

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
MEDICINĂ

*Studii privind posibilele efecte antitumorale ale unor
compuși flavonoizi*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. GANEA CONSTANȚA

Student-doctorand:

FILIPPI ALEXANDRU

2018

Cuprins

| | |
|---|----|
| Cuprinsul tezei de doctorat | 3 |
| Stadiul actual al cunoașterii..... | 8 |
| Contribuții personale..... | 10 |
| Materiale și metode | 10 |
| Rezultate..... | 13 |
| Efectele citotoxice ale EGCG în liniile celulare A431 de cancer epidermoid și SK-BR-3 de cancer mamar..... | 13 |
| Efectele citotoxice ale curcuminei în linii celulare de cancer mamar MCF-7 de tip Luminal A și SK-BR-3 care supra-exprimă ErbB2 | 15 |
| Concluzii..... | 16 |
| Lista lucrărilor științifice publicate în reviste cotate ISI..... | 18 |
| Bibliografie selectivă..... | 21 |

Cuprinsul tezei de doctorat

| | |
|--|----|
| Lista lucrărilor științifice publicate în reviste cotate ISI | 6 |
| Lista abrevierilor și simbolurilor utilizate | 13 |
| Introducere | 17 |
| Stadiul actual al cunoașterii | 20 |
| 1. Polifenolii | 21 |
| 1.1. Galatul de 3-O-epigallocatehina..... | 23 |
| 1.2. Curcumina | 31 |
| 1.3. Interacțiunile dintre curcumină, EGCG și alți compuși terapeutici | 37 |
| 2. Cancerul mamar..... | 41 |
| 3. Receptorii ErbB și implicarea lor în afecțiunile maligne | 44 |
| Contribuția Personală | 48 |
| 4. Ipoteza de lucru și obiectivele generale..... | 49 |
| 5. Metodologia generală a cercetării | 50 |
| 5.1. Liniile celulare utilizate ca model | 50 |
| 5.2. Citometria în flux | 50 |
| 5.3. Analiza statistică a datelor..... | 60 |
| Efectele citotoxice ale EGCG în liniile celulare A431 de cancer epidermoid și SK-BR-3 de cancer mamar..... | 61 |
| 6. Obiective..... | 62 |
| 7. Materiale și metode | 63 |
| 7.1. Soluții | 63 |
| 7.2. Culturi celulare..... | 63 |
| 7.3. Analiza citotoxicității | 64 |
| 7.4. Evaluarea supraviețuirii clonogene | 64 |
| 7.5. Microscopie de fluorescență pentru evaluarea morfologiei nucleare..... | 65 |

| | |
|---|----|
| 7.6. Pregătirea probelor pentru măsurarea producerii speciilor reactive de oxigen și a viabilității celulare..... | 65 |
| 7.7. Microscopie de fluorescență pentru evaluarea producerii de specii reactive de oxigen..... | 66 |
| 7.8. Evaluarea potențialului membranelor mitocondrial | 66 |
| 7.9. Evaluarea nivelului de exprimare a proteinei NF- κ B..... | 67 |
| 8. Rezultate | 67 |
| 8.1. EGCG are acțiune citotoxică..... | 67 |
| 8.2. EGCG inhibă supraviețuirea clonogenă în liniile celulare A-431 și SK-BR-3 | 69 |
| 8.3. EGCG induce scăderea viabilității în liniile celulare A-431 și SK-BR-3 | 71 |
| 8.4. EGCG induce condensarea cromatinei și dezasamblarea nucleară..... | 73 |
| 8.5. EGCG reduce potențialul membranelor mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) | 75 |
| 8.6. EGCG induce stres oxidativ dependent de linia celulară..... | 77 |
| 8.7. Incubarea timp de 24 de ore cu EGCG induce producerea de specii reactive de oxigen în linia celulară A-431 | 78 |
| 8.8. Concentrații mici de EGCG nu modifică nivelul de exprimare a NF- κ B | 80 |
| 9. Discuții | 82 |
| 10. Concluzii parțiale - studiul efectelor citotoxice ale EGCG | 88 |
| Efectele citotoxice ale curcuminei în linii celulare de cancer mamar MCF-7 de tip Luminal A și SK-BR-3 care supra-exprimă ErbB2 | 89 |
| 11. Obiective | 90 |
| 12. Materiale și metode..... | 91 |
| 12.1. Soluții | 91 |
| 12.2. Culturi celulare..... | 92 |
| 12.3. Colorarea intracelulară a moleculelor de semnalizare. | 92 |
| 12.4. Evaluarea supraviețuirii clonogene | 93 |
| 12.5. Analiza fazelor ciclului celular | 93 |
| 12.6. Analiza producerii speciilor reactive de oxigen și a viabilității celulare. | 94 |

| | |
|---|-----|
| 12.7. Analiza potențialului membranelor mitocondriale..... | 94 |
| 13. Rezultate | 97 |
| 13.1. Curcumina inhibă supraviețuirea clonogenă în liniile celulare MCF-7 și SK-BR-3..... | 97 |
| 13.2. Curcumina blochează evoluția ciclului celular în liniile celulare maligne MCF-7 și SK-BR-3 | 99 |
| 13.3. Curcumina scade exprimarea unor molecule de semnalizare intracelulară dependent de linia celulară..... | 102 |
| 13.4. Tratamentul cu curcumină induce producerea de specii reactive de oxigen în liniile celulare MCF-7 și SK-BR3 | 106 |
| 13.5. Curcumina scade viabilitatea | 108 |
| 13.6. Curcumina duce la prăbușirea potențialului membranelor mitocondriale dependent de doză..... | 110 |
| 13.7. Studiul în dinamică al potențialului membranelor mitocondriale în urma tratamentului cu curcumină..... | 114 |
| 13.8. Curcumina induce moartea celulară prin apoptoză..... | 118 |
| 14. Discuții..... | 121 |
| 15. Concluzii parțiale - Studiul efectelor antiproliferative ale curcuminei..... | 124 |
| 16. Concluzii și contribuții personale..... | 125 |
| 17. Referințe | 128 |
| Anexe..... | 151 |

Introducere

Cancerul este a doua cauză de deces la nivel mondial după bolile cardiovasculare și este prognosticat că incidența bolilor maligne va crește cu aproximativ 50% în următorii 10 ani concomitent cu industrializarea țărilor în curs de dezvoltare (Bray and Soerjomataram, 2015). În contextul îmbătrânirii populației globale și al creșterii prevalenței factorilor de risc cardiovascular, în special în țările dezvoltate și în curs de dezvoltare este în creștere posibilitatea asocierii cancerului cu boli cardiovasculare. Aceasta asociere este cu atât mai problematică cu cât un număr mare de agenți antitumorali sunt cardiotoxici. În plus, tratamentele convenționale antitumorale așa cum sunt chimioterapia și radioterapia duc adesea la apariția cancerelor secundare. Există astfel necesitatea unor compuși adjuvanți cu efect cardioprotector sau care prin creșterea aditivă sau sinergică a efectului antitumoral al agenților chimioterapeutici să reducă concentrația, și deci citotoxicitatea exercitată de cei din urmă. Astfel, integrarea agenților fitochimici în terapie ca agenți adjuvanți ar putea avea un rol în scăderea efectelor secundare asociate terapiilor oncologice utilizate în prezent.

