

STRESZCZENIE

Skuteczne leczenie chorób nowotworowych stanowi ważny problem kliniczny o dużym znaczeniu społecznym. Rak jelita grubego (CRC) jest coraz częściej spotykanym nowotworem złośliwym przewodu pokarmowego. Spośród rozpoznawanych nowotworów złośliwych, pod względem śmiertelności zajmuje drugie miejsce po raku sutka u kobiet i płuc u mężczyzn. Dotyczy nie tylko osób starszych, nierzadko diagnozowany jest także u osób młodych z wieloletnim wywiadem w kierunku obecności stanów przednowotworowych. Około 10% przypadków CRC rozwija się z powodu zespołów dziedzicznych, takich jak rodzinna polipowatość gruczolakowata i zespół Lyncha. Większe ryzyko zachorowania na CRC obserwuje się również u pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit, takimi jak wrzodziejące zapalenie jelita grubego i choroba Leśniowskiego-Crohna. Dodatkowo na progresję CRC może wpływać mikrobiota jelita grubego, która jest znacznie zmieniona u chorych na raka w porównaniu z osobami zdrowymi. Uważa się, że zmiany w mikrobiocie odgrywają ważną rolę nie tylko w utrzymaniu homeostazy i integralności jelit, ale także w modulacji reakcji zapalnych. Cytotoksyczne szczepy *E. coli* są nadreprezentowane u pacjentów cierpiących na CRC. Skład i aktywność enzymatyczna mikrobioty jelita grubego może w istotny sposób wpływać na skuteczność chemioterapii. Z drugiej strony, leki chemioterapeutyczne mogą wpływać na mikrobiotę jelitową. Irynotekan jest szeroko stosowanym chemioterapeutykiem w leczeniu raka jelita grubego. Jednak jego rozkład w jelitach z powrotem do aktywnej formy leku przez bakteryjną β -glukuronidazę (GUS) stanowi główną przyczynę obserwowanej toksyczności jelitowej irynotekanu. Leczenie wspomagające mające na celu złagodzenie niepożądanych objawów jest zatem równie ważne jak sama chemioterapia. Celem projektu była ocena interakcji genotoksycznych szczepów *E. coli* z nabłonkiem jelita grubego i wpływu pektyn na aktywność przeciwnowotworową irynotekanu.

Pektyny to heterogeniczna rodzina polisacharydów, stanowiąca około 35-50 % suchej masy ścian komórek roślin wyższych dwuliściennych i jednoliściennych. W diecie człowieka pektyny stanowią główny składnik błonnika pokarmowego – tzw. błonnik rozpuszczalny o bardzo różnorodnej aktywności biologicznej. Cechują się zdolnością do obniżania poziomu lipidów, cholesterolu i glukozy w surowicy krwi. Pektyny pełnią również funkcję czynników immunomodulujących. Udowodniony został także korzystny wpływ obecności pektyn w diecie na mikroflorę przewodu pokarmowego, jak również ich właściwości antykancerogenne. Charakteryzują się dużą zdolnością adhezji do błony śluzowej jelita, tworząc w ten sposób barierę ochronną przed kolonizacją przez oportunistyczną mikroflorę. Prawie 90% pektyny podanej doustnie dociera do okrężnicy. Pektyna w świetle jelita tworzy sprzyjające środowisko dla prawidłowego mikrobiomu i stanowi ważne źródło jego składników odżywczych.

Przemysłowo pektyny ekstrahuje się z macierzy roślinnej poprzez wymywanie słabymi kwasami mineralnymi w wysokiej temperaturze. Taka procedura powoduje jednak, że rozgałęzione struktury pektyn, takie jak ramnogalakturonian I czy ramnogalakturonian II w znacznej części ulegają zniszczeniu. Uważa się, że to właśnie te regiony są kluczowe dla prebiotycznych, immunomodulacyjnych i przeciwnowotworowych właściwości pektyn.

