

STRESZCZENIE

Badania ostatnich lat wskazują na możliwość wykorzystania naturalnych polifenoli wyizolowanych z roślin jadalnych i leczniczych, zarówno w chemoprewencji, jak i w terapii przeciwnowotworowej. Polifenole to związki o dużym zróżnicowaniu strukturalnym, a w konsekwencji o bardzo szerokim spektrum właściwości biologicznych, w tym przeciwzapalnych. Modułując niektóre szlaki transdukcji sygnału, wpływają na ekspresję i/lub aktywność niektórych czynników transkrypcyjnych, enzymów i innych białek funkcjonalnych. Wzrasta również zainteresowanie ekstraktami roślinnymi bogatymi w polifenole, jako naturalnymi środkami chemoprewencyjnymi, wynikające z ich unikalnych oddziaływań synergistycznych. Badania epidemiologiczne podkreślają, że dieta bogata w prozdrowotne polifenole roślinne (owoce, warzywa, zielona herbata), zmniejsza ryzyko występowania wielu przewlekłych chorób, w tym również raka jelita grubego (*colorectal cancer*, CRC).

Chemoprewencyjne działanie polifenoli w CRC, będącego nowotworem o podłożu zapalnym, polega m.in. na hamowaniu potencjału transkrypcyjnego czynnika jądrowego κ B (*nuclear factor-kappaB*, NF- κ B), który pełni kluczową rolę w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w proces zapalny, inwazyjność i metastazę, takich jak cyklooksygenaza-2 (*cyclooxygenase-2*, COX-2 i metaloproteinaza-9 (*matrix metalloproteinase-9*, MMP-9). Z danych literaturowych wiadomo, że promotorowe regiony COX-2 i MMP-9 zawierają specyficzne sekwencje wiążące NF- κ B. Stąd wzrost ekspresji zarówno COX-2 jak i MMP-9 w nowotworowych komórkach jelita może być wynikiem aktywacji szlaku NF- κ B, co z kolei może promować progresję CRC. Zatem hamowanie ekspresji i/lub aktywności NF- κ B może stanowić istotny cel terapeutyczny w CRC.

Celem niniejszej pracy było:

1. otrzymanie preparatów flawanolowych z nasion wiesiołka dziwnego (*evening primrose flavanol preparation*, EPFP) i z owoców pigwowca japońskiego (*Japanese quince fruit flavanol preparation*, JQFFP),
2. scharakteryzowanie profilu polifenolowego otrzymanych preparatów,
3. ocena wpływu EPFP i JQFFP na wzrost ludzkich prawidłowych komórek nabłonka jelita (CCD-18Co) i ludzkich komórek raka jelita grubego (SW-480),
4. ocena wpływu ww. preparatów na ekspresję i/lub aktywność NF- κ B, COX-2 i MMP-9 w komórkach SW-480.

Analiza składu chemicznego otrzymanych preparatów wykazała, że EPFP i JQFFP stanowią bogate źródła polifenoli: pierwsze charakteryzują się wysoką zawartością proantocyjanidyn i hydrolizowalnych tanin, a ich profil polifenolowy jest bardzo urozmaicony; drugie zawierają znaczną ilość procyjanidyn (flawanoli).

Test z użyciem fioletu krystalicznego wykazał, że zarówno EPFP jak i JQFFP w stężeniach 25-150 μ M CE (wyrażone jako ekwiwalent (+) katechiny – *catechin equivalents*, CE) hamowały wzrost komórek SW-480 w sposób zależny od stężenia i czasu działania testowanych preparatów. Ponadto EPFP i JQFFP w badanym zakresie stężeń obniżały ekspresję NF- κ B na poziomie białka oraz fosforylację jego podjednostki p65 w komórkach SW-480. Co więcej, zmniejszały one również ekspresję COX-2 zarówno na poziomie mRNA jak i białka.

Ocena ekspresji MMP-9 z zastosowaniem techniki Western Blot wykazała inhibicję tego genu na poziomie białka pod wpływem obu testowanych preparatów. Ponadto obniżeniu uległa również enzymatyczna aktywność MMP-9 potwierdzona metodą zymografii.

W niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano, że flawanole z owoców pigwowca i z nasion wiesiołka dziwnego hamują ekspresję i/lub aktywność NF- κ B, COX-2 i MMP-9 w ludzkich

komórkach raka jelita SW-480. Wyniki powyższych badań sugerują cytotoksyczny, przeciwzapalny i przeciwinwazyjny charakter testowanych preparatów flawanolowych, czyniąc je interesującymi obiektami dalszych badań *in vivo* oraz badań klinicznych, które w przyszłości mogą doprowadzić do ich zastosowania w chemoprewencji - jako strategii w profilaktyce i terapii nowotworu jelita grubego.

ABSTRACT

Research carried out in recent years indicates that natural polyphenols isolated from edible and therapeutic plants could be used in both cancer prevention and therapy. Polyphenols are characterized by a high structural diversity which in turn results in a very wide range of biological activities, including anti-inflammatory activity. Through modulating some signal transduction pathways, they influence on the expression and/or activity of some transcriptional factors, enzymes and other functional proteins. Moreover, unique synergistic interactions of those compounds make polyphenol-rich extracts increasingly regarded as natural chemopreventive agents.

Epidemiological studies indicate that diet rich in healthy plant polyphenols (fruits, vegetables, green tea) decreases the risk of many chronic diseases, including colorectal cancer (CRC). Chemopreventive activity of polyphenols in CRC, which is an example of an inflammation-associated cancer, based on inhibition of transcriptional potential of nuclear factor-kappaB (NF- κ B), which plays a key role in regulation of genes expression involved in inflammation, invasiveness and metastasis such as cyclooxygenase-2 (COX-2) and matrix

metalloproteinase-9 (MMP-9). According to literature data, it is known that promoter regions of COX-2 and MMP-9 contain NF- κ B specific binding sites. Thus over-expression of both COX-2 and MMP-9 in colon cancer cells may result from NF- κ B signaling pathway activation and it can promote the progression of CRC. Therefore, the inhibition of NF- κ B expression and/or activity could be regarded as an important therapeutic target in CRC.

The aim of the present work was to:

1. Obtain flavanol preparations from defatted seeds of evening primrose (evening primrose flavanol preparation, EPFP) and from Japanese quince fruit (Japanese quince fruit flavanol preparation, JQFFP).
2. Characterize phenolic profile of EPFP and JQFFP.
3. Assess the influence of EPFP and JQFFP on the growth of human non-malignant colonic fibroblasts (CCD18-Co) and human SW-480 colon cancer cell line,
4. Assess the influence of the above-mentioned preparations on the expression and/or activity of NF- κ B, COX-2 and MMP-9 in SW-480 cells.

The analysis of phenolic profiles of the EPFP as well as JQFFP revealed that they are rich sources of polyphenols: the first characterizes high proanthocyanidins and hydrolysable tannins content, and their polyphenolic profile is highly diversified; the other comprises a large amount of procyanidins (flavanols).

Crystal violet staining assay indicated that both preparations at the concentration range from 25 to 150 μ M (expressed as (+)-catechin equivalents, CE) inhibited the growth of SW-480 cells in concentration and time-dependent manner. Additionally, EPFP and JQFFP at the whole concentration range reduced the expression level of NF- κ B protein and phosphorylation of the

p65 subunit in SW-480 cells. Moreover, both tested preparations decreased also mRNA and protein levels of COX-2 expression.

The evaluation of MMP-9 expression assessed by Western Blot analysis showed inhibition of this gene on protein level after treatment SW-480 cells with both flavanol preparations. Additionally, gelatin zymography found the tested preparations to inhibit the enzymatic activity of MMP-9.

The present study for the first time indicates that flavanols obtained from Japanese quince fruit and evening primrose seeds inhibit the expression and/or activity of NF- κ B, COX-2 and MMP-9 in SW-480 cells. The above results suggest cytotoxic, anti-inflammatory and anti-invasive properties of studied flavanol preparations and therefore they may become an attractive novel supplement for future anti-inflammatory CRC prevention.