Lucrarea de față și-a propus studierea a doi compuși polifenolici, galatul de 3-O-epigallocatehină (EGCG) și curcumina, în studii *in vitro* de evaluare a efectelor citotoxice în linii celulare de cancer. Efectele EGCG au fost studiate pe liniile de cancer epidermoid A-431 și mamar SK-BR-3 iar curcumina în liniile celulare model pentru cancer mamar MCF-7 de tip Luminal A și SK-BR-3 care supra-exprimă ErbB2.

Obiectivele de cercetare au urmărit evaluarea citotoxicității compușilor în linii celulare maligne prin studierea supraviețuirii/proliferării celulare, potențialului clonogenic sub tratament, evoluției ciclului celular, producerii de specii reactive de oxigen, modificării morfologiei nucleare și prăbușirii potențialului membranelor mitocondriale.

Pentru atingerea obiectivelor de cercetare propuse, am utilizat tehnici de culturi celulare (așa cum sunt pornirea liniei celulare în cultură, propagarea celulelor, tratamentele, efectuarea preparărilor pentru măsurători, colorarea cu cromofori sau fluorofori și crioprezervarea) și tehnici de măsurătoare așa cum sunt citometria în flux, microscopia de fluorescență și fluorimetria.

Stadiul actual al cunoașterii

Galatul de 3-O-epigallocatehină (EGCG) este cea mai abundentă catehină prezentă în frunzele plantei de ceai, *Camellia sinensis* (Tachibana, 2011) și în cantități mici în diferite fructe așa cum sunt merele, prunele și fructele de pădure (Bhagwat et al., 2011). A fost arătat că toate catehinele sunt active biologic, cu acțiuni în prevenirea bolilor cardiovasculare, prevenirea cancerului (Yang and Wang, 2016), neuroprotectoare (Molino et al., 2016) și antiinflamatoare (Ohishi et al., 2016).

Efectele citotoxice ale EGCG în celulele tumorale sunt mediate prin inhibarea p53 mutante și activarea caspazei 3 și caspazei 9 (Kwak et al., 2017), inhibarea Factorului 6 Asociat Receptorului pentru TNF (Zhang et al., 2016) și NF- κ B și MAPK. EGCG reduce, de asemenea, invazivitatea și metastazarea prin inhibarea ciclo-oxigenazei 2, receptorilor pentru prostaglandina E₂ și metaloproteinazelor matriceale MMP-2 și MMP-9.

Spre deosebire de liniile celulare tumorale în care EGCG duce la creșterea morții celulare prin apoptoză, a fost arătat că în linii celulare netransformate malign supuse unor stimuli cu potențial vătămător, așa cum este stresul oxidativ, EGCG are un efect protector, inhibând apoptoza. Utilizarea EGCG în tratamentul cancerului este făcută mai tentantă de descoperirea faptului că polifenolul poate avea acțiune sinergică cu agenți chimioterapeutici așa cum sunt doxorubicina (Yao et al., 2016) sau oxaliplatină (Yunos et al., 2011), în timp ce prezintă efecte cardio-protectoare (Yao et al., 2016), hepato-protectoare și acțiune antioxidantă (Yunos et al., 2011).

Deoarece multe dintre ținutele de acțiune ale EGCG se află în aval de semnalizarea prin ErbB, a fost lansată ipoteza conform căreia EGCG poate acționa asupra acestor receptori fie prin interferarea cu legarea EGF la ErbB1 și inhibarea funcției de tirozin-kinază, fie prin creșterea internalizării receptorului ErbB1 în endozomi. S-a arătat că EGCG poate reduce activarea ErbB1, ErbB2 și ErbB3 în celulele de cancer de colon sau a ErbB2 în celulele de cancer mamar. Mai mult, așa cum a fost arătat de grupul nostru experimental, EGCG poate reduce exprimarea ErbB1 și ErbB2 prin interferarea cu distribuția în subdomeniile de tip lipid raft (plute lipidice) ale membranei plasmatică.

Studiile clinice cu EGCG au recomandat doze de până la 800 mg de EGCG pe zi, administrat per os. În aceste studii EGCG a fost administrat în amestecuri de catehine din ceaiul verde și a fost arătat că astfel de compoziții potențează efectul compusului. EGCG a fost tolerat bine în studiile clinice de fază I și II, cele mai observate efecte adverse fiind

greața, descrisă în aproape toate studiile, deși într-un procent mic al pacienților , urmată de disconfort sau durere abdominală și creșterea enzimelor serice .

Curcumina este un polifenol din planta *Curcuma longa*, studiat pentru un număr mare de beneficii care includ efecte anti-infecțioase (Mazumder et al., 1995), anti-inflamatorii (Zhang et al., 2017), de protecție hepato- și cardiovasculară , anti-trombotice (Kim et al., 2012) și anticancer. Printre efectele citotoxice ale curcuminei, au fost descrise inducerea apoptozei prin creșterea exprimării receptorilor 4 și 5 pentru moarte și exprimarea scăzută a unui număr mare de kinaze, enzime și proteine antiapoptotice așa cum este Bcl2 . A fost arătat că celulele maligne sunt considerabil mai sensibile decât celulele normale la acțiunea curcuminei de a induce moartea celulară și de a reduce potențialul clonogen (Patel et al., 2015). De asemenea, s-a demonstrat abilitatea curcuminei de a scăde nivelurile și fosforilarea ErbB2 în celulele tumorale care supra-exprimă această proteină prin ubicuitinare și degradarea de către capătul carboxiterminal al proteinei de interacțiune cu Hsc-70 .

Curcumina a fost introdusă în studii clinice de fază I care au recomandat doze orale de aproximativ 4 g de curcumină pe zi sau de 8 g de curcumină pe zi , doze care au fost tolerate bine, cu niveluri joase ale toxicității. În studiile clinice de faza II curcumina a fost bine tolerată, de asemenea, atunci când a fost administrată în combinație cu compuși chemoterapeutici standard așa cum sunt doclitaxel în cancerul mamar avansat, cu metastaze sau gemcitabina la pacienți cu cancer pancreatic avansat . Un studiu a arătat acțiunea curcuminei de a preveni cancerul colorectal, compusul reușind să reducă cu 40% numărul focarelor de cripte anormale la pacienții cu risc crescut .

Contribuții personale

Materiale și metode

Culturi celulare. Experimentele au fost efectuate utilizând liniile celulare de carcinom epidermoid A-431, adenocarcinom mamar SK-BR-3 și carcinom ductal mamar MCF-7. Celulele aderente au fost crescute în flaskuri de 25 sau 75 de cm², în mediu complet - DMEM suplimentat cu 10% FBS (ser fetal bovin, Sigma, F9665) inactivat termic, 1% Penicilină/ Streptomycină și L-glutamină 2 mM, într-un incubator umidificat la 37°C și atmosferă cu 5% CO₂.

