

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

*Studiu privind potențialul chimioterapeutic al
unor polifenoli*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. GANEA CONSTANȚA**

**Student-doctorand:
TOFOLEAN IOANA TEODORA**

- 2018 –

CUPRINSUL
REZUMATULUI TEZEI DE DOCTORAT

Cuprinsul tezei de doctorat.....	3
Introducere.....	4
Stadiul actual al cunoașterii.....	6
Contribuții personale	
Material și metodă.....	8
Efectele Doxorubicinei : tratamente combinate cu Quercetină și/sau Menadionă.....	12
Analiza ciclului celular – optimizare și corelații.....	14
Efectele Epigallocatehinei-3-Galat: monoterapie versus combinații cu Menadionă.....	16
Lista lucrărilor științifice publicate.....	19
Bibliografie selectivă.....	22

CUPRINSUL

TEZEI DE DOCTORAT

Cuprins.....	3
Lista lucrărilor științifice publicate.....	4
Lista abrevierilor și simbolurilor.....	7
Introducere.....	8
I. Partea generală	
1. Leucemia acută limfoblastică.....	10
2. Ciclul celular.....	20
3. Mitocondria și respirația celulară.....	24
4. Stresul oxidativ.....	34
5. Tipuri de moarte celulară – Apoptoza.....	39
6. Doxorubicina.....	45
7. Quercetina.....	48
8. Menadiona.....	51
9. Epigallocatehina-3-galat.....	54
II. Contribuții personale	
10. Material și metodă.....	58
Rezultate	
11. Efectele Doxorubicinei: tratamente combinate cu Quercetină.....	68
12. Efectele Doxorubicinei: tratamente combinate cu Menadionă.....	74
13. Efectele Doxorubicinei: tratamente combinate cu Quercetină și Menadionă.....	83
14. Analiza ciclului celular – optimizare și corelații.....	97
15. Efectele Epigallocatehinei-3-Galat: monoterapie versus combinații cu Menadionă.....	120
16. Concluzii.....	149
Bibliografie.....	156
Anexe	

INTRODUCERE

Doresc în introducere să aduc mulțumiri îndrumătorilor științifici și spirituali ai prezentei lucrări, Prof. Univ. Dr. Constanța Ganea și Prof. Univ. Dr. Irina Elena Băran, pentru oportunitatea de a mă forma într-un laborator de înaltă prestanță științifică, pentru susținerea și ajutorul necondiționat de care m-am bucurat de-a lungul anilor de cercetare doctorală.

Prezenta lucrare are ca scop principal testarea de noi abordări în terapia oncologică, arie ce ridică mereu noi probleme legate de rezistența la tratament și dezvoltarea de malignități secundare. Aceste efecte nedorite apar întrucât nu se elimină în întregime (pe cale apoptotică, preferabil) celulele expuse la agenți chimioterapici toxici administrați iatrogen. Celulele tumorale mutante, chimiorezistente sunt rezultatul apariției și transmiterii de mutații la nivelul ADN-ului. Miza este aceea de a reuși sensibilizarea celulelor canceroase la inducerea apoptozei, reducând astfel inflamația și alte complicații secundare chimioterapiei.

Noi tratamente farmacologice cu compuși care au demonstrat citotoxicitate selectivă pentru celulele canceroase și citoprotecție pentru țesuturile sănătoase sunt cele care ar putea crește eficacitatea terapiei, permițând scăderea dozei de chimioterapic. Se ameliorează astfel semnificativ paleta de efecte secundare. Plecând de la date publicate în literatura de specialitate, ne-am concentrat atenția pe substanțe a căror acțiune bivalentă este deja cunoscută (citoprotectoare, respectiv citotoxică în țesutul sănătos, respectiv tumoral).

Misiunea acestei lucrări a fost de a studia *in vitro* activitatea antitumorală a substanțelor mai sus menționate, în tratamente individuale sau în combinații, pentru a identifica acele asocieri cu potențial chimioterapeutic ridicat, care să poată fi testate clinic în viitorul terapiei oncologice. Au fost investigate mecanismele de acțiune la nivel celular și molecular ale acestor substanțe cu scopul stabilirii dozelor și a timpilor de tratament care ar putea genera un efect sinergic antiproliferativ în sistemul celular studiat. Pe lângă efectele antiproliferative și pro-apoptotice, ne-am preocupat de modificările induse în metabolismul mitocondrial și de mecanismele generatoare de stres oxidativ.

