

Agnieszka Cierniak¹, Magdalena Skubal²,
Małgorzata Kalemba-Drożdż¹

1. Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego,
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Zakład Biochemii

2. Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii,
Zakład Biochemii Ogólnej

CZY GALUSAN EPIGALLOKATECHINY MOŻE BYĆ SKUTECZNYM POLIFENOLEM W TERAPII SKOJARZONEJ Z ETOPOZYDEM W LECZENIU PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI SZPIKOWEJ?

Autor korespondencyjny:

Agnieszka Cierniak, Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego,
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Zakład Biochemii,
ul. G. Herlinga-Grudzińskiego 1, 30-705 Kraków,
e-mail: acierniak@afm.edu.pl

Streszczenie

Wprowadzenie: Składnik zielonej herbaty – galusan epigallokatechiny (EGCG) – znany jest ze swoich właściwości chemoprewencyjnych i chemoterapeutycznych. Wykazuje silne właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne, a w stosunku do komórek nowotworowych – działanie antyproliferacyjne lub proapoptotyczne. Etopozyd jest jednym z najczęściej stosowanych leków przeciwnowotworowych, wywołującym jednak wiele skutków ubocznych.

Materiały i metody: W eksperymentach *in vitro* badano potencjalną rolę EGCG w terapii skojarzonej z etopozydem w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej. Komórki ustalonej linii białaczkowej K562 poddano działaniu etopozydu i/lub EGCG w celu określenia wpływu EGCG na przeżywalność komórek, poziom uszkodzeń DNA oraz częstość procesu apoptozy. Poziom uszkodzeń DNA mierzono przy pomocy elektroforezy pojedyn-

czych komórek w żelu agarozowym (test kometowy), natomiast apoptozę oceniano pod mikroskopem fluorescencyjnym z użyciem barwnika Hoechst 33342.

Wyniki: Uzyskane wyniki badań wskazują, że EGCG w stężeniu 50 i 100 μM uwrażliwia komórki białaczkowe na cytotoksyczne działanie etopozydu, zwiększając poziom uszkodzeń DNA i częstość apoptozy.

Wnioski: Dane wskazują, że galusan epigallokatechiny może się okazać skutecznym polifenolem w terapii skojarzonej z etopozydem w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej.

Słowa kluczowe: apoptoza, EGCG, etopozyd, przewlekła białaczka szpikowa, uszkodzenia DNA

Wprowadzenie

Galusan epigallokatechiny

Galusan epigallokatechiny (EGCG, ang. (-)-*epigallocatechin-3-gallate*) należy do grupy flawonoidów określanych mianem katechin. Występuje on w napoju otrzymany z liści krzewów herbacianych *Camellia sinensis*, czyli w herbacie – drugim po wodzie najczęściej spożywanym płynem na świecie. Z wszystkich rodzajów herbat odmiana zielona została najlepiej poznana i przebadana pod względem swoich właściwości chemoprewencyjnych oraz chemoterapeutycznych [1]. Pozytywny wpływ zielonej herbaty na zdrowie jest związany głównie z obecnością związków polifenolowych, m.in. flawonoidów. W liściach herbaty około 36% suchej masy stanowią flawonoidy, spośród których aż 80% to katechiny, takie jak: galusan epigallokatechiny (EGCG, ang. (-)-*epigallocatechin-3-gallate*), galusan epikatechiny (ECG, ang. (-)-*epicatechin-3-gallate*), epigallokatechina (EGC, ang. (-)-*epigallocatechin*) oraz epikatechina (EC, ang. (-)-*epicatechin*). Sugeruje się, że to właśnie galusan epigallokatechiny odpowiada za lecznicze właściwości zielonej herbaty. Badania *in vivo* dowodzą, że najwyższa aktywność antyoksydacyjna we krwi jest obserwowana po 30–50 minutach od wypicia herbaty. Galusan epigallokatechiny jest około 100 razy bardziej skuteczny od witaminy C i 25 razy bardziej efektywny niż witamina E pod względem ochrony komórek i DNA przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Polifenol ten działa przeciwutleniająco dwa razy silniej od resweratrolu występującego w czerwonym winie [2].

Właściwości profilaktyczne i ochronne EGCG są znane w medycynie od lat. Galusan epigallokatechiny zmniejsza uszkodzenia skóry o podłożu zapalnym, spowodowane promieniowaniem UV [3,4]. Podczas gdy komórki odpornościowe indukują procesy zapalne wskutek wzmożonej produkcji reaktywnych form tlenu (RFT), to EGCG działa przeciwzapalnie, gdyż hamuje produkcję wolnych rodników [3,4].

Jak wykazują liczne badania, podawanie EGCG może stać się również atrakcyjnym sposobem na zwiększenie skuteczności leczenia [1,5] oraz reduk-

cję częstotliwości występowania chorób układu krążenia i nowotworów [6]. Polifenole obecne w zielonej herbacie, szczególnie EGCG, mogą uczestniczyć w blokowaniu syntezy związków toksycznych, np. nitrozoamin, powstających wskutek spożywania wędzonych potraw mięsnych, wychwytywaniu wolnych rodników lub ograniczeniu ich aktywacji, inhibicji peroksydacji związków lipidowych, wzmożeniu aktywności enzymów unieszkodliwiających działanie wolnych rodników, jak np. peroksydaza glutationowa i katalaza [1,7].

Jednym z najważniejszych mechanizmów odpowiedzialnych za antyproliferacyjne właściwości flawonoidów jest zatrzymanie cyklu komórkowego, wskutek blokowania replikacji DNA. Galusan epigallokatechiny – podobnie jak epigallokatechina, mirycetyna i kwercetyna – zatrzymuje działanie topoiizomerazy II, gdy tworzy ona kompleks enzym-DNA [8]. Może to wówczas prowadzić do powstania aberracji chromosomowej i indukcji apoptozy [9].

Zgodnie z badaniami przeprowadzonymi przez Bandele'a i Osheroffa około $\sim 25 \mu\text{M/mL}$ ekstraktu zielonej herbaty zawiera $\sim 20\text{--}30 \mu\text{M}$ EGCG, który silnie wpływa na aktywność topoiizomerazy II oraz przecinanie łańcuchów polinukleotydowych DNA. Po wypiciu około trzech filiżanek zielonej herbaty stężenie EGCG w ludzkim osoczu oraz próbkach śliny osiąga odpowiednio $4 \mu\text{M}$ i $48 \mu\text{M}$ [6].

Większa część galusanu epigallokatechiny, zanim zostanie wchłonięta z jelita, ulega przemianom pod wpływem esterazy katecholowej bakterii jelitowych. Metabolity, głównie glukuroniany i siarczany, mają niezmienną strukturę ugrupowań odpowiedzialnych za aktywność przeciwutleniającą tych związków i wykazują właściwości antyoksydacyjne podobne do właściwości niezmiennych flawonoidów [10].

Etopozyd

Etopozyd, półsyntetyczna pochodna podofilotoksyny, jest stosowany jako środek przeciwmiotyczny. Mechanizm działania etopozydu opiera się na inhibicji topoiizomerazy II, przez co indukuje pęknięcia jedno- i dwuniciowe DNA. Etopozyd pobudza również wewnątrzkomórkowe powstawanie wolnych rodników oraz hamuje wbudowywanie tymidyny do DNA. Należy do leków fazowo-specyficznych o najsilniejszym działaniu w fazach S i G2 cyklu komórkowego [11].