Celulelor menținute în cultură li s-a efectuat pasajul de până la 20 de ori printr-un protocol ce a constat într-o spălare în PBS, incubare timp de 10 minute cu tripsină la 37°C, inactivare a tripsinei în volum dublu de mediu complet, centrifugare timp de 5 minute la 1500 rpm, diluția suspensiilor celulare, resuspendare în mediu complet și însămânțare în flaskuri noi.

Analiza citotoxicității. Pentru a evalua acțiunea citotoxică a EGCG asupra celulelor tumorale am utilizat analiza citotoxicității cu WST-1. Celulele au fost însămânțate în plăci cu 96 de godeuri cu fundul plat, la o densitate de 7×10^3 celule/probă iar după 24 de ore, celulele au fost incubate cu 0, 0,5, 2, 5, 10 μ M EGCG timp de 48 de ore. Absorbanta formazanului a fost măsurată la lungimea de undă de 450 nm și corectată prin scăderea absorbantei măsurate la 620 nm utilizând ca spectrofotometru un cititor de plăci Flexstation 3 (Molecular Devices).

Evaluarea supraviețuirii clonogene. Celulele au fost însămânțate pe plăci cu 6 godeuri și lăsate să adere. După 48 de ore, celulele au fost tratate cu concentrații diferite de EGCG sau curcumină în mediu complet și incubate la 37°C timp de 7 zile. După finalizarea perioadei de incubare, a fost îndepărtat mediul, celulele au fost spălate o dată în PBS, fixate în 3,7% paraformaldehidă timp de 5 minute, colorate cu 0,5% violet de gențiana timp de 15 minute și spălate cu apă de la robinet în abundență. A fost fotografiat fiecare godeu, iar pozele au fost utilizate pentru numărarea automată a coloniilor în software-ul ImageJ v.1.48. Numărul de colonii pentru fiecare condiție a fost utilizat pentru calcularea concentrației pentru care se obține jumătate din efectul maxim (EC₅₀) și fitarea curbelor doză-răspuns în GraphPad Prism v.5, utilizând formula:

$$Y = \text{Minim} + \frac{\text{Maxim} - \text{Minim}}{1 + 10^{(\text{LogEC}_{50} - X) \times \text{PantaHill}}}$$

unde X este log din concentrație, Y este procentul răspunsului, minim și maxim sunt valorile platourilor.

Determinarea exprimării moleculelor de semnalizare. Celulele au fost însămânțate în flaskuri de 75 cm² și au fost lăsate să adere timp de 24 de ore și apoi au fost tratate cu curcumină 0 sau 25 μM timp de 48 de ore. Celulele au fost detașate cu tripsină, numărate și împărțite în alicote de 10⁶ celule/probă. Probele au fost spălate o dată în PBS, centrifugate și apoi fixate în paraformaldehidă 3,7% în PBS, spălate și permeabilizate cu Triton X-100 0,2% în PBS. Celulele fixate și permeabilizate au fost incubate cu anticorpi anti-FAK-PE anti-ERK1-PE, anti-c-Fos-PE, anti-pERK-FITC sau anti-HSP90-PE timp de 1 oră la 4 °C. După incubarea cu anticorpi, celulele au fost spălate o dată în PBS și măsurate prin citometrie în flux utilizând un citometru Gallios Beckman Coulter (excitație: 488 nm, emisie: 525 ± 40 nm pentru FITC și excitație: 488 nm, emisie: 575 ± 30 nm pentru PE).

Evaluarea morfologiei nucleare prin microscopie de fluorescență. Celulele A-431 și SK-BR-3 au fost însămânțate pe plăci cu 6 godeuri la o concentrație de 2 x 10⁴ și, respectiv, 5 x 10⁴ celule/godeu. După 24 de ore, celulele au fost tratate cu EGCG la concentrația de 0 (martor), 10, 15, 20, 25 sau 30 μM. După 48 de ore, celulele aderente au fost spălate o dată cu PBS timp de 5 minute, fixate timp de 15 minute în formaldehidă 3.7%, spălate din nou în PBS și colorate cu 5 μg/ml de timp de 10 minute. Au fost achiziționate imagini în câmp luminat și de fluorescență utilizând un microscop inversat Zeiss Axiovert 40 (pentru fluorescența Hoechst a fost utilizată excitația la lungimea de undă de 365 nm iar fluorescența emisă a fost selectată cu un filtru dicroic cu separare la 395 nm și un filtru long pass de 420 nm).

Analiza producerii speciilor reactive de oxigen. După ce au fost lăsate să adere timp de 48 de ore, celulele au fost tratate cu concentrații diferite de EGCG sau curcumină. După incubare, celulele au fost detașate prin tripsinizare, spălate în PBS și numărate utilizând un hemocitometru. În fiecare probă au fost adăugate 5 x 10⁵ celule și apoi probele au fost centrifugate și resuspendate în carboxi-H₂DCFDA 10μM. După incubarea timp de 30 de minute cu carboxi-H₂DCFDA, celulele au fost spălate și resuspendate în PBS și măsurate utilizând un citometru în flux Gallios Beckman Coulter (excitație: 488 nm, emisie: 525 ± 40 nm).

Pentru analiza statistică a fost utilizat testul ANOVA 1way cu post-testul Bonferroni pentru compararea mai multor seturi de date în software-ul GraphPad Prism. Pentru reprezentarea grafică în același software a creșterii concentrației intracelulare de specii reactive de oxigen a fost făcută fitarea utilizând formula:

$$Y = \text{Minim} + \frac{\text{Maxim} - \text{Minim}}{1 + 10^{(\text{LogEC}_{50} - X) \times \text{PantaHill}}}$$

unde X este log din timp, Y este răspunsul exprimat ca număr de ori al creșterii speciilor reactive de oxigen, minim și maxim sunt valorile platourilor.

Microscopie de fluorescență pentru evaluarea producerii de specii reactive de oxigen.

Celulele A-431 au fost însămânțate pe plăci cu 6 godeuri la o concentrație de 5×10^4 celule/godeu. După 48 de ore, celulele au fost tratate cu EGCG la concentrația de 0 (martor), 10, 20, 50 sau 100 μM . După 24 de ore, celulele aderente au fost spălate o dată cu PBS timp de 5 minute, fixate timp de 15 minute în formaldehidă 3,7%, spălate din nou în PBS și colorate cu *carboxi-H₂DCFDA* 10 μM timp de 30 de minute la 37 °C. Au fost achiziționate imagini de microscopie în câmp luminos și de fluorescență utilizând un microscop inversat Zeiss Axiovert 40 (pentru fluorescența *carboxi-H₂DCFDA* a fost utilizată excitația la lungimea de undă de 460-480 nm selectată cu un filtru BP 470/20, iar fluorescența emisă a fost selectată cu un filtru dicroic cu separare la 495 nm și un filtru band pass 505-530 nm).

