

Mgr Ewa Langner

Tytuł pracy: „Ocena potencjału chemoprewencyjnego melanoidyn izolowanych z ogrzewanego włókna ziemniaczanego typu Potex. Badania *in vitro* w komórkowym modelu glejaka i raka jelita grubego.”

Promotor: Prof. dr hab. Wojciech Rzeski

VII. STRESZCZENIE

Choroby nowotworowe, pomimo stale doskonalonych metod ich leczenia, nadal stanowią nierozwiązany problem współczesnej medycyny. O małej efektywności aplikowanej terapii decyduje zazwyczaj zbyt późna diagnoza oraz toksyczność stosowanego leku względem zdrowych komórek organizmu. Pomijając fakt ogromnych trudności w terapii nowotworów, istnieje ogólne przekonanie o celowości i przewadze przeciwdziałania powstawaniu pierwszych zmian chorobowych nad leczeniem choroby w jej zaawansowanym stadium. Ponieważ rozwój nowotworu jest procesem długotrwałym, a wczesna diagnoza niezmiernie trudna, przeciwdziałanie powstawaniu wczesnych zmian neoplastycznych wydaje się stanowić fundamentalną rolę w ochronie przed rakiem. Wiele przesłanek wskazuje na to, że odpowiednia dieta oraz aktywność fizyczna mogą odgrywać znaczącą rolę w prewencji nowotworów. Istnieje wiele doniesień na temat bioaktywnych związków pochodzenia roślinnego, o udowodnionych chemoprewencyjnych oraz przeciwnowotworowych właściwościach. Błonnik dietetyczny od wielu lat postrzegany jest jako potencjalny czynnik chemoprewencyjny w procesie nowotworzenia w obrębie jelita grubego. Mimo, że nie ustanowiono jednolitego stanowiska w tej kwestii, stale zalecane jest spożywanie produktów zawierających włókno dietetyczne, w celu zwiększenia jego spożycia w codziennej diecie. Błonnik ziemniaczany Potex stanowi jeden z przykładów błonnika dietetycznego, stosowanego jako dodatek w produktach spożywczych (pieczywie, wędlinach), ze względu na swoje pozytywne właściwości fizykochemiczne. Produkty zawierające włókno Potex często poddawane są obróbce termicznej, co może prowadzić do powstawania nowych biologicznie czynnych substancji. Ze względu na wysoką zawartość polisacharydów oraz białka, proces ogrzewania błonnika Potex może prowadzić do powstawania melanoidyn w wyniku reakcji Maillarda. Melanoidyny stanowią grupę substancji powszechnie występujących w codziennej diecie, o udowodnionych właściwościach antyoksydacyjnych, których potencjał przeciwnowotworowy jest słabo zbadany.

Punktem wyjścia do badań właściwych przedstawionych w niniejszej pracy było wyselekcjonowanie w badaniach screeningowych ekstraktu AM4 (otrzymanego z błonnika Potex ogrzewanego przez 2 godziny w 180°C), charakteryzującego się najwyższą aktywnością w komórkach nowotworowych *in vitro*. Następnie, analizom w modelu komórek glejaka linii C6 oraz raka jelita grubego linii LS180, poddano zarówno cały ekstrakt ogrzewanego przez 2 godziny w 180°C błonnika Potex, jak również dwie frakcje izolowane z

ww. ekstraktu, w tym frakcję związków wysokocząsteczkowych (HMW) oraz związków niskocząsteczkowych (LMW). Niezależne analizy chemiczne przeprowadzone przez Profesora Fernando M. Nunesa wykazały, że wspomniane frakcje zawierają melanoidyny bądź mogą być traktowane jako frakcje melanoidyn. Wykazano, że badany ekstrakt w sposób zależny od stężenia, hamuje przeżywalność/ proliferację różnych typów komórek nowotworowych *in vitro*. Ponadto, zaproponowano molekularny mechanizm jego działania w komórkach glejaka linii C6 oraz raka jelita grubego linii LS180. Badania wykazały, że ekstrakt ogrzewanego błonnika indukuje zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G0-G1 w komórkach obu wymienionych typów nowotworów, co skorelowane było m.in. z obniżoną ekspresją cykliny D1 oraz zwiększoną ekspresją białka p21. Dodatkowo, stwierdzono wpływ ekstraktu na szlaki przekazywania sygnałów w badanych komórkach nowotworowych, wykazując znaczące zmiany w poziomie fosforylacji kinaz MAP, w tym ERK1/2, p38 oraz SAPK/JNK. W przypadku komórek glejaka, odnotowano także spadek fosforylacji kinazy Akt. Wykazano, że zarówno frakcja melanoidyn wysokocząsteczkowych, jak i frakcja związków niskocząsteczkowych izolowanych z ekstraktu, są zaangażowane w obserwowaną aktywność ekstraktu ogrzewanego błonnika Potex. Jednocześnie wskazano na większą aktywność frakcji HMW w komórkach glejaka linii C6 oraz frakcji LMW w komórkach raka jelita grubego linii LS180.