Obecnie etopozyd jest jednym z najczęściej stosowanych leków przeciwnowotworowych [12]. Jest lekiem pierwszego rzutu w leczeniu białaczek, raka drobnokomórkowego płuc, raka jądra, ziarnicy złośliwej, chłoniaków niezłośliwych oraz mięsaka Kaposiego [11–14]. Lek ten jest również stosowany w przygotowaniu chorych do przeszczepu szpiku kostnego [13]. W terapii może być stosowany samodzielnie lub w leczeniu skojarzonym z innymi cytostatykami lub radioterapią. Leczenie skojarzone w przypadku etopozydu ma na celu wyeliminowanie komórek, które wykształciły oporność na lek [11,13]. Etopozyd, jak wszystkie leki stosowane w terapii nowotworów, powoduje wiele działań niepożądanych. Najczęściej występują: zapalenie wokół miejsca wlewu, dolegliwości

żołądkowo-jelitowe (utrata apetytu, nudności i wymioty), utrata włosów. U wielu chorych poddanych terapii etopozydem odnotowuje się przejściowy spadek liczby krwinek, co prowadzi do typowych działań ubocznych, tj. zwiększonego ryzyka infekcji z powodu spadku liczby krwinek białych, objawy niedokrwistości (spadek liczby erytrocytów) oraz objawy skazy krwotocznej małopłytkowej [15].

Przeciwutleniacze w chemioterapii

W terapii onkologicznej bardzo poważnym problemem są działania uboczne wywoływane przez leki przeciwnowotworowe. Nadzieją na ich złagodzenie jest terapia skojarzona. Do związków uwzględnianych w tego rodzaju terapii należą antyutleniacze, ponieważ wiele leków stosowanych w chemioterapii powoduje wzrost produkcji reaktywnych form tlenu oraz spadek poziomu przeciwutleniaczy w związku z indukowaniem stresu oksydacyjnego [16-20].

Stres oksydacyjny może być wywołany wieloma czynnikami. W badaniach *in vitro* wykazano, że neutrofile chorych poddanych chemioterapii produkują więcej nadtlenu wodoru i anionów ponadtlenkowych w porównaniu z neutrofilami izolowanymi od osób zdrowych [17]. Intensywna chemioterapia z udziałem cytostatyku, jakim jest etopozyd, poprzedzająca przeszczep szpiku kostnego, powoduje gwałtowny spadek poziomu przeciwutleniaczy w organizmie oraz wzrost ryzyka uszkodzeń struktur komórkowych i DNA przez RFT. Sytuacja taka ma miejsce w szczególności, gdy w komórkach dochodzi do niedoboru witaminy C – podstawowego zmiatacza wolnych rodników [16,21]. Jeżeli uszkodzenia materiału genetycznego nie zostaną naprawione, mogą prowadzić do transformacji nowotworowej [22], w tym rozwoju białaczek lekozależnych [23]. Jednak najczęstszym zdarzeniem jest kierowanie komórek na drogę apoptozy [24].

Podczas leczenia etopozydem dochodzi do silnej mielosupresji. Cytotoksyczne działanie leków blokuje powstawanie, podział i dojrzewanie rozwijających się komórek krwi, czego konsekwencją jest niedobór erytrocytów (anemia) i leukocytów, a w szczególności neutrofilii (neutropenia), monocytów (monocytopenia) oraz płytek krwi (trombocytopenia) [25]. Mielosupresja wywołana etopozydem wydaje się być związana nie tylko z jego predyspozycją do hamowania topoizomeryazy II, ale również z wysoką aktywnością peroksydaz takich jak mieloperoksydaza w komórkach szpiku kostnego. Aktywność mieloperoksydazy w zróżnicowanych komórkach granulocytów powoduje utlenianie etopozydu i generowanie rodników fenoksylowych [24,26].

W związku z tym usuwanie reaktywnych form tlenu przez przeciwutleniacze mogłoby ograniczyć neutropenię poprzez działanie ochronne na neutrofile, których czas życia zależny jest od RFT. Stosowanie związków o działaniu przeciwutleniającym wymaga jednak dużej ostrożności, ponieważ wytwarzanie RFT w czasie metabolizmu wielu leków przeciwnowotworowych jest jednym z najważniejszych elementów ich cytotoksycznej aktywności. Dlatego stosowa-

nie przeciwutleniaczy jako terapii wspomagającej budzi obawy. Jednak w sytuacji, gdy reaktywne formy tlenu są wytwarzane jako skutek uboczny metabolizmu leków, wprowadzenie terapii antyoksydacyjnej budzi nadzieję jako strategia ochrony komórek prawidłowych [18, 26–28].

Materiały i metody

Celem badań było określenie wpływu flawonoidu występującego w zielonej herbacie: galusanu epigallokatechiny oraz cytostatyku, jakim jest etopozyd, na żywotność komórek, ilość uszkodzeń DNA i proces apoptozy w komórkach białaczkowych K562. W przeprowadzonych badaniach posłużono się linią komórkową K562 dostarczoną przez European Collection of Cell Cultures (ECACC). Komórki pochodziły od 53-letniej kobiety rasy kaukaskiej chorującej na przewlekłą białaczkę szpikową (CML, ang. *chronic myelogenous leukemia*).

Hodowla komórek K-562

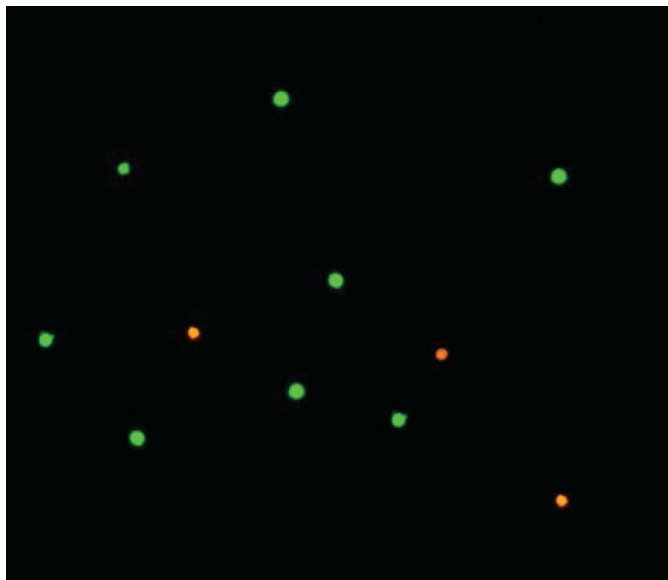
Komórki K-562 hodowano w zawiesinie o gęstości 5×10^5 /ml w pożywce RPMI 1640 z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej (FBS, *fetal bovine serum*) oraz antybiotyków: penicyliny (100 U/ml) i streptomycyny (100 μ g/ml). Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO₂ o wilgotności 95%, zmieniając płyn hodowlany co 48 godzin. Wszystkie eksperymenty wykonywano w fazie logarytmicznego wzrostu komórek.