Analiza fazelor ciclului celular. Au fost însămânțate 2×10^5 celule MCF-7 sau SK-BR-3 în plăci cu 6 godeuri și lăsate să adere timp de 24 de ore. S-a realizat sincronizarea celulelor în faza G₀/G₁ prin înlocuirea mediului complet cu mediu fără ser. După 24 de ore celulele au fost incubate timp de 72 de ore cu 0, 1, 10, 25 sau 100 μM curcumină în mediu complet. După terminarea perioadei de tratament, celulele au fost detașate prin tripsinizare, spălate în PBS, numărate utilizând un hemocitometru și porționate 5×10^5 celule pe probă. Probele au fost colorate prin incubarea timp de 15 minute cu iodură de propidiu în soluție tampon de colorare care conține ARN-aze. Măsurătoarea a fost făcută prin citometrie în flux utilizând un citometru Gallios Beckman Coulter (excitație: 488 nm, emisie: 620 ± 30 nm).

Analiza potențialului membranar mitocondrial. Celulele au fost însămânțate în plăci cu 6 godeuri și tratate cu concentrații diferite de EGCG sau curcumină. După tratament, celulele aderente au fost colorate cu JC-1 5 $\mu\text{g/ml}$ în mediu complet, timp de 15 minute la 37°C, tripsinizate, spălate cu PBS și măsurate cu citometrul în flux Gallios Beckman Coulter (excitație: 488 nm, emisie_{verde}: 525 ± 40 nm, emisie_{roșu}: 575 ± 30 nm).

Pentru obținerea concentrației EC₅₀ punctele experimentale au fost utilizate pentru fitarea curbelor doză-răspuns în GraphPad Prism v.5, utilizând formula:

$$Y = \frac{100}{1 + 10^{(\text{LogEC}_{50} - X) \times \text{PantaHill}}}$$

unde X este log din concentrație și Y este procentul celulelor care pastrează un potențial membranar mitocondrial normal.

Evaluarea nivelului de exprimare a proteinei NF- κ B. După incubarea probelor timp de 72 de ore cu EGCG 5 sau 10 μ M, celulele au fost fixate timp de 20 de minute la temperatura camerei în paraformaldehida 3,7%, spălate, permeabilizate timp de 15 minute la temperatura camerei cu Triton X-100 0,2% și colorate cu anticorpul anti-NF- κ B (p65) conjugat cu PE. După ultima etapă de spălare, probele au fost măsurate cu citometrul în flux Gallios Beckman Coulter (excitație: 488 nm, emisie 575 \pm 30 nm).

Rezultate

Efectele citotoxice ale EGCG în liniile celulare A431 de cancer epidermoid și SK-BR-3 de cancer mamar

Așa cum am arătat în acest studiu utilizând metoda reducerii WST-1, EGCG a scăzut viabilitatea/proliferarea celulară în amândouă liniile celulare testate, A-431 și SK-BR-3. Aceste rezultate sunt în conformitate cu studii care au testat efectul antiproliferativ al EGCG în alte tipuri de celule maligne.

De asemenea, tratamentul cu EGCG a afectat capacitatea de a forma colonii a celulelor de cancer epidermoid A-431 și de cancer mamar SK-BR-3. Dozele de EGCG necesare pentru obținerea unui efect semi-maximal (EC_{50}) au fost mai mici decât cele necesare pentru alte efecte mediate de EGCG studiate aici, fiind de 2,5 μ M pentru celulele A-431 și de 5,4 μ M pentru celulele SK-BR-3. Aceasta se poate explica prin faptul că dezvoltarea coloniilor este influențată nu doar de viabilitatea celulară, ci și de modificarea proliferării celulare iar EGCG este cunoscută a induce blocarea evoluției ciclului celular.

Pentru a verifica în ce măsură efectele observate în cazul analizelor de citotoxicitate cu WST1 și de supraviețuire clonogenă reflectă acțiunea EGCG de a scădea viabilitatea celulelor maligne, am efectuat în continuare analiza viabilității prin colorarea cu iodură de propidiu și măsurătoarea prin citometrie în flux. Analiza viabilității în urma tratamentului de 72 de ore cu EGCG 100 μ M a indicat un efect de scădere a viabilității al EGCG similar pentru celulele SK-BR-3 aproximativ 70%, comparativ cu aproximativ 77% pentru celulele și A-431.

Pentru a evalua modul în care tratamentul cu EGCG induce moartea celulară, am evaluat potențialul membranar mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) după tratamentul timp de 72 de ore. Tratamentul cu 100 μ M EGCG a dus la scăderea $\Delta\Psi_m$ în ambele liniile celulare, iar efectul

a fost mai pronunțat în linia A-431 pentru care procentul de celule cu $\Delta\Psi_m$ prăbușit a fost mai mult de dublu cât cel din linia SK-BR-3 tratată în aceleași condiții. Aceste rezultate, luate împreună cu rezultatele de viabilitate celulară, sugerează apoptoza ca mecanism de inducere a morții celulare de către EGCG. Astfel, utilizând aceleași condiții de tratament (concentrație de EGCG de 100 μM și 72 ore de tratament) s-a obținut o viabilitate a liniei celulare A-431 de 77% și un procent al celulelor cu $\Delta\Psi_m$ prăbușit de 76%. Deoarece toate celulele care și-au pierdut viabilitatea (indiferent de mecanismul prin care s-a produs aceasta) au $\Delta\Psi_m$ prăbușit, aceste date indică un procent de aproximativ 53% celule cu $\Delta\Psi_m$ prăbușit dar viabile, iar scăderea potențialului membranar mitocondrial înaintea altor modificări este caracteristică pentru apoptoză. Faptul că EGCG poate induce apoptoza pe cale mitocondrială în linii celulare maligne a mai fost arătat anterior în mai multe linii celulare așa cum este și MCF-7 (Hsuuw and Chan, 2007).

Pentru a confirma că EGCG induce moartea celulară prin apoptoză, în ambele linii celulare A-431 și SK-BR-3, am urmărit modificările morfologice nucleare induse de EGCG. Experimentele au arătat că EGCG induce modificări nucleare specifice pentru apoptoză în ambele linii celulare. Așa cum era de așteptat din rezultatele obținute în cazul potențialului membranar mitocondrial corelat cu viabilitatea celulară, linia A-431 a fost mai sensibilă la tratamentul cu EGCG, necesitând aproximativ jumătate din concentrația de EGCG pentru a se obține același efect ca în linia celulară SK-BR-3.

Deoarece apoptoza pe cale mitocondrială poate fi declanșată prin inducerea stresului oxidativ am urmărit în continuare efectul EGCG, în concentrații de 50 și 100 μM , de a induce producția de specii reactive de oxigen. Am analizat producerea de SRO prin colorarea probelor cu carboxi- H_2DCFDA , atât prin citometrie în flux, cât și prin microscopia de fluorescență. Rezultatele au arătat un efect al EGCG de producere a speciilor reactive de oxigen dependent de linie celulară. Astfel, în linia celulară A-431 producerea de SRO a fost semnificativă începând cu concentrația de 10 μM , dar EGCG nu a reușit să inducă stres oxidativ în cazul liniei celulare SK-BR-3.

