



UNIWERSYTET
MEDYCZNY
W ŁODZI

ROZPRAWA DOKTORSKA

„Ocena potencjału chemoprewencyjnego ekstraktów fenolowych z liści pigwowca japońskiego”

mgr Katarzyna Chojnacka

PROMOTOR:

prof. dr hab. n. med. Urszula Lewandowska

Zakład Biochemii

Wydział Lekarski

Łódź, 2022

STRESZCZENIE

Rak jelita grubego (*colorectal cancer*, CRC) jest jednym z najczęściej występujących nowotworów na świecie, i pomimo stosowania badań przesiewowych oraz rozwoju terapii, to nadal jego zachorowalność i śmiertelność pozostają na wysokim poziomie. Do rozwoju CRC przyczyniają się czynniki genetyczne, ale przede wszystkim środowiskowe, a wśród nich szczególnie istotne jest występowanie przewlekłego stanu zapalnego w obrębie przewodu pokarmowego oraz nieprawidłowa dieta. Spożywanie pokarmów oraz napojów pochodzenia roślinnego, zwłaszcza tych o wysokiej zawartości polifenoli może mieć chemoprewencyjny wpływ na CRC, ze względu na szereg prozdrowotnych właściwości jakie wykazują te związki. Polifenole charakteryzują się dużą różnorodnością strukturalną, co przekłada się na szerokie działanie terapeutyczne, w tym aktywność antyoksydacyjną, przeciwzapalną oraz antynowotworową. Związki te posiadają zdolność do modulowania ekspresji i aktywności wielu białek w tym enzymów, a także regulacji szeregu komórkowych szlaków sygnałowych. W ostatnich latach wzrosło również zainteresowanie nad badaniami, które skupiają się na preparatach i ekstraktach bogatych w polifenole, jako potencjalnych środkach chemoprewencyjnych.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie właściwości przeciwzapalnych i antynowotworowych ekstraktów fenolowych z liści pigwowca japońskiego (*Chaenomeles japonica* Lindl.) w modelach *in vitro*. Do celów szczegółowych należało otrzymanie ekstraktów fenolowych z liści pigwowca japońskiego: ekstraktu surowego (*crude phenolic extract*, CPE) oraz ekstraktu bogatego w związki fenolowe (*phenolic-rich extract*, PRE), a także jakościowa oraz ilościowa analiza związków fenolowych zawartych w CPE i PRE. Kolejnym celem było określenie zdolności antyoksydacyjnej i właściwości cytotoksycznych

CPE i PRE na ludzkich komórkach raka jelita grubego (SW-480 i HT-29) oraz ludzkich prawidłowych komórkach jelita (CCD 841 CoN i CCD-18Co). Ekstrakt bogaty w związki fenolowe został również przebadany pod względem aktywności cytotoksycznej na komórkach mysich makrofagów RAW264.7. Ponadto, określony został wpływ PRE na ekspresję mediatorów stanu zapalnego – interleukinę 1 beta (*interleukin 1 beta*, IL-1 β), IL-6, czynnika martwicy nowotworów alfa (*tumor necrosis factor alpha*, TNF- α), cyklooksygenazę (*cyclooxygenase*, COX-2), indukowalną syntazę tlenku azotu (*inducible nitric oxide synthase*, iNOS), a także produkcję tlenku azotu (*nitric oxide*, NO) w RAW264.7. Oceniono również wpływ PRE na poziom ekspresji białek należących do szlaku komórkowego związanego z jądrowym czynnikiem transkrypcyjnym NF kappa B (*nuclear factor kappa B*, NF- κ B) w RAW264.7. Kolejnym celem było zbadanie właściwości przeciwmigracyjnych i przeciwinwazyjnych PRE w komórkach SW-480, HT-29 i CCD 841 CoN. Określony został wpływ PRE na poziom syntezy i aktywności enzymatycznej metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej 9 i 2 (*matrix metalloproteinases*, MMP-9 i MMP-2), oraz poziom ekspresji białek: kinazy regulowanej sygnałem pozakomórkowym (*extracellular-signal regulated kinase*, ERK) oraz kinazy białkowej B (*protein kinase B*, AKT) w tych komórkach.

Analiza składu ekstraktów z liści pigwowca japońskiego wykazała, iż zawierają one zróżnicowane związki fenolowe, wśród których głównymi składnikami były kwas chlorogenowy i heksozyd naringeniny. Ekstrakt PRE cechował się o 33% wyższą zawartością związków fenolowych w porównaniu do CPE, co przełożyło się na jego niemal dwukrotnie wyższą aktywnością antyoksydacyjną. Dodatkowo, PRE silniej hamował żywotności komórek nowotworowych (SW-480 i HT-29) niż prawidłowych komórek jelita (CCD 841 CoN i CCD-18Co). Ze względu na wyższą aktywność antyoksydacyjną i silniejsze działanie cytotoksyczne PRE, został on wykorzystany w dalszych badaniach.

Ekstrakt PRE charakteryzował się również aktywnością przeciwzapalną. Badania przeprowadzone na stymulowanych lipopolisacharydem (*lipopolysaccharide*, LPS) makrofagach RAW264.7 wykazały, iż posiada on zdolność do hamowania ekspresji prozapalnych cytokin: IL-1 β , IL-6, TNF- α , a także enzymów: COX-2 oraz iNOS. Ponadto, PRE istotnie hamował produkcję NO. Analiza ekspresji białek związanych ze szlakiem NF- κ B wykazała również, iż PRE posiada zdolność do regulacji NF- κ B p65, p-NF- κ B p65, I κ B- α w RAW264.7. Przeciwzapalna aktywność ekstraktu wynika zatem z jego zdolności do hamowania ekspresji mediatorów stanu zapalnego poprzez szlak NF- κ B.