Ocena żywotności komórek

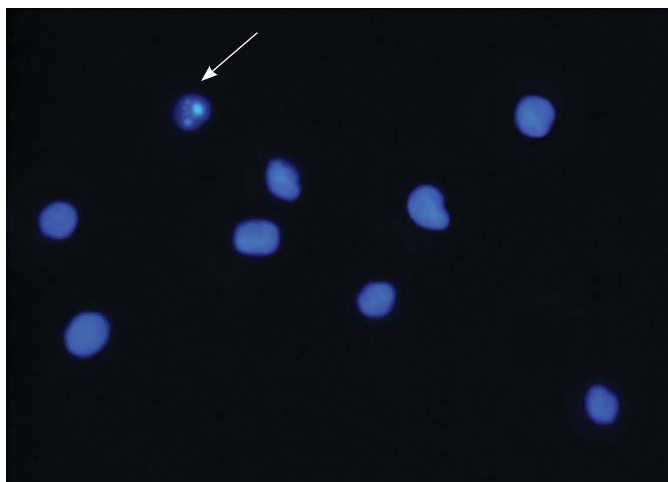
W celu zbadania wpływu EGCG (Merck, Niemcy) i/lub etopozydu (Merck, Niemcy) na żywotność komórek przeprowadzono różnicowe barwienie fluorescencyjne, w którym pod wpływem dwuocianu fluoresceiny komórki żywe barwią się na kolor zielony, a bromek etydyny wybarwia komórki martwe na pomarańczowo, co zaprezentowano na rycinie 1. Komórki K562 o gęstości 5×10^5 /ml inkubowano przez 1, 4, 24 oraz 48 godzin z galusanem epigallokatechiny w stężeniach od 0 do 100 μ M i/lub z 0,5 μ M etopozydem, dodanym na ostatnią godzinę inkubacji. Następnie komórki odwirowano, zawieszono w 30 μ l PBS po czym połączono w proporcji 1:1 z mieszaniną dwuocianu fluoresceiny o stężeniu 5 mg/ml w acetonie, bromku etydyny o stężeniu 200 μ g/ml w PBS i PBS bez Ca²⁺ i Mg²⁺. Preparaty analizowano w mikroskopii fluorescencyjnej (Olympus IX50, Olympus, Japonia) z użyciem niebieskiego filtra, licząc 500 losowo wybranych komórek w każdym preparacie. Zliczano wyniki z trzech niezależnych eksperymentów.

Badanie uszkodzeń DNA na poziomie pojedynczej komórki – test kometowy

Metoda elektroforezy pojedynczych komórek w żelu agarozowym, czyli test kometowy (ang. *comet assay*) służy do oceny uszkodzeń DNA jądrowego na



Rycina 1. Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego (powiększenie x 100) przedstawiający komórki żywe – świecące na zielono oraz komórki martwe – świecące na czerwono



Rycina 2. Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego (powiększenie x 400). Strzałka wskazuje komórkę apoptotyczną z widocznymi ciałkami apoptotycznymi

poziomie pojedynczej komórki. Nieuszkodzone DNA jądrowe po zastosowaniu alkalicznej lizy nie jest podatne na migrację w polu elektrycznym. Natomiast jeśli doszło do uszkodzenia DNA, w czasie elektroforezy pęknięte fragmenty migrują, a w preparatach pod mikroskopem fluorescencyjnym widoczny jest charakterystyczny obraz przypominający kometę. Intensywność fluorescencji ogona komety odzwierciedla ilość uszkodzeń DNA w jądrze, która jest wyrażana jako % uszkodzeń DNA w pojedynczej komórce.

W przeprowadzonych doświadczeniach komórki K562 o gęstości 5×10^5 /ml inkubowano przez 1, 4 oraz 24 godziny z galusanem epigallokatechiny w stężeniach: 0, 10, 50 i 100 μM i/lub 0,5 μM etopozydem. Następnie komórki odwirowano w PBS w warunkach: 4°C , 5 min., 230 x g (1200 rpm) i zawieszono w 50 μl PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} . Do zawiesiny komórek dodawano agarozę o obniżonej temperaturze topnienia (LMPA, ang. *Low Melting Point Agarose*). Na wcześniej przygotowane szkiełka podstawowe pokryte agarozą o normalnej temperaturze topnienia (NMPA, ang. *Normal Melting Point Agarose*) nakładano po 85 μl zawiesiny komórek i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Po zastygnięciu agarozy i zdjęciu szkiełek nakrywkowych preparaty zanurzano w alkalicznym buforze lizującym (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X-100, pH=10) i pozostawiano w ciemności, w temperaturze 4°C , na co najmniej 16 godzin. Po zakończeniu lizy preparaty dwukrotnie płukano buforem neutralizującym (0,4 M Tris pH=7.5) oraz układano na 40 minut w aparacie do elektroforezy, zawierającym silnie alkaliczny bufor (300 mM NaOH, 1mM EDTA, pH>13). Po tym czasie prowadzono elektroforezę przez 30 minut przy napięciu 0,74 V/cm i natężeniu 300 mA. Następnie preparaty płukano trzykrotnie buforem neutralizującym (0,4 M Tris, pH=7.5) oraz zanurzano na 5 minut w zimnym metanolu. Bezpośrednio przed analizą szkiełka inkubowano przez 5 minut w wodzie destylowanej oraz barwiono jodkiem propidyny (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Pomiarów dokonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX 50 z wykorzystaniem zielonego filtra oraz kamery CCD. Analiza uszkodzeń DNA została przeprowadzona w programie Comet Assay 2.6 (Theta System GmbH, Niemcy) określającym stopień uszkodzenia komórek. Wszystkie eksperymenty wykonano w trzech, niezależnych powtórzeniach, zaś z każdego preparatu analizowano po 100 komórek. W dalszej analizie posłużono się % DNA zawartym w „ogonie komety”.

Oznaczenie komórek apoptotycznych z użyciem barwnika Hoechst 33342 w mikroskopii fluorescencyjnej

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki, jest wysoce zorganizowanym, kontrolowanym genetycznie procesem fizjologicznym prowadzącym do eliminacji komórek. Apoptoza służy utrzymaniu stałej liczby komórek w tkankach i narządach oraz pomaga usuwać zbyteczne lub uszkodzone komórki. Jest to kluczowy proces w eliminacji komórek nowotworowych. Na poziomie morfolo-

gicznym komórki apoptotyczne wyraźnie różnią się od zdrowych: widoczna jest kondensacja chromatyny, fragmentacja DNA na odcinki wielkości około 180 par zasad lub ich wielokrotności oraz formowanie ciałek apoptotycznych – struktur zawierających organelle i fragmenty chromosomów otoczonych błoną komórkową. Za pomocą barwienia fluorescencyjnego możliwe jest odróżnienie komórek prawidłowych od tych, które weszły w apoptozę, ponieważ w ich przypadku zamiast jądra komórkowego w obrazie z mikroskopu fluorescencyjnego widoczne są jasno świecące ciałka apoptotyczne zaprezentowane na rycinie 2.

Komórki w zawiesinie o gęstości $5 \times 10^5/\text{ml}$ wysiewano na 24-dółkową płytkę i dodawano galusan epigallokatechiny w stężeniu z zakresu 0–100 μM i/lub etopozyd w stężeniu 0,5 μM . Płytki pozostawiano do inkubacji w cieplarni w 37°C i 5% CO_2 na 1, 24 lub 48 godzin. Następnie komórki dwukrotnie odwirowano w PBS w warunkach: 230 x g (1200 rpm), 5 minut, 4°C i dodano 100 μl barwnika (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33342 w 3,7% paraformaldehydzie w PBS). Analizę wykonano w mikroskopie fluorescencyjnym, licząc za pomocą licznika hematologicznego procentowy udział komórek apoptotycznych w 500 przypadkowo napotkanych komórkach. Jako apoptotyczne przyjmowano komórki, w których widoczne były ciałka apoptotyczne oraz wykazywały intensywną, niebieską fluorescencję.