Aceste rezultate completează tabloul inducerii morții celulare în linia A-431: EGCG induce producerea de specii reactive de oxigen care induce apariția porilor mitocondriali de tranziție, cu eliberarea citocromului C și inducerea apoptozei. Acest mecanism al EGCG de inducere a apoptozei a fost propus anterior pentru celulele SCC-25 de carcinom scuamos, dar nu este susținut și de datele obținute aici în cazul celulelor SK-BR-3 de cancer mamar, în acest caz nefiind indus stres oxidativ iar procentul celulelor viabile fiind similar cu procentul celulelor cu potențial membranar mitocondrial normal.

Totuși, așa cum am arătat prin colorarea nucleară cu Hoechst și în cazul acestei linii celulare moartea celulară este indusă prin apoptoză. O explicație ar putea fi oferită de mecanismele propuse de Lee și colab. prin care EGCG ar putea induce apoptoza prin calea mitocondrială prin eliberarea de AIF (factorul care induce apoptoza), fără creșterea producerii de SRO sau de Farhan și colab. prin care EGCG ar putea induce apoptoza în mod independent de mitocondrii și fas, prin mobilizarea și reducerea cuprului endogen și producerea de SRO care conduc la scindarea directă a ADN-ului

Așa cum am arătat, concentrațiile eficiente pentru inhibarea supraviețuirii clonogene și proliferării/viabilității așa cum au fost evaluate prin teste de citotoxicitate au fost cu un ordin de mărime mai mici decât concentrațiile necesare pentru ca EGCG să exercite efecte precum inducerea de specii reactive de oxigen în linia A-431, depolarizarea membranelor mitocondriale și modificările morfologice nucleare caracteristice pentru apoptoză în ambele linii celulare. Prin urmare, deși există date în literatură referitoare la scăderea nivelului NF-kB (p65) prin incubarea timp de 24 de ore cu concentrații mai mari de EGCG, de 10-40 μM am dorit să evaluăm dacă doze mici de EGCG, similare celor eficiente în inhibarea clonogenă și proliferării/viabilității ar putea modifica exprimarea proteinei NF-kB (p65). În experimentele prezentate aici, EGCG la concentrația de 5 sau 10 μM nu a dus la scăderea nivelului NF-kB (p65) sugerând posibilitatea existenței unui mecanism de scădere a proliferării de către doze mici de EGCG, încă necunoscut.

Efectele citotoxice ale curcuminei în linii celulare de cancer mamar MCF-7 de tip Luminal A și SK-BR-3 care supra-exprimă ErbB2

Datele prezentate în aceste studii indică rezultate ale eficienței anti-proliferative ale curcuminei similare pentru cele două modele testate, concentrații mici de curcumină din domeniul micromolar ducând la inhibarea formării de colonii, cu linia celulară SK-BR-3 mai sensibilă la acest efect (EC_{50} de 2,3 μM comparativ cu 12,3 μM pentru linia celulară MCF-7). Curcumina a scăzut, de asemenea, viabilitatea celulară similar pentru cele două linii celulare în cazul tratamentului timp de 72 de ore (în această condiție de tratament, curcumina prezintă un EC_{50} de reducere a viabilității de 38,9 în linia celulară MCF-7 și de 32,5 în linia celulară SK-BR-3).

În acest studiu s-a stabilit că inhibarea creșterii clonogene a avut loc la concentrații mai mici de curcumină decât cele necesare pentru alte activități anti-proliferative ale curcuminei așa cum este, de exemplu, activitatea de scădere a viabilității celulelor maligne.

Aceste rezultate sunt în concordanță cu rezultate anterioare care arată concentrații mai mici ale curcuminei necesare pentru inhibarea formării de colonii decât cele necesare pentru inhibarea proliferării/ supraviețuirii așa cum este analizată într-un test MTT . Așa cum am arătat aici, curcumina a indus stres oxidativ în ambele tipuri celulare, dar celulele MCF-7 model pentru fenotipul de cancer mamar Luminal A au fost mai afectate decât celulele SK-BR-3 care supra-exprimă ErbB2. A fost arătat anterior că stresul oxidativ împiedică proliferarea celulelor de cancer mamar prin utilizarea NADPH pentru a detoxifierea speciilor reactive de oxigen și scăderea implicării acestei enzime în lipogeneză . Prin urmare, unul dintre mecanismele implicate în reducerea formării de colonii de către curcumină ar putea fi scăderea proliferării mediată de stresul oxidativ.

Curcumina a scăzut proliferarea celulelor maligne prin blocarea în diferite faze ale ciclului celular (G2/M pentru modelul de cancer Luminal A și faza S pentru modelul de supra-exprimare a ErbB2). Există date contradictorii în literatură referitoare la capacitatea curcuminei de a bloca evoluția ciclului celular al celulelor de cancer mamar din fenotipul luminal A, existând studii care sugerează efectul curcuminei de a bloca evoluția ciclului celular al celulelor MCF-7 în faza G2/M și alte studii care indică blocarea în G0 , studiul prezentat aici venind în susținerea primei teorii.

Experimentele efectuate cu ajutorul curcuminei au indicat rolul acesteia în scăderea proliferării și supraviețuirii liniilor celulare maligne, prin intermediul reducerii exprimării sau activării unor molecule de semnalizare aflate în aval de receptorii pentru factori de creștere sau insulină. Atunci când a fost evaluată exprimarea și fosforilarea ERK, curcumina nu a scăzut exprimarea sau activarea acestei proteine atunci când aceasta s-a aflat în aval de ErbB2 supra-exprimit în celulele SK-BR-3, dar a redus atât exprimarea cât și fosforilarea ERK în celulele MCF-7 care nu prezintă amplificarea ErbB2.

Conform experimentelor preliminare din cadrul acestui studiu, curcumina reduce și exprimarea altor proteine de semnalizare cu importanță în supraviețuirea celulară și proliferare așa cum sunt c-Fos, FAK și HSP90 în linia celulară MCF-7. În cazul liniei celulare SK-BR-3, rezultatele au indicat un efect mai puțin pronunțat al curcuminei. Astfel, în această linie celulară, curcumina a redus moderat exprimarea c-Fos în timp ce în cazul exprimării FAK și HSP90 nu a avut efect sau chiar a dus la o ușoară creștere a nivelului acestor proteine de semnalizare

Concluzii

În cadrul primului studiu, intitulat „*Efectele citotoxice ale EGCG în liniile celulare A431 de cancer epidermoid și SK-BR-3 de cancer mamar*” am arătat că tratamentul cu EGCG induce moartea celulară prin inhibarea proliferării/supraviețuirii celulelor A-431 și SK-BR-3, formarea de colonii cu concentrații eficiente de ordinul micromolar cu un singur digit, induce producerea de specii reactive de oxigen în mod dependent de linia celulară - linia celulară A-431 fiind mai sensibilă la acest efect decât linia celulară SK-BR-3 și reduce potențialul membranelor mitocondriale, A-431 fiind mai sensibilă.