Podsumowując, ogrzewane włókno ziemniaczane Potex oraz zawarte w nim melanoidyny izolowane z ekstraktu, mogą stanowić potencjalny czynnik chemoprewencyjny w aspekcie chorób nowotworowych, a ich zastosowanie jako np. suplementów diety powinno być rozpatrzone w przyszłości.

VIII. SUMMARY

Despite an enormous progress in treatment strategies development, cancer is still being an unresolved medical problem. Too late diagnosis and high toxicity of applied drugs are the most common reasons of low effectiveness of anticancer therapies. Regardless to enormous difficulties in cancer therapy, there is an overall agreement nowadays, that it is preferable to prevent the disease than cure its end-stage. As tumor development takes many years and early diagnosis is extremely hard, primary lesions counteraction seems to play fundamental role in cancer protection. There is a general belief that dietary patterns and regular physical activity could help to prevent cancer. A vast of plant-derived bioactive compounds have been shown to exert chemopreventive and anticancer activity in respect of human cancers. Since many years dietary fiber is believed to prevent colorectal carcinogenesis; however, discrepancy between findings leads to lack of consensus in this matter. Nevertheless, increasing the daily intake of dietary fiber is still being widely recommended. Potato fiber Potex constitute an example of dietary fiber which due to its physicochemical properties is applied as an ingredient of foodstuffs, i.e. bakery products and cold meats. Since foods containing Potex are often subjected to thermal treatment, this may lead to creation of new bioactive compounds from the fiber. Due to high amounts of polysaccharides and protein content melanoidins may form as a result of Maillard reaction. Melanoidins constitute a group of complex compounds abundantly found in daily diet which antioxidant activity has been broadly stated; however, their activity in cancer cells has been poorly explored to date.

At the screening stage of present study, AM4 extract (obtained from Potex heated for 2 hours in 180°C) has been selected as the most active in cancer cells *in vitro*. Next, activity of the whole extract of heated (180°C/2h) fiber Potex as well as its both fractions of high (HMW) and low molecular weight (LMW) compounds was analyzed in C6 glioma and LS180 colon cancer cells. Independent chemical analyses performed by Professor Fernando M. Nunes have indicated that both fractions may be regarded as/ contain melanoidin complexes. It has been shown in number of cancer cells models *in vitro*, that tested extract inhibits cancer cells viability in a concentration-dependent manner. Furthermore, molecular mechanism of the observed activity has been proposed in C6 glioma and LS180 colon carcinoma cells. Cell cycle arrest in G0-G1 phase of both glioma and colon carcinoma cells has been shown due to extract treatment, which was correlated with decreased expression of cyclin D1 and increased expression of p21 protein. Moreover, tested extract was shown to influence the signaling pathways within both cancer cells types and alteration in

phosphorylation level of MAP kinases was observed, i.e. ERK1/2, p38 and SAPK/JNK kinases. When considering glioma cells, decreased phosphorylation of Akt kinase was also noted. Furthermore, high molecular weight melanoidins fraction as well as low molecular weight compounds isolated from the AM4 extract were responsible for the observed activity of whole AM4 extract in cancer cells. Simultaneously, higher activity of HMW than LMW fraction was noted in C6 glioma cells, while the opposite effect was observed in LS180 colon cancer cells.

In conclusion, the heated Potex and isolated melanoidins may be considered as potential chemopreventive agents in cancer prevention and their application as e.g. food supplements should be examined in the future.