Analiza statystyczna

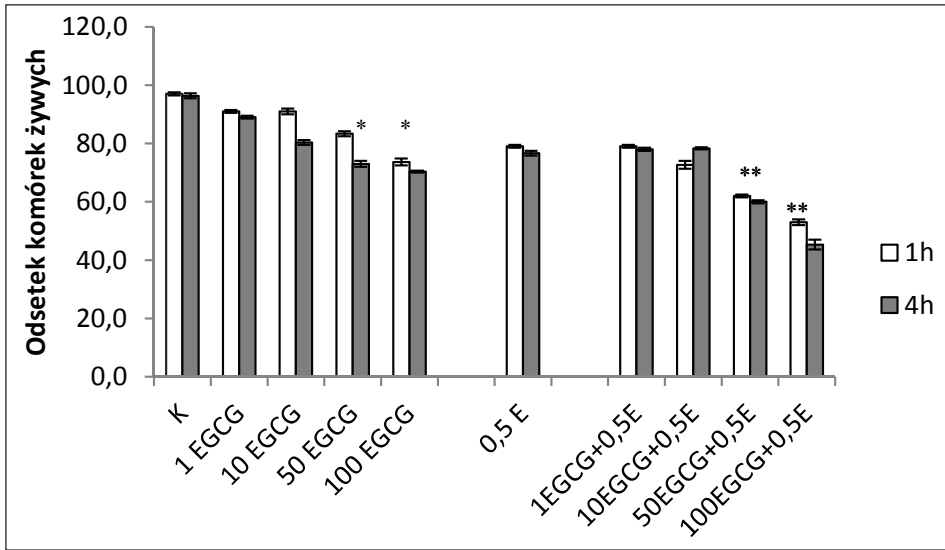
Analizy statystycznej wyników testu kometowego dokonano w programie Statistica 12,0 (StatSoft Polska), używając testu ANOVA popartego analizą post-hoc Tukeya (HSD). Wyniki przedstawiono w postaci średnich grupowych, słupki błędów oznaczają 1,96SE (błędu standardowego). Różnice przy $p < 0,05$ przyjęto za istotne statystycznie. W przypadku oceny istotności wyników pomiaru żywotności oraz apoptozy zastosowano test t-studenta.

Wyniki

Wpływ EGCG i/lub etopozydu na żywotność komórek K562

Wykazano, że wraz ze wzrostem stężenia EGCG zmniejsza się odsetek komórek żywych. Równoczesna inkubacja komórek K562 z etopozydem i EGCG powoduje istotne statystycznie zmniejszenie odsetka komórek żywych, ale tylko dla wyższych stężeń tego polifenolu, tj. 50 i 100 μM EGCG. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy czasem inkubacji wynoszącym 1 lub 4 godziny dla wszystkich badanych stężeń i związków. Wyniki przedstawiono na rycinie 3.

Aby sprawdzić, czy wcześniejsza inkubacja komórek K562 z EGCG uwrażliwia je na działanie etopozydu, komórki traktowano przez 23 lub 47 godzin z EGCG, a następnie na jedną (ostatnią) godzinę dodawano etopozyd w stężeniu 0,5 μM . Wyniki przedstawiono na rycinie 4. Wykazano, że wraz z wydłużeniem czasu inkubacji do 24 i 48 godzin zmniejsza się odsetek komórek żywych,

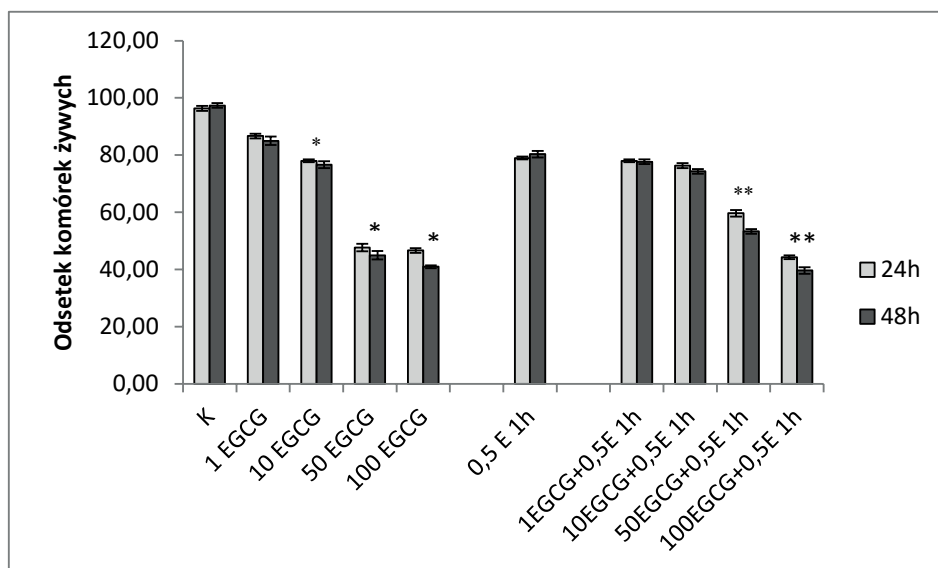


Rycina 3. Wpływ galusanu epigallokatechiny (EGCG) w zakresie stężeń 0–100 μM i/lub 0,5 μM etopozydu (E) na żywotność komórek K562 po 1 i 4 godzinach inkubacji z badanymi związkami. K-kontrola; 1–100 EGCG – 1–100 μM EGCG; 0,5E – 0,5 μM E. * – istotność statystyczna ($p < 0,05$) w stosunku do kontroli; ** – istotność statystyczna ($p < 0,05$) w stosunku do 0,5 μM etopozydu

traktowanych EGCG w sposób zależny od zastosowanej dawki. Wcześniejsza inkubacja komórek K562 uwrażliwia je na działanie etopozydu. Zaobserwowany wzrost odsetka komórek martwych po 24 i 48 godzinach inkubacji z EGCG i jednogodzinnej równoczesnej inkubacji z 0,5 μM etopozydem wynika raczej z silnego działania galusanu niż etopozydu. Jednocześnie może to świadczyć o tym, że wcześniejsza i długotrwała (do 48 godzin) ekspozycja komórek K562 na działanie niskich dawek EGCG (tj. 1 i 10 μM) nie zmniejsza skuteczności cytostatycznego działania tego leku.

Wpływ EGCG na uszkodzenia DNA w komórkach K562

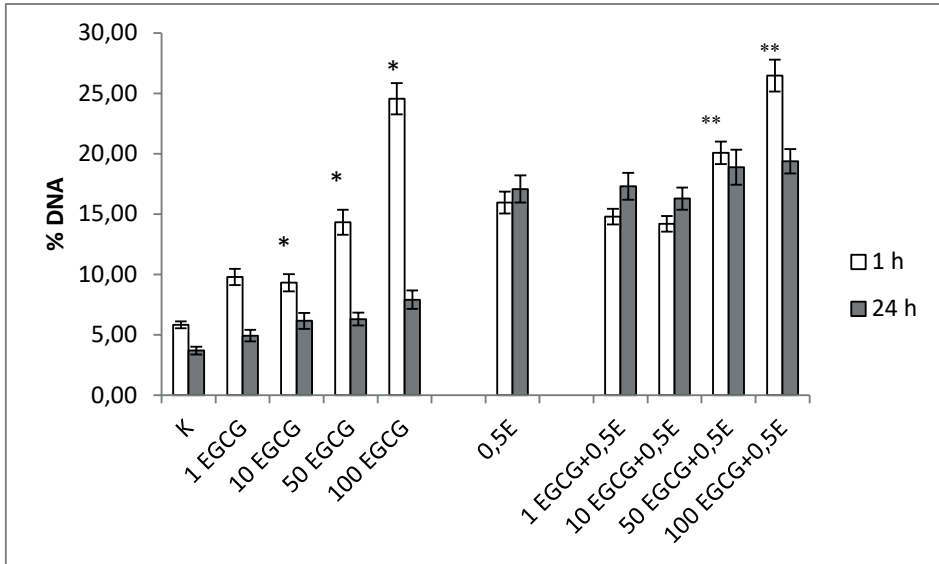
Galusan epigallokatechiny w stężeniach 50 i 100 μM powoduje istotny statystycznie wzrost poziomu uszkodzeń DNA w komórkach linii K562, ale tylko po jednogodzinnej inkubacji z tym polifenolem. Efektu tego nie wykazano wydłużając czas inkubacji z EGCG do 24 godzin. Ponadto zaobserwowano, że wyższy poziom uszkodzeń występuje po jednogodzinnej inkubacji komórek z EGCG niż po 24-godzinnej inkubacji, co może wskazywać, że zainicjowane przez EGCG



Rycina 4. Wpływ galusanu epigallokatechiny (EGCG) w zakresie stężeń 0–100 μM na żywotność komórek K562 po 24 i 48 godzinach inkubacji oraz 23 i 47 godzinach inkubacji z EGCG w zakresie stężeń 0–100 μM i równoczesnej jednogodzinnej inkubacji z 0,5 μM etopozydem. K-kontrola; 1–100 EGCG – 1–100 μM EGCG; 0,5E 1h – 0,5 μM E; 1–100 EGCG + 0,5 E 1h – 1–100 μM EGCG 23 lub 47 h i 0,5 μM E 1h (ostatnia godzina inkubacji). * – istotność statystyczna ($p < 0,05$) w stosunku do kontroli; ** – istotność statystyczna ($p < 0,05$) w stosunku do 0,5 μM etopozydu.

uszkodzenia są po pewnym czasie (w tym wypadku 24 godziny) naprawiane przez komórki K562. Wyniki przedstawiono na rycinie 5.