În cadrul celui de-al doilea studiu prezentat în cadrul acestei lucrări – „*Efectele citotoxice ale curcuminei în linii celulare de cancer mamar MCF-7 de tip Luminal B și SK-BR-3 care supraexprimă ErbB2*” – am arătat că tratamentul cu curcumină inhibă formarea de colonii a liniilor celulare MCF-7 și SK-BR-3, duce la producerea speciilor reactive de oxigen în mod dependent de linia celulară – linia celulară MCF-7 este mai sensibilă – după perioade scurte de tratament, mai mici de 2 ore, inhibă progresia ciclului celular în faze diferite în funcție de linia celulară – S pentru SK-BR-3 și G₂/M pentru MCF-7. De asemenea, incubarea cu curcumină a redus potențialul membranelor mitocondriale în ambele linii celulare, iar dinamica acestui efect în corelație cu morfologia celulară sugerează inducerea morții celulare prin apoptoză. Suplimentar, am arătat că incubarea celulelor tumorale cu curcumină 25 μM induce scăderea exprimării și fosforilării ERK în linia celulară MCF-7. Rezultate preliminare sugerează un efect similar în cazul altor molecule de semnalizare așa cum sunt cFos, FAK și HSP90, dar sunt necesare mai multe experimente pentru a putea trage o concluzie în această privință.

Lista lucrărilor științifice publicate în reviste cotate ISI

Articole publicate în cadrul cercetărilor doctorale (6 articole ISI, 4 ca prim autor):

1. **Alexandru Filippi**, Tiphanie Picot, Carmen Mariana Aanei, Péter Nagy, János Szöllösi, Lydia Campos, Constanța Ganea, Maria-Magdalena Mocanu *Epigallocatechin-3-O-gallate alleviates the malignant phenotype in A-431 epidermoid and SK-BR-3 breast cancer cell lines International journal of food sciences and nutrition*. International Journal of Food Sciences and Nutrition, publicat online, 2017, Factor de impact 1.444, **Premiat UEFISCDI (Prim autor)**
Disponibil online la adresa: <https://doi.org/10.1080/09637486.2017.1401980>
2. **Alexandru Filippi**, Nicoleta Măru, Mariana Carmen Chifiriuc, Raluca Grigore, Constanța Ganea, Maria-Magdalena Mocanu *Anticancer effects of curcumin in luminal B and HER2 breast cancer cell line models*. Romanian Biotechnological Letters, 2017, factor de impact 0.404 (**Prim autor**)
Disponibil online la adresa: <https://www.rombio.eu/docs/Filippi%20et%20al.pdf>
3. Oana-Alina Ciolac, **Alexandru Filippi**, Nicoleta Măru, Marcela Popa, Carmen Mariana Chifiriuc, Constanța Ganea, Maria-Magdalena Mocanu *Reduction of the clonogenic potential and collapse of the mitochondrial membrane potential in A-431 epidermoid carcinoma cell line induced by curcumin*. Vol. 22, No. 6, 2017, Romanian Biotechnological Letters, factor de impact 0.404 (**Prim autor**)
Disponibil online la adresa: https://www.rombio.eu/vol22nr6/7_Ciolac_et_al.pdf
4. **Alexandru Filippi**, Oana-Alina Ciolac, Constanța Ganea, Maria-Magdalena Mocanu, *ErbB Proteins as Molecular Target of Dietary Phytochemicals in Malignant Diseases*. Journal of Oncology, volumul 2017, 2017 Factor de impact 4,528. (**Prim autor**)
Disponibil online la adresa: <https://doi.org/10.1155/2017/1532534>

5. Ioana Teodora Tofolean, Constanța Ganea, Diana Ionescu, **Alexandru Filippi**, Alexandru Garaiman, Alexandru Goicea, Mihnea-Alexandru Gaman, Alexandru Dimancea, Irina Băran. *Cellular determinants involving mitochondrial dysfunction, oxidative stress and apoptosis correlate with the synergic cytotoxicity of epigallocatechin-3-gallate and menadione in human leukemia Jurkat T cells*. Pharmacological Research, volumul 106, 2015. Factor de Impact: 4,408. **Premiat UEFISCDI**

Disponibil online la adresa: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.12.013>

6. Irina Băran, Diana Ionescu, **Alexandru Filippi**, Maria-Magdalena Mocanu, Adrian Iftime, Ramona Babeș, Ioana Teodora Tofolean, Ruxandra Irimia, Alexandru Goicea, Valentin Popescu, Alexandru Dimancea, Andrei Neagu, Constanța Ganea. *Novel insights into the antiproliferative effects and synergism of Quercetin and Menadione in human leukemia Jurkat T cells*. Leukemia Research volumul 38 numărul 7, 2014. Factor de Impact: 2,764

Disponibil online la adresa: <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2014.04.010>

Articole publicate în afara studiilor doctorale (4 articole ISI, 2 ca prim autor):

1. Alexandru Florian Deftu, **Alexandru Filippi**, Roxana Olimpia Gheorghe, Violeta Ristoiu *CXCL1 activates TRPV1 via Gi/o protein and actin filaments*. Life sciences, volumul 193, 2018. Factor de Impact: 3,234
2. Alexandru Florian Deftu, **Alexandru Filippi**, Koji Shibasaki, Roxana Olimpia Gheorghe, Mărioara Chiritoiu, Violeta Ristoiu. *Chemokine (CXC motif) ligand 1 (CXCL1) and chemokine (CXC motif) ligand 2 (CXCL2) modulate the activity of TRPV1+/IB4+ cultured rat dorsal root ganglia neurons upon short-term and acute application*. Journal of Physiology and Pharmacology, volumul 68, 2017. Factor de Impact 2.883 (**Prim autor**)

Disponibil online la adresa:

http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/06_17/pdf/385_06_17_article.pdf

3. **Alexandru Filippi**, Constantin Caruntu, Roxana-olimpia Gheorghe, Alexandru Deftu, Bogdan Amuzescu, Violeta Ristoiu. *Catecholamines reduce transient receptor potential vanilloid type 1 desensitization in cultured dorsal root ganglia neurons*. Journal of Physiology and Pharmacology, volumul 67, numărul 7, 2016. Factor de Impact 2.883 (**Prim autor**)
Disponibil online la adresa:
http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/12_16/pdf/843_12_16_article.pdf

4. Maria-Magdalena Mocanu, Constanta Ganea, Katarina Siposova, **Alexandru Filippi**, Erna Demjen, Jozef Marek, Zuzana Bednarikova, Andrea Antosova, Irina Baran, Zuzana Gazova. *Polymorphism of hen egg white lysozyme amyloid fibrils influences the cytotoxicity in LLC-PK1 epithelial kidney cells*. International journal of biological macromolecules, volumul 65, 2014. Factor de Impact: 3,909 **Premiat UEFISCDI**
Disponibil online la adresa: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.01.030>

