiczne śluzów ślimaków. Analiza mas molekularnych wykazała, że śluz *Limax maximus* zawiera najwięcej i największych białek spośród badanych śluzów. Wyniki otrzymane dla śluzu *Helix pomatia*, zarówno pozyskane metodą kolorymetryczną jak i elektroforetyczną wskazują, że w badanym śluzie nie obserwuje się białek. Przeprowadzony test przeżywalności komórek MTT potwierdza biologiczną aktywność śluzu ślimaka *Limax maximus*, który powodował spadek przeżywalności keratynocytów o 80% przy stężeniu 4 mg/mL oraz śluzu *Arion rufus* zmniejszającego przeżywalność ww. komórek o 75% przy tym samym stężeniu. Ponadto wykazano, że obserwowany spadek przeżywalności jest wynikiem cytotoksycznego działania tych śluzów (test SRB). W przypadku komórek czerniaka również zaobserwowano spadek przeżywalności komórek o kolejno 17% dla śluzu *Limax maximus* (stężenie 4 mg/mL) i 22% dla śluzu *Arion rufus* (stężenie 4 mg/mL). Spadek ten również jest efektem działania cytotoksycznego na komórki nowotworowe. W przypadku śluzu *Helix pomatia*, zależności takie nie są obserwowane.

Życiorys

Anna Helena Leśków urodziła się 03.06.1990 r. we Wrocławiu.

Wykształcenie:

2015-obecnie	Studia doktoranckie, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
2013-2015	Studia magisterskie na kierunku Biotechnologia, specjalność: biotechnologia medyczna – Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski
2009-2012	Studia licencjackie na kierunku Biotechnologia – Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski

Przebieg kariery zawodowej:

04.12.2017-obecnie	Asystent w Zakładzie Chorób Układu Nerwowego, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
01.10.2017-03.12.2017	Asystent w Samodzielnej Pracowni Neurotoksykologii i Diagnostyki Środowiskowej, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
02.2016-08.2016	Stażysta w Katedrze Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
12.2015-03.2016	Wykonawca w ramach przedsięwzięcia pilotażowego w ramach projektu Demonstrator+ pt. „opracowanie prototypów wyrobów medycznych na bazie surowców otrzymanych z porożonych komórek macierzystych”

Wykaz dorobku naukowego:

Autorka i współautorka 23 publikacji naukowych z zakresu biotechnologii medycznej, toksykologii i diagnostyki toksykologicznej o łącznej wartości punktowej **16.716 IF / 254 MNISW**.

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Wstęp

Substancje biologicznie czynne stanowią różnicowaną grupę związków pochodzenia naturalnego lub syntetycznego, które wywierają wpływ na organizmy żywe. Wpływ ten może mieć charakter zmiany funkcji fizjologicznych, poprawę, przywrócenie lub utratę funkcji przez komórki, czy tkanki poddane działaniu tych substancji. Jednym ze źródeł substancji biologicznie czynnych są mięczaki, w szczególności ślimaki. Służą ślimaków znane są z ich właściwości pielęgnacyjnych względem skóry człowieka, w tym z ich działania przyspieszającego gojenie ran i łagodzenie stanów zapalnych. Badania światowe wskazują na właściwości przeciwmikrobiologiczne, przeciwwirusowe, a nawet przeciwnowotworowe śluzów pozyskanych z różnych gatunków ślimaków, zarówno wodnych jak i lądowych. Wykazano przeciwnowotworowe właściwości śluzów ślimaków muszlowych względem komórek czerniaka złośliwego. Nowotwór ten wywodzi się z melanocytów, a najczęstszą jego lokalizację stanowi skóra. Na terenie Polski występują naturalnie m.in. ślimaki bezmuszlowe z gatunków *Limax maximus* i *Arion rufus* oraz ślimak muszlowy *Helix pomatia*, których śluz nie były dotąd badane pod kątem wpływu na proliferację głównych komórek skóry tj. keratynocytów, ani działania antynowotworowego względem komórek czerniaka złośliwego.

Cel pracy

Celem pracy jest ocena właściwości związków biologicznie czynnych zawartych w śluzach wyizolowanych ze ślimaków *Limax maximus* (pomrów wielki), *Arion rufus* (ślimak wielki / ślimak rudy) i *Helix pomatia* (ślimak winniczek).

Materiał i metody

Materiał do badań stanowił śluz ślimaków bezmuszlowych *Limax maximus* i *Arion rufus* oraz ślimaka muszlowego *Helix pomatia*, które pozyskane zostały opracowaną metodą własną. Dokonano analizy morfologicznej śluzów ślimaków *Limax maximus* i *Arion rufus* korzystając z techniki barwienia histologicznego. Dzięki wykorzystaniu teksturometru przeanalizowano parametry fizyczne śluzów z uwzględnieniem ich twardości, konsystencji, spoistości i lepkości. Dokonano również analizy składu chemicznego trzech rodzajów śluzów z oznaczeniem stężenia białka całkowitego oraz związków o charakterze lipidowym w badanych mieszaninach. Elektroforeza typu SDS-PAGE w warunkach denaturujących umożliwiła oznaczenie mas molekularnych białek z trzech rodzajów śluzu. Zbadano wpływ śluzów trzech ww. ślimaków na ludzkie keratynocyty (ATCC® CRL2309™) oraz komórki czerniaka złośliwego (ATCC® CRL1619™) wykorzystując test przeżywalności komórek poddanych zmiennym czynnikiem zewnętrznym MTT oraz test cytotoksyczności związków chemicznych SRB.