W dalszej kolejności sprawdzono, czy równoczesna inkubacja komórek K562 z EGCG w zakresie stężeń 0–100 μM i etopozydem w stężeniu 0,5 μM przez okres jednej godziny wpływa na poziom indukowanych uszkodzeń DNA. Wyniki przedstawiono na rycinie 5. Etopozyd w stężeniu 0,5 μM przez okres jednej godziny powoduje istotny statystycznie wzrost poziomu uszkodzeń DNA. Równoczesna inkubacja komórek K562 z 0,5 μM etopozydem i EGCG w stężeniach 1 i 10 μM nie powoduje istotnych statystycznie zmian w poziomie uszkodzeń DNA. Co ważne, te zakresy stężeń nie zmniejszają też poziomu uszkodzeń DNA wywołanych cytotatykiem. Natomiast jednoczesna inkubacja z 0,5 μM etopozydem oraz z 50 lub 100 μM EGCG powoduje istotny statystycznie wzrost poziomu uszkodzeń DNA w stosunku do działania samego etopozydu.



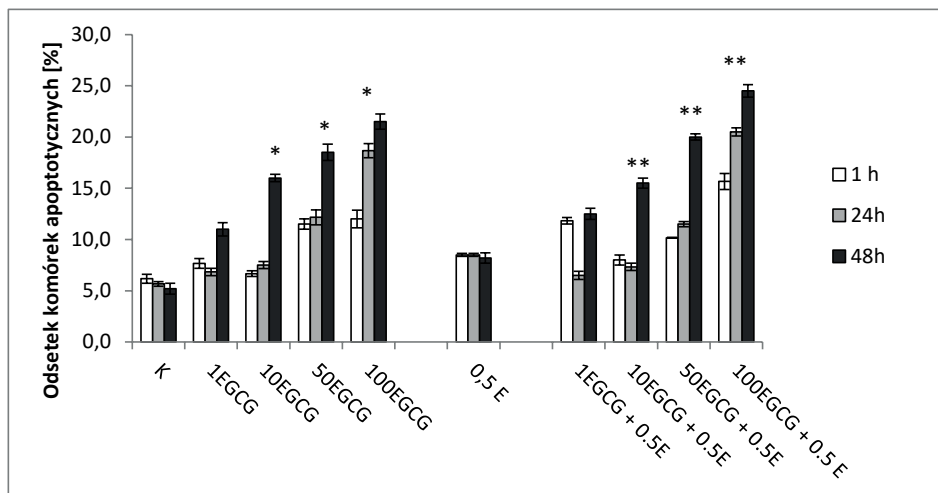
Rycina 5. Wpływ galusanu epigallokatechiny i/lub etopozydu na uszkodzenia DNA w komórkach linii K562 po 1- i 24-godzinnej inkubacji. Komórki K562 inkubowano z EGCG w stężeniu 1–100 μM (1–100 EGCG) przez 1 lub 24 godziny bez lub w obecności 0,5 μM etopozydu dodawanego na jedną (ostatnią) godzinę inkubacji (1–100 EGCG + 0,5 E). Wyniki reprezentują średnie wartości z trzech doświadczeń. Na wykresie oznaczono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) względem próby kontrolnej (K) (*) oraz etopozydu (0,5 μM) (0.5E)(**)

Następnie sprawdzono, czy wcześniejsza inkubacja komórek K562 z galusanem epigallokatechiny uwrażliwia je na działanie cytostatyku, jakim jest etopozyd. Wykazano, że ekspozycja komórek K562 na 23-godzinne działanie EGCG nie uwrażliwia tych komórek na późniejsze jednogodzinne działanie etopozydu – nie wykazano istotnych statystycznie zmian w poziomie uszkodzeń DNA. Co ważne, polifenol ten nie zmniejsza/obniża działania cytostatyku, co odzwierciedlało się w takim samym poziomie uszkodzeń DNA po działaniu etopozydu (17%), jak i po działaniu EGCG (we wszystkich badanych zakresach stężeń) i etopozydu (uszkodzenia DNA na poziomie 16–19%).

Apoptoza

Wykazano, że 24-godzinna inkubacja komórek K562 z EGCG w stężeniach 50 i 100 μM powoduje istotny statystycznie wzrost odsetka komórek apoptotycznych. Wydłużenie czasu inkubacji do 48 godzin wzmacnia ten proapoptotyczny efekt działania EGCG poprzez dalszy wzrost liczby komórek z widocznymi ciał-

kami apoptotycznymi. Wcześniejsza, tj. 23- lub 47-godzinna inkubacja komórek białaczkowych z EGCG w wyższych stężeniach (tj. 50 i 100 μM) uwrażliwia je na późniejsze jednogodzinne działanie etopozydu – zaobserwowano istotny wzrost odsetka komórek apoptotycznych. Wyniki przedstawiono na rycinie 6.



Rycina 6. Zależność pomiędzy stężeniem EGCG oraz EGCG i 0,5 μM etopozydem, a odsetkiem komórek apoptotycznych po 1, 24 i 48 godzinach inkubacji. Komórki K562 inkubowano z EGCG w stężeniu 0–100 μM (0–100 EGCG) przez 1, 23 lub 47 godzin, a następnie dodawano etopozyd w stężeniu 0,5 μM (0,5E) na jedną godzinę. Eksperyment wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach. Na wykresie oznaczono (*) różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) względem próby kontrolnej (K) oraz względem etopozydu (**)

Dyskusja

W leczeniu nowotworów chemioterapia jest ciągle najczęściej stosowaną metodą. W ostatnich latach badacze coraz częściej skupiają się na tzw. terapii wspomaganej z zastosowaniem różnego typu związków, głównie o charakterze antyoksydacyjnym, w tym flawonoidów i innych polifenoli. W przeprowadzonych eksperymentach postanowiono sprawdzić, czy składnik zielonej herbaty – galusan epigallokatechiny – może okazać się skuteczny w terapii skojarzonej z etopozydem w przypadku leczenia przewlekłej białaczki szpikowej. Zastosowane w badaniach stężenia galusanu epigallokatechiny oraz etopozydu obejmowały jedynie zakres zbliżony do stężeń, które osiągnęte są w organizmie. Stężenie etopozydu osiągnęte w osoczu w zależności od użytego schematu leczenia waha się

pomiędzy 0,2–150 μM [29]. W przeprowadzonych eksperymentach użyto stężenia leku 0,5 μM , które pozwala osiągnąć dobre efekty terapeutyczne przy jego najmniejszej toksyczności. W przypadku galusanu epigallokatechiny użyto również stężeń (1–100 μM), które możliwe są do osiągnięcia we krwi po wypiciu zielonej herbaty lub zażyciu suplementów wzbogaconych EGCG [6].