Bibliografie selectivă

- ALBINI, A., PENNESI, G., DONATELLI, F., CAMMAROTA, R., DE FLORA, S. & NOONAN, D. M. 2010. Cardiotoxicity of anticancer drugs: the need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention. *J Natl Cancer Inst*, 102, 14-25.
- BAYET-ROBERT, M., KWIATKOWSKI, F., LEHEURTEUR, M., GACHON, F., PLANCHAT, E., ABRIAL, C., MOURET-REYNIER, M. A., DURANDO, X., BARTHOMEUF, C. & CHOLLET, P. 2010. Phase I dose escalation trial of docetaxel plus curcumin in patients with advanced and metastatic breast cancer. *Cancer Biol Ther*, 9, 8-14.
- BERRAK, O., AKKOC, Y., ARISAN, E. D., COKER-GURKAN, A., OBAKAN-YERLIKAYA, P. & PALAVAN-UNSAI, N. 2016. The inhibition of PI3K and NFkappaB promoted curcumin-induced cell cycle arrest at G2/M via altering polyamine metabolism in Bcl-2 overexpressing MCF-7 breast cancer cells. *Biomed Pharmacother*, 77, 150-60.
- BHAGWAT, S., HAYTOWITZ, D. & HOLDEN, J. 2011. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2011. USDA
- Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 3.0. Nutrient Data.
- BRAY, F. & SOERJOMATARAM, I. 2015. The Changing Global Burden of Cancer: Transitions in Human Development and Implications for Cancer Prevention and Control. In: GELBAND, H., JHA, P., SANKARANARAYANAN, R. & HORTON, S. (eds.) *Cancer: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3)*. Washington (DC).
- CARROLL, R. E., BENYA, R. V., TURGEON, D. K., VAREED, S., NEUMAN, M., RODRIGUEZ, L., KAKARALA, M., CARPENTER, P. M., MCLAREN, C., MEYSKENS, F. L., JR. & BRENNER, D. E. 2011. Phase IIa clinical trial of curcumin for the prevention of colorectal neoplasia. *Cancer Prev Res (Phila)*, 4, 354-64.
- CHANG, C. W., HSIEH, Y. H., YANG, W. E., YANG, S. F., CHEN, Y. & HU, D. N. 2014. Epigallocatechingallate inhibits migration of human uveal melanoma cells via downregulation of matrix metalloproteinase-2 activity and ERK1/2 pathway. *Biomed Res Int*, 141582.
- CHEN, X. Q., HU, T., HAN, Y., HUANG, W., YUAN, H. B., ZHANG, Y. T., DU, Y. & JIANG, Y. W. 2016. Preventive Effects of Catechins on Cardiovascular Disease. *Molecules*, 21.
- CHOUDHURI, T., PAL, S., DAS, T. & SA, G. 2005. Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G2 phase of cell cycle in a p53-dependent manner. *J Biol Chem*, 280, 20059-68.
- DOSTAL, A. M., SAMAVAT, H., BEDELL, S., TORKELESON, C., WANG, R., SWENSON, K., LE, C., WU, A. H., URSIN, G., YUAN, J. M. & KURZER, M. S. 2015. The safety of green tea extract supplementation in postmenopausal women at risk for breast cancer: results of the Minnesota Green Tea Trial. *Food Chem Toxicol*, 83, 26-35.
- EPELBAUM, R., SCHAFFER, M., VIZEL, B., BADMAEV, V. & BAR-SELA, G. 2010. Curcumin and gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Nutr Cancer*, 62, 1137-41.
- FARHAN, M., KHAN, H. Y., OVES, M., AL-HARRASI, A., REHMANI, N., ARIF, H., HADI, S. M. & AHMAD, A. 2016. Cancer Therapy by Catechins Involves Redox Cycling of Copper Ions and Generation of Reactive Oxygen species. *Toxins (Basel)*, 8, 37.
- FUJISE, Y., OKANO, J., NAGAHARA, T., ABE, R., IMAMOTO, R. & MURAWAKI, Y. 2012. Preventive effect of caffeine and curcumin on hepato-carcinogenesis in diethylnitrosamine-induced rats. *Int J Oncol*, 40, 1779-88.
- GUPTA, S., HASTAK, K., AFAQ, F., AHMAD, N. & MUKHTAR, H. 2004. Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis. *Oncogene*, 23, 2507-22.
- HONG, R. L., SPOHN, W. H. & HUNG, M. C. 1999. Curcumin inhibits tyrosine kinase activity of p185neu and also depletes p185neu. *Clin Cancer Res*, 5, 1884-91.

- HSUUW, Y. D. & CHAN, W. H. 2007. Epigallocatechin gallate dose-dependently induces apoptosis or necrosis in human MCF-7 cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1095, 428-40.
- JERBY, L., WOLF, L., DENKERT, C., STEIN, G. Y., HILVO, M., ORESIC, M., GEIGER, T. & RUPPIN, E. 2012. Metabolic associations of reduced proliferation and oxidative stress in advanced breast cancer. *Cancer Res*, 72, 5712-20.
- JOE, A. K., SCHNOLL-SUSSMAN, F., BRESALIER, R. S., ABRAMS, J. A., HIBSHOOSH, H., CHEUNG, K., FRIEDMAN, R. A., YANG, C. S., MILNE, G. L., LIU, D. D., LEE, J. J., ABDUL, K., BIGG, M., FOREMAN, J., SU, T., WANG, X., AHMED, A., NEUGUT, A. I., AKPA, E., LIPPMAN, S. M., PERLOFF, M., BROWN, P. H. & LIGHTDALE, C. J. 2015. Phase Ib Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled, Dose Escalation Study of Polyphenon E in Patients with Barrett's Esophagus. *Cancer Prev Res (Phila)*, 8, 1131-7.
- JUNG, E. M., LIM, J. H., LEE, T. J., PARK, J. W., CHOI, K. S. & KWON, T. K. 2005. Curcumin sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated upregulation of death receptor 5 (DR5). *Carcinogenesis*, 26, 1905-13.
- JUNG, Y., XU, W., KIM, H., HA, N. & NECKERS, L. 2007. Curcumin-induced degradation of ErbB2: A role for the E3 ubiquitin ligase CHIP and the Michael reaction acceptor activity of curcumin. *Biochim Biophys Acta*, 1773, 383-90.
- KANAI, M., YOSHIMURA, K., ASADA, M., IMAIZUMI, A., SUZUKI, C., MATSUMOTO, S., NISHIMURA, T., MORI, Y., MASUI, T., KAWAGUCHI, Y., YANAGIHARA, K., YAZUMI, S., CHIBA, T., GUHA, S. & AGGARWAL, B. B. 2011. A phase I/II study of gemcitabine-based chemotherapy plus curcumin for patients with gemcitabine-resistant pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 68, 157-64.
- KAPAKOS, G., YOUREVA, V. & SRIVASTAVA, A. K. 2012. Cardiovascular protection by curcumin: molecular aspects. *Indian J Biochem Biophys*, 49, 306-15.
- KIM, D. C., KU, S. K. & BAE, J. S. 2012. Anticoagulant activities of curcumin and its derivative. *BMB Rep*, 45, 221-6.
- KWAK, T. W., PARK, S. B., KIM, H. J., JEONG, Y. I. & KANG, D. H. 2017. Anticancer activities of epigallocatechin-3-gallate against cholangiocarcinoma cells. *Oncotargets Ther*, 10, 137-144.
- LEE, J. H., JEONG, Y. J., LEE, S. W., KIM, D., OH, S. J., LIM, H. S., OH, H. K., KIM, S. H., KIM, W. J. & JUNG, J. Y. 2010. EGCG induces apoptosis in human laryngeal epidermoid carcinoma Hep2 cells via mitochondria with the release of apoptosis-inducing factor and endonuclease G. *Cancer Lett*, 290, 68-75.
- MAZUMDER, A., RAGHAVAN, K., WEINSTEIN, J., KOHN, K. W. & POMMIER, Y. 1995. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin. *Biochem Pharmacol*, 49, 1165-70.
- MOCANU, M. M., GANEA, C., GEORGESCU, L., VARADI, T., SHRESTHA, D., BARAN, I., KATONA, E., NAGY, P. & SZOLLOSI, J. 2014. Epigallocatechin 3-O-gallate induces 67 kDa laminin receptor-mediated cell death accompanied by downregulation of ErbB proteins and altered lipid raft clustering in mammary and epidermoid carcinoma cells. *J Nat Prod*, 77, 250-7.
- MOLINO, S., DOSSENA, M., BUONOCORE, D., FERRARI, F., VENTURINI, L., RICEVUTI, G. & VERRI, M. 2016. Polyphenols in dementia: From molecular basis to clinical trials. *Life Sci*, 161, 69-77.
- NOWAKOWSKA, A. & TARASIUK, J. 2016. Comparative effects of selected plant polyphenols, gallic acid and epigallocatechin gallate, on matrix metalloproteinases activity in multidrug resistant MCF7/DOX breast cancer cells. *Acta Biochim Pol*, 63, 571-5.
- OHISHI, T., GOTO, S., MONIRA, P., ISEMURA, M. & NAKAMURA, Y. 2016. Anti-inflammatory Action of Green Tea. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*, 15, 74-90.
- OLIVEIRA, M. R., NABAVI, S. F., DAGLIA, M., RASTRELLI, L. & NABAVI, S. M. 2016. Epigallocatechin gallate and mitochondria-A story of life and death. *Pharmacol Res*, 104, 70-85.