Pektyny badane w niniejszym projekcie zostały enzymatycznie wyekstrahowane z wycieków jabłkowych przy użyciu endo- celulazy i endoksyłanazy syntetyzowanych przez workowce z gatunku *Trichoderma viride*. Oba enzymy z dużą selektywnością hydrolizują wiązania β -1,4 glikozydowe odpowiednio w łańcuchach celulozy i ksylanu dlatego mogą współdziałać w uwalnianiu pektyny ze ścian komórkowych. Dzięki ich użyciu solo i w kooperacji otrzymano trzy unikalne preparaty pektyn jabłkowych nazwane PC, PX i PCX. Właściwości przeciwnowotworowe pektyn jabłkowych badano w panelu linii komórkowych raka okrężnicy (HCT116, Caco-2 i HT-29). Nowotwory jelita grubego są molekularnie niejednorodne i można je podzielić na klinicznie istotne podtypy związane z rokowaniem pacjenta i odpowiedzią na leczenie. HT-29, HCT116 i Caco-2 to modelowe linie komórkowe raka okrężnicy powszechnie stosowane w badaniach. Różnią się pochodzeniem płciowym i statusem mutacji. Toksyczność badanych pektyn została również oceniona wobec komórek nienowotworowych linii FHC (ludzki nabłonek okrężnicy płodu).

Dowiedziano, że nowe, enzymatycznie wyekstrahowane pektyny jabłkowe mogą być obiecującymi kandydatami jako uzupełnienie terapii irynotekanem. Uzyskane pektyny same w sobie zmniejszały żywotność komórek raka jelita grubego, indukowały apoptozę i zwiększały wewnątrzkomórkową produkcję reaktywnych form tlenu. Ponadto nasilały cytotoksyczne i proapoptotyczne działanie irynotekanu. Wyniki badań pozwoliły na stwierdzenie, że w molekularnym mechanizmie działania przeciwzapalnego i przeciwnowotworowego wyizolowanych pektyn jabłkowych biorą udział zarówno: Gal-3 jak i TLR4.

Ponadto pektyny inhibitowały aktywność β -glukuronidazy wytwarzanej przez szczepy *E. coli*-komensalnej mikroflory jelitowej. Dodatkowo badane pektyny hamowały i ograniczały adhezję inwazyjnego szczepu *E. coli* (AIEC) LF82 oraz szczepu laboratoryjnego K-12C600 do komórek raka jelita grubego.

Stwierdzono, że stosunkowo niska masa cząsteczkowa pektyny PCX (pektyna izolowana przez współdziałanie endo-celulazy i endoksyłanazy) wraz ze stosunkowo wysokim udziałem regionów RG I nadaje tej pektynie lepsze właściwości przeciwnowotworowe.

Podsumowując, nowe enzymatycznie otrzymane pektyny jabłkowe zostały zidentyfikowane jako pektyny o potencjale adiuwantów terapii irynotekanem oraz mogące dodatkowo złagodzić jego efekty uboczne poprzez hamowanie bakteryjnej GUS i w ten sposób zwiększyć skuteczność terapeutyczną tego leku.

SUMMARY

The effective treatment of cancer is an important clinical problem of great societal importance. Colorectal cancer (CRC) is an increasingly common malignancy of the gastrointestinal tract. Among diagnosed malignancies, it ranks second in terms of mortality after breast cancer in women and lung cancer in men. It affects not only the elderly. It is also not uncommon to diagnose CRC in young people with a long history of pre-malignant conditions. About 10 per cent of CRC cases develop due to hereditary syndromes such as familial adenomatous polyposis and Lynch syndrome. Patients with inflammatory bowel disease, such as ulcerative colitis and Crohn's disease, are also at higher risk of developing CRC. In addition, CRC progression may be influenced by the gut microbiota, which is significantly altered in cancer patients compared to healthy individuals. Changes in the microbiota are thought to play an important role not only in maintaining intestinal homeostasis and integrity, but also in modulating inflammatory responses. Cytotoxic *E. coli* strains are overrepresented in CRC patients. The composition and enzymatic activity of the gut microbiota can significantly influence the efficacy of chemotherapy. On the other hand, chemotherapeutic drugs can affect the gut microbiota. Irinotecan is a widely used chemotherapeutic agent for the treatment of colorectal cancer. However, its degradation in the gut back to the active form of the drug by bacterial β -glucuronidase (GUS) is the main reason for the observed intestinal toxicity of irinotecan. Supportive treatment to alleviate adverse effects is therefore as important as chemotherapy itself. The aim of this project was to evaluate the interaction of genotoxic *E. coli* strains with the colonic epithelium and the effect of pectins on the antitumor activity of irinotecan.