Dodatkowo, dalsze badania przeprowadzone na komórkach raka jelita grubego wykazały, iż PRE posiada aktywność antynowotworową. Ekstrakt wykazał zdolność do hamowania migracji oraz inwazji komórek SW-480 i HT-29. PRE w sposób istotny hamował syntezę i aktywność enzymatyczną MMP-9 oraz MMP-2, za pośrednictwem regulacji szlaków sygnałowych ERK i AKT, gdyż wykazał on zdolność do modulacji ekspresji form ufosforylowanych p-ERK oraz p-AKT w komórkach raka jelita grubego.

W niniejszej pracy doktorskiej po raz pierwszy wykazano przeciwzapalny oraz antynowotworowy potencjał ekstraktów z liści pigwowca japońskiego (*Chaenomeles japonica* Lindl.) wykorzystując modele *in vitro*. Praca ta może stanowić podstawę do dalszych badań nad chemoprewencyjnymi właściwościami tych ekstraktów w badaniach *in vivo*, a w przyszłości do zastosowania ich jako suplementów bądź terapii uzupełniającej w leczeniu raka jelita grubego.

SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers in the world, and despite the use of screening tests and the development of therapies, its morbidity and mortality remain at a high level. There are many factors that contribute to the development of CRC, such as genetic and environmental factors. Among them, the presence of chronic inflammation in the gastrointestinal tract and a Western diet are particularly important. Consumption of foods and beverages of plant origin, especially those with a high content of polyphenolic compounds, may have a chemopreventive effect on CRC due to several health-promoting properties that these compounds exhibit. Polyphenols are characterized by a high structural diversity, which contributes to a wide therapeutic effect, including antioxidant, anti-inflammatory, and anti-cancer activity. Moreover, these compounds can modulate the expression and activity of many proteins, including enzymes, and regulate multiple cell signaling pathways. In recent years, there has also been increased interest in research that focuses on polyphenol-rich preparations and extracts as potential chemopreventive agents.

This dissertation aimed to determine the anti-inflammatory and anti-cancer properties of phenolic extracts from Japanese quince leaves (*Chaenomeles japonica* Lindl.) *in vitro*. The detailed objectives included obtaining crude phenolic extract (CPE) and phenolic-rich extract (PRE) from Japanese quince leaves, as well as the qualitative and quantitative analysis of the phenolic compounds contained in CPE and PRE. Another goal was to determine the antioxidant capacity and cytotoxic properties of CPE and PRE on human colorectal cancer cells (SW-480 and HT-29) and human normal intestinal cells (CCD 841 CoN and CCD-18Co). The phenolic-rich extract was then tested for cytotoxic activity on RAW264.7 mouse macrophage cells. Moreover, the influence of PRE on the expression of inflammatory mediators was examined. This research focused on interleukin 1 beta (IL-1 β), IL-6, tumor

necrosis factor alpha (TNF- α), cyclooxygenase (COX- 2), inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression, and nitric oxide (NO) production in RAW264.7 cells. The impact of PRE on the expression of proteins belonging to the cell pathway associated with the nuclear transcription factor NF kappa B (NF- κ B) in RAW264.7 was also assessed. Another goal was to investigate the anti-migration and anti-invasive properties of PRE in SW-480, HT-29, and CCD 841 CoN cells. The influence of PRE on the synthesis and enzymatic activity of matrix metalloproteinases 9 and 2 (MMP-9 and MMP-2) was determined. This research further involved examining the effect of PRE on the protein expression of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and protein kinase B (AKT) in colon cancer cells.

The analysis of the composition of Japanese quince leaf extracts showed that both extracts contained various phenolic compounds, with the main ingredients being chlorogenic acid and naringenin hexoside. PRE extract was characterized by a 33% higher content of phenolic compounds compared to CPE, which contributed to an almost 2-fold higher antioxidant activity for PRE. In addition, PRE inhibited the viability of colon cancer cells (SW-480 and HT-29) more strongly than that of normal intestinal cells (CCD 841 CoN and CCD-18Co). Due to the higher antioxidant activity and stronger cytotoxic effect of PRE, this extract was the focus of further research. PRE extract was additionally characterized by anti-inflammatory activity. Research conducted on RAW264.7 stimulated with lipopolysaccharide (LPS) presented that the extract can inhibit the expression of pro-inflammatory cytokines: IL-1 β , IL-6, TNF- α , as well as the enzymes: COX-2 and iNOS. Moreover, PRE significantly inhibited NO production. Analysis of the expression of proteins related to the NF- κ B pathway also showed that PRE can effectively regulate NF- κ B p65, p-NF- κ B p65, and I κ B- α in RAW264.7. The anti-inflammatory activity of the extract is therefore due to its ability to inhibit the expression of inflammatory mediators *via* the NF- κ B pathway.

In addition, further studies on colon cancer cells showed that PRE has anti-cancer activity. The extract showed the ability to inhibit migration and invasion of SW-480 and HT-29 cells. Furthermore, PRE significantly inhibited the synthesis and enzymatic activity of MMP-9 and MMP-2 through the regulation of ERK and AKT signaling pathways.

In this doctoral thesis, the anti-inflammatory and anti-cancer potential of Japanese quince leaf extracts (*Chaenomeles japonica* Lindl.) was demonstrated for the first time using *in vitro* models. Overall, these promising results increase the knowledge in the field of chemopreventive effects of phenolic extracts and could be useful for further studies to highlight the value of natural compounds. This work may be also the basis for further research on the chemopreventive properties of Japanese quince leaf extracts in studies against colorectal cancer.