- PATEL, P. B., THAKKAR, V. R. & PATEL, J. S. 2015. Cellular Effect of Curcumin and Citral Combination on Breast Cancer Cells: Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest. *J Breast Cancer*, 18, 225-34.
- PIANETTI, S., GUO, S., KAVANAGH, K. T. & SONENSHEIN, G. E. 2002. Green tea polyphenol epigallocatechin-3 gallate inhibits Her-2/neu signaling, proliferation, and transformed phenotype of breast cancer cells. *Cancer Res*, 62, 652-5.
- SHANMUGAM, M. K., RANE, G., KANCHI, M. M., ARFUSO, F., CHINNATHAMBI, A., ZAYED, M. E., ALHARBI, S. A., TAN, B. K., KUMAR, A. P. & SETHI, G. 2015. The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment. *Molecules*, 20, 2728-69.
- SHARMA, R. A., EUDEN, S. A., PLATTON, S. L., COOKE, D. N., SHAFAYAT, A., HEWITT, H. R., MARCZYLO, T. H., MORGAN, B., HEMINGWAY, D., PLUMMER, S. M., PIRMOHAMED, M., GESCHER, A. J. & STEWARD, W. P. 2004. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res*, 10, 6847-54.
- SHIMIZU, M., DEGUCHI, A., JOE, A. K., MCKOY, J. F., MORIWAKI, H. & WEINSTEIN, I. B. 2005. EGCG inhibits activation of HER3 and expression of cyclooxygenase-2 in human colon cancer cells. *J Exp Ther Oncol*, 5, 69-78.
- SINGH, T. & KATIYAR, S. K. 2011. Green tea catechins reduce invasive potential of human melanoma cells by targeting COX-2, PGE2 receptors and epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS One*, 6, e25224.
- TACHIBANA, H. 2011. Green tea polyphenol sensing. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 87, 66-80.
- TAO, L., FORESTER, S. C. & LAMBERT, J. D. 2014. The role of the mitochondrial oxidative stress in the cytotoxic effects of the green tea catechin, (-)-epigallocatechin-3-gallate, in oral cells. *Mol Nutr Food Res*, 58, 665-76.
- TRUDEL, D., LABBE, D. P., ARAYA-FARIAS, M., DOYEN, A., BAZINET, L., DUCHESNE, T., PLANTE, M., GREGOIRE, J., RENAUD, M. C., BACHVAROV, D., TETU, B. & BAIRATI, I. 2013. A two-stage, single-arm, phase II study of EGCG-enriched green tea drink as a maintenance therapy in women with advanced stage ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 131, 357-61.
- TSAO, A. S., LIU, D., MARTIN, J., TANG, X. M., LEE, J. J., EL-NAGGAR, A. K., WISTUBA, I., CULOTTA, K. S., MAO, L., GILLENWATER, A., SAGESAKA, Y. M., HONG, W. K. & PAPADIMITRAKOPOULOU, V. 2009. Phase II randomized, placebo-controlled trial of green tea extract in patients with high-risk oral premalignant lesions. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2, 931-41.
- YANG, C. S. & WANG, H. 2011. Mechanistic issues concerning cancer prevention by tea catechins. *Mol Nutr Food Res*, 55, 819-31.
- YANG, C. S. & WANG, H. 2016. Cancer Preventive Activities of Tea Catechins. *Molecules*, 21.
- YANG, X., LI, Z., WU, Q., CHEN, S., YI, C. & GONG, C. 2017. TRAIL and curcumin codelivery nanoparticles enhance TRAIL-induced apoptosis through upregulation of death receptors. *Drug Deliv*, 24, 1526-1536.
- YAO, Y. F., LIU, X., LI, W. J., SHI, Z. W., YAN, Y. X., WANG, L. F., CHEN, M. & XIE, M. Y. 2016. (-)-Epigallocatechin-3-gallate alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity in sarcoma 180 tumor-bearing mice. *Life Sci*.
- YU, S. J., JIANG, R., MAZZU, Y. Z., WEI, C. B., SUN, Z. L., ZHANG, Y. Z., ZHOU, L. D. & ZHANG, Q. H. 2016. Epigallocatechin-3-gallate Prevents Triptolide-Induced Hepatic Injury by Restoring the Th17/Treg Balance in Mice. *Am J Chin Med*, 44, 1221-1236.
- YUNOS, N. M., BEALE, P., YU, J. Q. & HUQ, F. 2011. Synergism from sequenced combinations of curcumin and epigallocatechin-3-gallate with cisplatin in the killing of human ovarian cancer cells. *Anticancer Res*, 31, 1131-40.
- ZHANG, J., LEI, Z., HUANG, Z., ZHANG, X., ZHOU, Y., LUO, Z., ZENG, W., SU, J., PENG, C. & CHEN, X. 2016. Epigallocatechin-3-gallate(EGCG) suppresses melanoma cell growth and metastasis by targeting TRAF6 activity. *Oncotarget*, 7, 79557-79571.

ZHANG, N., WEI, G., YE, J., YANG, L., HONG, Y., LIU, G., ZHONG, H. & CAI, X. 2017. Effect of curcumin on acute spinal cord injury in mice via inhibition of inflammation and TAK1 pathway. *Pharmacol Rep*.