

Streszczenie w języku polskim

Związki pochodzenia roślinnego stanowią bogate źródło substancji o potencjale terapeutycznym, zdolnych do wielokierunkowej modulacji szlaków regulujących proliferację, przeżycie oraz procesy zapalne. Ponieważ przewlekły stan zapalny pozostaje w ścisłym związku z transformacją nowotworową, jego regulacja może odgrywać istotną rolę w kontroli nowotworzenia. Kwas roburowy (RA), tetracykliczny triterpenoid pochodzenia roślinnego, był dotychczas analizowany głównie w kontekście aktywności przeciwzapalnej, podczas gdy jego potencjał przeciwnowotworowy pozostaje słabo poznany. Celem niniejszych badań była zatem kompleksowa ocena właściwości biologicznych RA w modelach raka jelita grubego oraz identyfikacja mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za jego działanie.

Analizy żywotności *in vitro* wykazały, że związek w sposób zależny od stężenia i czasu ekspozycji obniża aktywność metaboliczną komórek nowotworowych. Uzupełniające testy proliferacji, obejmujące test inkorporacji bromodeoksyurydyny oraz analizę klonogenności, potwierdziły ograniczenie syntezy DNA i potencjału klonalnego, wskazując na cytostatyczny, a nie cytotoksyczny charakter działania RA. Zatrzymaniu proliferacji towarzyszyła akumulacja komórek w fazie G₀/G₁ cyklu komórkowego, spadek ekspresji markerów proliferacji (*MKI67*, *PCNA*) oraz obniżenie poziomu białka Ki-67. Jednocześnie obserwowano wzrost ekspresji *CDKN1A* oraz zmiany poziomu i lokalizacji białka p21, częściowo niezależne od osi p53, co wskazuje na alternatywne mechanizmy regulacji cyklu komórkowego. Wykazano również hamowanie aktywności transkrypcyjnej szlaku NF-κB indukowanej TNF-α, co wskazuje na udział osi TNF-α/NF-κB w ograniczaniu sygnałów pro-proliferacyjnych i pro-przeżyciowych.

Analiza potencjału błony mitochondrialnej ujawniła jego obniżenie już we wczesnych etapach ekspozycji, jednak wyraźna indukcja apoptozy występowała głównie przy najwyższych stężeniach i po wydłużonym czasie inkubacji, bez istotnego wzrostu nekrozy. Dodatkowo brak jednoznacznego efektu po zastosowaniu inhibitorów regulowanej śmierci komórkowej wskazuje, że apoptoza nie stanowi dominującego mechanizmu działania RA, a jego aktywacja ma charakter wtórny. Obserwowana aktywacja kaspazy 9 sugeruje udział

mitochondrialnego szlaku apoptozy. Badania genotoksyczności oraz analiza poziomu reaktywnych form tlenu nie wykazały istotnego uszkodzenia DNA ani działania prooksydacyjnego. Natomiast, analizy *in silico* wskazały na korzystny profil farmakokinetyczny RA oraz zidentyfikowały potencjalne cele molekularne związane z regulacją metabolizmu lipidów, co sugeruje możliwy udział mechanizmów metabolicznych w obserwowanym efekcie antyproliferacyjnym.

Uzyskane wyniki wskazują, że RA działa jako wielopoziomowy modulator szlaków regulujących proliferację i przeżycie komórek nowotworowych, wywołując przede wszystkim efekt cytostatyczny poprzez hamowanie osi TNF- α /NF- κ B oraz zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G₀/G₁, z wtórną aktywacją mechanizmów apoptotycznych zależnych od mitochondriów.

Streszczenie w języku angielskim

Plant-derived compounds constitute a rich source of substances with therapeutic potential, capable of multi-target modulation of pathways regulating cell proliferation, survival, and inflammatory processes. Since chronic inflammation is closely associated with tumorigenesis, its regulation may play a key role in cancer control. Roburic acid (RA), a plant-derived tetracyclic triterpenoid, has so far been investigated mainly for its anti-inflammatory activity, while its anticancer potential remains poorly characterized. The present study aimed to comprehensively evaluate the biological properties of RA in colorectal cancer models and to identify the molecular mechanisms underlying its activity.

In vitro viability assays demonstrated that RA reduced cancer cell metabolic activity in a concentration- and time-dependent manner. Complementary proliferation analyses, including bromodeoxyuridine incorporation and clonogenic assays, confirmed a reduction in DNA synthesis and clonogenic potential, indicating a cytostatic rather than cytotoxic mode of action. Inhibition of proliferation was associated with cell cycle arrest in the G₀/G₁ phase, decreased expression of proliferation markers (*MKI67*, *PCNA*), and reduced levels of the Ki-67 protein. At the same time, increased expression of *CDKN1A* and changes in the level and subcellular localization of p21 were observed, partially independent

of the p53 axis, suggesting alternative mechanisms of cell cycle regulation. In addition, RA suppressed TNF- α -induced NF- κ B transcriptional activity, suggesting the involvement of the TNF- α /NF- κ B axis in the suppression of pro-proliferative and pro-survival signaling.

Analysis of mitochondrial membrane potential revealed its early reduction upon RA exposure; however, pronounced induction of apoptosis was observed mainly at higher concentrations and after prolonged incubation, without a significant increase in necrosis. Furthermore, the lack of a clear protective effect following the application of inhibitors of regulated cell death suggests that apoptosis is not the dominant mechanism of RA action, but rather a secondary response. The observed activation of caspase 9 indicates the involvement of the mitochondrial apoptotic pathway. Genotoxicity assays and analysis of reactive oxygen species levels did not reveal significant DNA damage or pro-oxidative effects. Complementary *in silico* analyses indicated a favorable pharmacokinetic profile of RA and identified potential molecular targets associated with lipid metabolism, suggesting a possible contribution of metabolic mechanisms to the observed antiproliferative effect.

Collectively, the results indicate that RA acts as a multi-level modulator of signaling pathways regulating cancer cell proliferation and survival, primarily exerting a cytostatic effect through inhibition of the TNF- α /NF- κ B axis and induction of G₀/G₁ cell cycle arrest, with secondary activation of mitochondria-dependent apoptotic mechanisms.