Wpływ EGCG na żywotność komórek K562.

Badania przeprowadzone z wykorzystaniem galusanu epigallokatechiny potwierdziły, że związek ten ujemnie wpływa na żywotność komórek przewlekłej białaczki szpikowej. Zastosowanie wysokich stężeń, tj. 50 lub 100 μM EGCG, skutkowało znacznym obniżeniem żywotności komórek K562 bez względu na zastosowany czas inkubacji. Natomiast wydłużenie czasu inkubacji komórek z EGCG do 48 godzin przyczyniło się do istotnego statystycznie zmniejszenia żywotności komórek już przy niższym, tj. 10 μM , stężeniu EGCG. Wykazano również, że EGCG może być skutecznym związkiem, jeśli chodzi o redukcję liczby komórek nowotworowych, jeżeli połączymy jego działanie z etopozydem. Co ważne, nawet niskie dawki tego polifenolu – tj. do 10 μM – nie zmniejszają skuteczności działania cytostatyku, a wyższe dawki (50 i 100 μM) uwrażliwiają komórki K562 na działanie etopozydu. Zaobserwowany wzrost odsetka komórek martwych po 24 i 48 godzinach inkubacji z EGCG i etopozydem wydaje się wynikać z silnego działania samego polifenolu.

Z doświadczeń przeprowadzonych przez inne grupy badawcze wynika również, że EGCG wpływa na zmniejszenie żywotności komórek nowotworowych. Inkubacja komórek MCF-7 (nowotwór piersi) przez 72-godzinny z EGCG w stężeniach 40–100 μM powodowała istotne statystycznie obniżenie żywotności [30]. Galusan epigallokatechiny był również czynnikiem wpływającym na żywotność nowotworowych komórek macierzystych (CSC), wyizolowanych z linii komórkowych PC-3 i LNCaP (nowotwór prostaty). Badania dowiodły, że ludzki nowotwór prostaty zawiera niewielką populację komórek macierzystych wrażliwych na działanie EGCG, ponieważ zastosowanie rosnących dawek tego polifenolu powodowało zmniejszenie żywotności CSC [31].

Badania przeprowadzone na linii K562 sugerują, że EGCG stosowany w wyższych dawkach (50 i 100 μM) może w znaczny sposób przyczyniać się do eliminacji komórek nowotworowych krwi, a niskie dawki tego polifenolu nie zmniejszają skuteczności działania cytostatyku. Podobne wyniki uzyskały inne grupy badawcze, stosując EGCG z połączeniu z doksorubicyną oraz wykazując synergistyczny efekt działania EGCG i doksorubicyny w badaniach *in vitro* i *in vivo* na komórkach nowotworu wątroby i prostaty [32–34].

Uszkodzenia DNA

Galusan epigallokatechiny, którym traktowano komórki linii K562, indukował uszkodzenia DNA w sposób zależny od zastosowanej dawki, ale tylko po jed-

nogodzinnej inkubacji. Efektu tego nie obserwowano po 24 godzinach, co sugeruje, że komórki K562 są w stanie naprawić uszkodzenia indukowane EGCG. Równocześnie wykazano, że wyższe stężenia tego polifenolu (tj 50 i 100 μM) wzmagają efekt 0,5 μM etopozydu, co skutkowało wzrostem poziomu uszkodzeń DNA z 15% do, odpowiednio, 20 i 26%. Natomiast wcześniejsza inkubacja komórek z EGCG nie uwrażliwia ich na późniejsze działanie etopozydu, ale też nie zmniejsza genotoksycznego działania leku.

Metoda kometowa została także wykorzystana w badaniach nad wpływem EGCG na uszkodzenia DNA indukowane H_2O_2 i MNNG (metylonitronitrosoguanidyna, mutagen) w linii komórkowej V-79 (fibroblasty płuc chomika chińskiego). Inkubacja fibroblastów z H_2O_2 i MNNG powodowała uszkodzenia DNA, które rosły wraz ze wzrostem stężeń użytych czynników. W obu przypadkach zastosowanie EGCG (0–100 μM) powodowało zmniejszenie uszkodzeń wywołanych wcześniejszą inkubacją z H_2O_2 i MNNG. Ta sama grupa badawcza przeprowadziła eksperyment, w którym wykazano, że jeżeli komórki V-79 traktowane są najpierw EGCG w stężeniach 0–100 μM , a następnie H_2O_2 (45 $\mu\text{g}/\text{ml}$) lub MNNG (50 μM), odsetek uszkodzeń DNA ulega redukcji proporcjonalnie do użytego stężenia EGCG [35].

Indukcja procesu apoptozy w komórkach K562

W przypadku komórek, w których inicjowano proces apoptozy, zastosowanie krótkiego czasu inkubacji pozwoliło na uzyskanie wyników istotnych statystycznie przy stężeniach 50 μM i 100 μM EGCG. Natomiast wydłużenie czasu inkubacji do 48 godzin powodowało, że stężenie czynnika koniecznego do zapoczątkowania mechanizmów apoptozy maleje do 10 μM . Ponadto wcześniejsza ekspozycja komórek K562 na EGCG uwrażliwia je na późniejsze działanie etopozydu, co obserwowano poprzez wzrost odsetka komórek z ciałkami apoptotycznymi. Zatem za inicjację procesu apoptozy w komórkach K562 odpowiadają proapoptotyczne właściwości galusanu epigallokatechiny. Badania przeprowadzone przez Roya i wsp. potwierdzają, że EGCG hamuje wzrost i proliferację komórek nowotworowych K562 oraz indukuje w nich proces apoptozy [35]. Grupa badawcza Tanga również dowiodła, że EGCG ma właściwości proapoptotyczne. Swoje badania przeprowadzili na komórkach macierzystych (CSC, ang. *cancer stem cells*) wyizolowanych z nowotworu prostaty. Otrzymane wyniki były potwierdzeniem, że EGCG powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego i inicjację apoptozy poprzez generowanie wolnych rodników tlenowych oraz na drodze aktywacji białek proapoptotycznych: Bax, Bad, Bik, Bid i kaspaz: 3, 9. EGCG blokował także ekspresję antyapoptotycznych białek Bcl-2, Bcl-xL. Grupa wykazała, że efekt proapoptotycznej aktywności EGCG jest wzmacniany przez inny polifenol z grupy flawonoidów – kwercetynę. Komórki macierzyste nowotworu prostaty, stymulowane jednocześnie EGCG i kwercetyną, cechowały się niższą

żywołnością, częściej wchodziły na drogę apoptozy i były bardziej wrażliwe na działanie chemioterapii [31]. Podobnie wyniki uzyskali badacze, którzy w doświadczeniach wykorzystywali linie komórkowe wyizolowane z nowotworów płuc: H1299, H460, A549, CL13 i okrężnicy: HT29. Wszystkie komórki nowotworowe, które inkubowano z EGCG, były wrażliwe na działanie tego polifenolu. Dodatkowo udowodniono, że obecność enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i katalazy (5 U/ml, 30 U/ml) osłabiała aktywność EGCG. Równocześnie, jeżeli komórki były mniej podatne na działanie EGCG, badacze obserwowali, że mniejszą rolę odgrywają SOD i katalaza w obniżaniu aktywności EGCG. Po 24 godzinach inkubacji komórek H1299 wyłącznie z 50 μM EGCG obserwowali zwiększenie odsetka komórek apoptotycznych. Natomiast jeżeli komórki traktowano 25 μM lub 50 μM EGCG przez 24 godziny w obecności SOD i katalazy, to nieznacznie zmniejszała się ilość komórek apoptotycznych. Wyniki badań, które uzyskali, świadczą o tym, że na indukcję apoptozy wpływają RFT produkowane w wyniku oksydacyjnej aktywności EGCG obecnego w pożywce w czasie inkubacji z komórkami [36].