Pectins are a complex, heterogeneous family of polysaccharides, constituting about 35 % of the dry weight of the cell walls of higher dicotyledonous and monocotyledonous plants. They are the main component of dietary fiber. When consumed with the diet, they exhibit a wide variety of biological activities. They have the ability to lower serum lipid, cholesterol and glucose levels. Pectins also act as immunomodulating agents. The beneficial effect of the presence of pectins in the diet on the microflora of the gastrointestinal tract, as well as their proapoptotic and anticancerogenic properties, has also been demonstrated. They are characterized by high adhesion to the intestinal mucosa, thus forming a protective barrier against colonisation by opportunistic microflora. Almost 90% of orally administered pectin reaches the distal portion of the colon. Pectins create a favourable environment for a healthy microbiome and provide a source of nutrients for the bacteria inhabiting the colon.

Industrially, pectins are extracted from the plant matrix by treatment in a high temperature and acidic environment. Such a procedure causes many of the branched

structures of rhamnogalacturonan I or rhamnogalacturonan II formed by the sugars to then be destroyed. It is believed that it is these regions that are crucial for the prebiotic, immunomodulatory and anticancer properties of pectins.

The pectins studied in this project were enzymatically extracted from apple pomace using endocellulase and endoxylanase from the filamentous fungus *Trichoderma viride*. Both enzymes cleave β -1,4 glycosidic bonds in the cellulose and xylan chains, respectively. Both enzymes cooperate in the release of pectin from cell walls. Three unique preparations of apple pectin were obtained (PC, PX, PCX). The anticancer properties of apple pectins were tested in a panel of colon cancer cell lines (HCT116, Caco-2 and HT-29). Colorectal cancers are molecularly heterogeneous and can be divided into clinically relevant subtypes related to patient prognosis and response to treatment. HT-29, HCT116 and Caco-2 are model colon cancer cell lines commonly used in research. They differ in gender origin and mutation status. The toxicity of the tested pectins was also evaluated against non-cancerous cells, FHC cells (human fetal colonic epithelium).

It was demonstrated that the new enzymatically extracted apple pectins could be promising candidates as an adjunct to irinotecan therapy. The obtained pectins themselves reduced the viability of colon cancer cells, induced apoptosis and increased intracellular production of reactive oxygen species. They enhanced the cytotoxic and proapoptotic effects of irinotecan. The results concluded that the molecular mechanism of the anti-inflammatory and anticancer effects of the isolated apple pectins involves both: Gal-3 and TLR4.

Furthermore, the pectin responsible for changes in β -glucuronidase activity was identified, as well as changes in β -glucuronidase activity produced by strains of *E. coli*, the commensal intestinal microflora. In addition, the pectins tested inhibited the adhesion of the invasive *E. coli* (AIEC) strain LF82 and the laboratory strain K-12C600 to colon cancer cells.

It was found that the relatively low molecular weight of PCX pectin (pectin isolated by both endo-cellulase and endoxylanase), together with the relatively high proportion of RG I regions, gave this pectin superior anticancer properties.

In conclusion, novel enzymatically obtained apple pectins have been identified as pectins with potential as adjuvants to irinotecan therapy and with the potential to further alleviate its side effects by inhibiting bacterial β -glucuronidase and thus enhance the therapeutic efficacy of this drug.