Publikacje z Impact Factor:

- I. Calkosiński, K. Gostomska-Pampuch, J. Majda, **A. Leśków**, M. Janeczek, O. P. Melnyk, A. Gamian.: The influence of α -tocopherol on serum biochemical markers during experimentally induced pleuritis in rats exposed to dioxin Inflammation 2017 Vol.40 no.3; s.913-926, **IF: 2.884**; Pkt. MNiSW/KBN: 20.000
- A. Ostrowska, K. Gostomska-Pampuch, **A. Leśków**, P. Kuropka, E. Gamian, P. Ziolkowski, A. Kowalczyk, E. Łukaszewicz, A. Gamian, I. Calkosiński.: Expression of advanced glycation end-products and NF κ B in chick embryos exposed to dioxins and treated with acetylsalicylic acid and α -tocopherol. Poult.Sci. 2017 Vol.96 no.6; s.1874-1883; **IF: 2.216**, Pkt. MNiSW/KBN: 35.000
- P. Kuropka, M. Dobrzyński, M. Tarnowska, M. Styczyńska, K. Dudek, **A. Leśków**, R.J. Wiglusz.: The influence of high doses of α -tocopherol on the content of selected trace elements in the liver of developing chicken embryos in experimentally induced 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin intoxication. Acta Biochim.Pol. 2019 Vol.66 no.2; s.223-228; **IF: 1.626**, Pkt. MNiSW/KBN: 15.000
- P. Kuropka, M. Dobrzyński, M. Tarnowska, R. Dymarek, **A. Leśków**, R.J. Wiglusz.: Thermographic evaluation of experimental pleurisy induced by carrageenan and modified by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Acta Bioeng.Biomech. 2019 Vol.21 no.3; s.23-29; **IF: 1.112**, Pkt. MNiSW/KBN: 15.000
- M. Dobrzyński, P. Kuropka, **A. Leśków**, K. Herman, M. Tarnowska, R.J. Wiglusz.: Co-expression of the aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor in the developing teeth of rat offspring after rat mothers' exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and the protective action of α -tocopherol and acetylsalicylic acid. Adv.Clin Exp.Med. 2019 Vol.28 no.7; s.993-1000; **IF: 1.227**, Pkt. MNiSW/KBN: 15.000
- M. Dobrzyński, P. Kuropka, M. Tarnowska, M. Styczyńska, K. Dudek, **A. Leśków**, S. Targońska, R.J. Wiglusz.: The protective effect of α -tocopherol on the content of selected elements in the calvaria for exposed hens to TCDD in the early embryonic period. Biol.Trace Elem.Res. 2019 Vol.190 no.2; s.517-525; **IF: 2.431**, Pkt. MNiSW/KBN: 15.000
- A. Leśków**, M. Nawrocka, M. Łatkowska, M. Tarnowska, N. Galas, A. Matejuk, I. Calkosiński.: Can contamination of the environment by dioxins cause craniofacial defects? Hum.Exp.Toxicol. 2019 Vol.38 no.9; s.1014-1023; **IF: 2.171**, Pkt. MNiSW/KBN: 20.000
- M. Dobrzyński, P. Kuropka, M. Tarnowska, K. Dudek, M. Styczyńska, **A. Leśków**, S. Targońska, R.J. Wiglusz.: Indirect study of the effect of α -tocopherol and acetylsalicylic acid on the mineral composition of bone tissue in the offspring of female rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: longterm observations. RSC Adv. 2019 Vol.9 no.14; s.8016-8024; **IF: 3.049**, Pkt. MNiSW/KBN: 30.000

Wnioski

1. Opracowana metoda własna izolacji i oczyszczania śluzów ślimaków *Limax maximus*, *Arion rufus* oraz *Helix pomatia* zapewnia jakość uzyskanego produktu, co warunkuje możliwość dalszej, bezpiecznej pracy ze śluzem. Dzięki ostatecznej, zliofilizowanej formie produktu możliwe jest również jego przechowywanie oraz łatwe rozpuszczanie w różnorodnych rozpuszczalnikach, co warunkuje szerokie spektrum zastosowań.
2. Pod względem morfologicznym śluz ślimaków *Limax maximus* i *Arion rufus* różni się od siebie, co uwarunkowane jest m.in. różnym składem śluzów i ich odczynem pH. Ponadto, w przypadku śluzów *Limax maximus* i *Arion rufus* obserwuje się dwa rodzaje śluzów, różniące się gęstością.
3. Śluz ślimaków *Limax maximus*, *Arion rufus* i *Helix pomatia* istotnie różni się od siebie pod względem twardości, konsystencji i spoistości. Właściwości fizykochemiczne śluzów są również zależne od sezonu (roku zbiorów).
4. Śluz trzech badanych gatunków ślimaków istotnie różni się stężeniem białka całkowitego. Śluz ślimaków *Limax maximus* zawiera największe stężenie białka całkowitego, natomiast śluz *Helix pomatia* nie zawiera białek.
5. W śluzach ślimaków *Limax maximus* i *Arion rufus* obecne są głównie białka o masie ok. 150 kDa oraz w mniejszej ilości białka o mniejszej masie cząsteczkowej.
6. Śluz *Limax maximus* i *Arion rufus* istotnie zmniejszają przeżywalność keratynocytów ludzkich oraz komórek czerniaka złośliwego.
7. Śluz ślimaków *Limax maximus* i *Arion rufus* działają cytotoksycznie zarówno względem keratynocytów ludzkich, jak i komórek czerniaka złośliwego. W celu określenia mechanizmów działania toksycznego, warunkującego zmniejszoną przeżywalność komórek, niezbędne są dalsze badania.

Słowa kluczowe: ślimak, śluz, skóra, czerniak, hodowla komórkowa, elektroforeza, białko całkowite, substancja biologicznie czynna