Obecnie sugerowanym sposobem na zwiększenie wydajności działania cząstek używanych w terapii nowotworów jest stosowanie nanotechnologii. Efekt działania galusanu epigallokatechiny umieszczonego w nanocząsteczkach po 24 godzinach inkubacji okazał się ponad 10 razy bardziej skuteczny w porównaniu z samym EGCG. W przypadku komórek PCa stężenie, dla którego został zahamowany wzrost 50% komórek (IC_{50}), dla nano-EGCG wynosiło 3,74 μM , podczas gdy dla samego EGCG – 43,6 μM . Osiągnięto wysoki odsetek komórek wchodzących na drogę apoptozy (81%) po zastosowaniu 5,48 μM nano-EGCG. Natomiast, aby osiągnąć podobny efekt dla samego EGCG, należało zwiększyć jego dawkę do ponad 40 μM [37].

Podsumowując dane literaturowe i powyższe badania, galusan epigallokatechiny wydaje się być obiecującym polifenolem w leczeniu skojarzonym z etopozydem. Wspomaga działanie etopozydu – eliminując komórki białaczkowe, zwiększa uszkodzenia DNA w tych komórkach oraz kieruje je na drogę apoptozy. I co ważne, nawet niskie dawki EGCG nie zmniejszają terapeutycznego działania etopozydu. Nie należy jednak tych jakże obiecujących właściwości galusanu epigallokatechiny przekładać na wszystkie rodzaje nowotworów czy inne leki stosowane podczas chemioterapii. Bowiem jak wykazały badania Golden i wsp. [38], EGCG zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* hamuje działanie bortezomibu (leku przeciwnowotworowego, który jest inhibitorem 26S proteasomu), stosowanego w leczeniu m.in. szpiczaka mnogiego. Podobne wyniki uzyskała grupa badawcza (Modernelli i wsp.) – EGCG hamował terapeutyczne działanie bortezomibu na komórki raka prostaty [39].

Wnioski

Chemioterapia jest jednym z najczęściej stosowanych sposobów leczenia nowotworów. Niestety efekty uboczne, jakie niesie ze sobą, są nadal poważnym, a zarazem najczęstszym problemem, pomimo kilkudziesięciu lat stosowania tego sposobu leczenia. Obecnie wielu badaczy skupia się na poszukiwaniu rozwiązań, które, niezmniejszając cytostatycznej efektywności leków, zmniejszałyby cytotoksyczność w kierunku zdrowych komórek i pozwoliły na wyeliminowanie problemów związanych ze stanami zapalnymi lub infekcjami, czyli tzw. terapii wspomaganej, która wykorzystuje przeciwutleniacze. Niestety wiedza na temat interakcji pomiędzy antyoksydantami, a lekami przeciwnowotworowymi jest w dalszym ciągu ograniczona. I jak pokazują badania, nie każdy antyoksydant „współdziała” z cytostatykiem, jak na przykład w przypadku galusanu epigallokatechiny i bortezomibu.

W opisanych badaniach wykazano, że galusan epigallokatechiny, podstawowy składnik zielonej herbaty, może się okazać przydatny w terapii białaczek z zastosowaniem konkretnego cytostatyku: etopozydu. Obiecujące efekty osiągnięto dla stężeń 50 i 100 μM EGCG, które to dawki eliminowały komórki przewlekłej białaczki szpikowej, a w połączeniu z cytostatykiem wzmacniały jego cytotoksyczne właściwości. Skuteczność współdziałania EGCG i etopozydu na komórki K562 wyrażona jest także jako wzrost odsetka komórek z uszkodzeniami DNA. Co więcej, komórki, które nie zostały wyeliminowane poprzez cytotoksyczne właściwości etopozydu i galusanu epigallokatechiny, mogą zostać skierowane na drogę apoptozy, co również potwierdzają wyniki naszych badań. Obserwowany wzrost liczby komórek apoptotycznych po działaniu EGCG i etopozydu jest w opisywanym przypadku procesem nieodwracalnym, gdyż ciała apoptotyczne to tzw. „późna apoptoza”. Przedstawione tutaj wstępne wyniki badań nad zastosowaniem EGCG w terapii skojarzonej z etopozydem w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej wymagają dalszych wnikliwych badań szczególnie pod kątem reakcji na ten typ terapii komórek prawidłowych. Uprzednio opublikowane wyniki, uzyskane w badaniach nad wpływem terapii kojarzonej kwercetyną i etopozydem, wskazują na możliwość redukcji ryzyka powstawania uszkodzeń DNA indukowanych etopozydem w zdrowych komórkach przez zastosowanie polifenoli [40–42]. Wstępne wyniki aktualnie prowadzonych badań wypadają bardzo obiecująco. Galusan epigallokatechiny w zakresie dawek 1–50 μM obniża poziom uszkodzeń DNA indukowanych etopozydem w limfocytach i neutrofilach prawidłowych [publikacja w przygotowaniu]. Jednakże kluczową wydaje się kwestia sprawdzenia efektu działania tej konkretnej pary cytostatyku–przeciwutleniacz: etopozyd–EGCG. Rosnące zainteresowanie flawonoidami, do których należy również galusan epigallokatechiny budzi zapotrzebowanie na kompleksową i syntetyczną wiedzę o współdziałaniu tych substancji z chemioterapeutykami.

Bibliografia

1. Ostrowska J, Stankiewicz A, Skrzydlewska E. *Antyoksydacyjne właściwości zielonej herbaty*. Brom Chem Toksykol. 2001; 34(2): 131–140.
2. Kwiatkowska E. *Składniki herbat w zapobieganiu chorób układu krążenia*. Post Fitoterapii. 2007; 2: 91–94.
3. Katiyar SK, Matsui MS, Elmets CA, et al. *Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leukocytes in human skin*. Photochem Photobiol. 1999; 69(2): 148–153.
4. Agarwal A, Prasad R, Jain A. *Effect of green tea extract (catechins) in reducing oxidative stress seen in patients of pulmonary tuberculosis on DOTS Cat I regimen*. Phytomedicine. 2010; 17(1): 23–27.
5. Khan N, Afaq F, Saleem M, et al. *Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate*. Cancer Res. 2006; 66(5): 2500–2505.
6. Bandle OJ, Osheroff N. *(-)-Epigallocatechin gallate, a major constituent of green tea, poisons human type II topoisomerases*. Chem Res Toxicol. 2008; 21(4): 936–943.
7. Łuczaj W. *Metody oznaczania polifenoli (katechin oraz teaflawin) występujących w herbatach*. Gazeta Farmaceut. 2008; 5: 30–33.
8. Malińska D, Kiersztan A. *Flawonoidy – charakterystyka i znaczenie w terapii*. Post Bioch. 2004; 50: 182–196.
9. Kik K, Szmigiero L. *Deksrazoksan (ICRF-187) – czynnik kardioochronny i modulator działania niektórych leków przeciwnowotworowych*. Post Hig Med Dośw. 2006; 60: 584–590.
10. Ostrowska J, Skrzydlewska E. *Aktywność biologiczna flawonoidów*. Post Fitoterapii. 2005; 3: 71–79.
11. Kostowski W, Herman ZS. *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii. Podręcznik dla studentów medycyny i lekarzy*. Wyd. Lek. PZWL 2005; s. 434.
12. Slevin ML. *The clinical pharmacology of etoposide*. Cancer. 1991; 67 (1 Suppl): 319–329.
13. Hande KR. *Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II*. Biochim Biophys Acta. 1998; 1400(1–3): 173–184.
14. Podlewski JK, Chwalibogowska-Podlowska A, Adamowicz R. *Leki współczesnej terapii*. Split Trading, Warszawa 2005; s. 261.
15. Cancer Research UK. www.cancerhelp.org.uk/about-cancer/treatment/cancer-drugs/etoposide [dostęp 6.04.2018].
16. Weijl NI, Cleton FJ, Osanto S. *Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity*. Cancer Treat Rev. 1997; 23(4): 209–240.
17. Sangeetha P, Das UN, Koratkar R, et al. *Increase in free radical generation and lipid peroxidation following chemotherapy in patients with cancer*. Free Radic Biol Med. 1990; 8(1):15–19.
18. Dürken M, Agbenu J, Finckh B, et al. *Deteriorating free radical-trapping capacity and antioxidant status in plasma during bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant. 1995; 15(5): 757–762.

19. Lauterburg BH, Nguyen T, Hartmann B, et al. *Depletion of total cysteine, glutathione, and homocysteine in plasma by ifosfamide/mesna therapy*. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1994; 35(2): 132–136.
20. Clemens MR, Ladner C, Schmidt H, et al. *Decreased essential antioxidants and increased lipid hydroperoxides following high-dose radiochemotherapy*. *Free Radic Res Commun*. 1989; 7(3–6): 227–232.
21. Weijl NI, Elsendoorn TJ, Lentjes EG, et al. *Supplementation with antioxidant micronutrients and chemotherapy-induced toxicity in cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled study*. *Eur J Cancer*. 2004; 40(11): 1713–1723.
22. Raptis S, Bapat B. *Genetic instability in human tumors*. *EXS*. 2006; (96): 303–320.
23. Schneider DT, Hilgenfeld E, Schwabe D, et al. *Acute myelogenous leukemia after treatment for malignant germ cell tumors in children*. *J Clin Oncol*. 1999; 17(10): 3226–3233.
24. Kagan VE, Kuzmenko AI, Tyurina YY. *Pro-oxidant and antioxidant mechanisms of etoposide in HL-60 cells: role of myeloperoxidase*. *Cancer Res*. 2001; 61(21): 7777–7784.
25. Garay G, Dupont J, Dragosky M, Nucifora E, et al. *Combination salvage chemotherapy with MIZE (ifosfamide-mesna, idarubicin and etoposide) for relapsing or refractory lymphoma*. *Leuk Lymphoma*. 1997; 26(5–6): 595–602.
26. Kagan VE, Yalowich JC, Borisenko GG, et al. *Mechanism-based chemopreventive strategies against etoposide-induced acute myeloid leukemia: free radical/antioxidant approach*. *Mol Pharmacol*. 1999; 56(3): 494–506.
27. Seifried HE, Anderson DE, Sorkin BC, et al. *Free radicals: the pros and cons of antioxidants. Executive summary report*. *J Nutr*. 2004; 134(11): 3143–3163.
28. Lamson DW, Brignall MS. *Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies*. *Altern Med Rev*. 1999; 4(5): 304–329.
29. Cierniak A. *Wpływ kwercetyny (3,5,7,3',4' – pentahydroksyflawonu) na uszkodzenia DNA wywołane etopozydem w komórkach prawidłowych krwi i komórkach białaczkowych*. Wyd. Biotech. UJ, Kraków 2007; s. 131.
30. Kushima Y, Iida K, Nagaoka Y, et al. *Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin and (-)-epigallocatechin gallate against heregulin beta1-induced migration/invasion of the MCF-7 breast carcinoma cell line*. *Biol Pharm Bull*. 2009; 32(5): 899–904.
31. Tang SN, Singh C, Nall D, et al. *The dietary bioflavonoid quercetin synergizes with epigallocatechin gallate (EGCG) to inhibit prostate cancer stem cell characteristics, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition*. *J Mol Signal*. 2010; 5: 14. doi: 10.1186/1750-2187-5-14.
32. Stearns ME, Amatangelo MD, Varma D, et al. *Combination therapy with epigallocatechin-3-gallate and doxorubicin in human prostate tumor modeling studies: Inhibition of metastatic tumor growth in severe combined immunodeficiency mice*. *Am J Pathol*. 2010; 177: 3169–3179.
33. Chen L, Ye HL, Zhang G, et al. *Autophagy inhibition contributes to the synergistic interaction between EGCG and doxorubicin to kill the hepatoma Hep3B cells*. *PLoS One*. 2014; 9.

34. Liang G, Tang A, Lin X, et al. *Green tea catechins augment the antitumor activity of doxorubicin in an in vivo mouse model for chemoresistant liver cancer*. Int J Oncol. 2010; 37: 111–123.
35. Roy M, Chakrabarty S, Sinha D, et al. *Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol*. Mutat Res. 2003; 523–524: 33–41.
36. Li GX, Chen YK, Hou Z, ET AL. *Pro-oxidative activities and dose-response relationship of (-)-epigallocatechin-3-gallate in the inhibition of lung cancer cell growth: a comparative study in vivo and in vitro*. Carcinogenesis. 2010; 31(5): 902–910.
37. Siddiqui IA, Adhami VM, Ahmad N, et al. *Nanochemoprevention: sustained release of bioactive food components for cancer prevention*. Nutr Cancer. 2010; 62(7): 883–890.
38. Golden EB, Lam PY, Kardosh A, et al. *Green tea polyphenols block the anticancer effects of bortezomib and other boronic acid-based proteasome inhibitors*. Blood. 2009; 113(23): 5927–5937.
39. Modernelli A, Naponelli V, et al. *EGCG antagonizes Bortezomib cytotoxicity in prostate cancer cells by an autophagic mechanism*. Sci Rep. 2015; 5: 15270. doi: 10.1038.
40. Kapiszewska M, Cierniak A, Elas M, et al. *Lifespan of etoposide-treated human neutrophils is affected by antioxidant ability of quercetin*. Toxicol In Vitro. 2007; 21(6): 1020–1030.
41. Kapiszewska M, Cierniak A, Papiez MA, et al. *Prolonged quercetin administration diminishes the etoposide-induced DNA damage in bone marrow cells of rats*. Drug Chem Toxicol. 2007; 30(1): 67–81.
42. Cierniak A, Papiez M, Kapiszewska M. *Modulatory effect of quercetin on DNA damage, induced by etoposide in bone marrow cells and on changes in the activity of antioxidant enzymes in rats*. Roczn Akad Med Białymst. 2004; 49 Suppl 1: 167–169.

Can epigallocatechin gallate be an effective polyphenol in combination therapy with etoposide for the treatment of chronic myelogenous leukemia?

Abstract

Introduction: Green tea ingredient – epigallocatechin gallate (EGCG) – is known for its chemopreventive and chemotherapeutic properties. It has strong antioxidant and anti-inflammatory properties, and antiproliferative or pro-apoptotic activity against cancer cells. Etoposide is one of the most commonly used anti-cancer drugs causing many side effects.

Materials and methods: This study investigated the role of EGCG in combination therapy with etoposide in the treatment of chronic myeloid leukemia. K562 cells were treated with EGCG and / or etoposide to determine the effect of this polyphenol on cell survival, DNA damage or apoptosis. DNA damages were measured with single cell gel electrophoresis (comet assay) and the apoptosis were analyzed in fluorescence microscope with Hoechst 33342 staining.

Results: Preliminary results suggest that EGCG at 50 and 100 μM sensitizes leukemic cells to the cytotoxic effect of etoposide, increases DNA damage that promotes removal cell and directs them to apoptosis.

Conclusions: The data show that epigallocatechin gallate may prove to be an effective polyphenol in combination therapy with etoposide in the treatment of chronic myeloid leukemia. However, further research is needed to explain the EGCG interaction with chemotherapeutics.

Key words: apoptosis, EGCG, etoposide, chronic myeloid leukemia, DNA damage