Un subcapitol al lucrării de față este dedicat fluorescenței celulare specifice emise de celulele tratate cu EGCG, cu ajutorul căreia - împreună cu date complementare - s-au emis ipoteze noi legate de mecanismul de acțiune al acestui polifenol, prin legarea la Complexul III al lanțului respirator mitocondrial.

Nu în ultimul rând, plecând de la rezultatele studiilor legate de citotoxicitatea doxorubicinei și a menadionei în modelul celular studiat, se remarcă în cazul celulelor anterior

tratate și incubate cu PI apariția unei populații distincte, care prezintă emisie crescută pe FL1, FS și SS, compatibilă cu celule în curs de fragmentare. Propunem astfel o metodă simplă de analiză multiparametrică a înregistrărilor de citometrie în flux, capabilă să recunoască întreaga populație de celule apoptotice (indiferent de momentul ciclului celular în care sunt surprinse de agentul chimioterapeutic) și să determine simultan pentru celulele non-apoptotice din probă distribuția pe fazele ciclului celular.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Leucemia acută limfoblastică (LAL) este un tip de leucemie acută, o boală malignă a celulelor hematopoietice, caracterizată prin proliferarea celulară necontrolată a limfoblaștilor, precursori imaturi ai celulelor B sau T aflați în diferite stadii ale ontogenezei. Are loc acumularea celulelor canceroase imature care prezintă capacitatea de a infiltra progresiv măduva osoasă hematogenă, concomitent cu descărcări blastice și invazia țesuturilor periferice.

Doxorubicina este un medicament antineoplazic eficient, utilizat cu succes în diferite tratamente ale cancerului, inclusiv leucemia acută limfoblastică. În ciuda cercetării intensive asupra citotoxicității sale, mecanismele responsabile pentru efectul antitumoral al acestui medicament nu sunt complet elucidate. DOX poate induce fie apoptoza, fie necroza în diferite linii celulare tumorale, în funcție de doza și durata tratamentului (Nakagawa ș.a., 2005). Fiind o antraciclină amfifilă, DOX difuzează cu ușurință în mediul intracelular și se intercalează în ADN, formând aducte ADN și inhibând topoizomeraza II (Băran, 2014). DOX se acumulează de asemenea în interiorul mitocondriilor, unde poate produce cantități considerabile de specii reactive de oxigen (SRO), proces ce determină, foarte probabil, cardiotoxicitatea recunoscută a acestui agent. Întrucât acest efect secundar sever al DOX poate debuta chiar și la intervale considerabile de la finalizarea chimioterapiei la pacienți cu remisiune completă (în special la copiii cu LAL), ar fi extrem de avantajos să se dezvolte terapii în care DOX să fie asociată cu compuși care să potențeze efectul antitumoral al antraciclinei, iar în celulele normale să exercite un efect citoprotector.

Alte două dintre limitările majore ale chimioterapiei se datorează dezvoltării cancerului secundar și a rezistenței la chimioterapie, puternic corelate cu incapacitatea de a activa apoptoza în toate celulele care au fost expuse la agenți genotoxici. Acest lucru a condus la investigarea unor abordări farmacologice noi, care să sensibilizeze celulele canceroase la inducerea apoptozei și care să reducă în acest fel răspunsul inflamator și eventualele complicații ale chimio- sau radioterapiei.

Un accent deosebit s-a pus în ultimele decenii pe efectele benefice ale flavonoizilor naturali. Între aceștia, quercetina, o componentă semnificativă a dietei zilnice, prezintă importante proprietăți antioxidante și anti-canceroase (Loke ș.a., 2008; Rice-Evans ș.a., 2003). La momentul actual este cunoscut faptul că inducerea morții celulare de către quercetină se face predominant prin apoptoză, în conjuncție cu reducerea nivelului de necroză, ceea ce poate reduce riscul inflamațiilor și complicațiilor posibile ale chimioterapiei (Gibellini ș.a., 2011;

Kanadaswami ș.a., 2005). Menadiona (vitamina K₃) induce stres oxidativ prin producerea unor cantități mari de superoxid prin ciclul redox la nivel mitocondrial sau prin reducerea la nivelul Complexului I al lanțului respirator mitocondrial (Carr ș.a., 2002; Jamison ș.a., 2001; Lamson ș.a., 2003). În sistemul celular Jurkat, concentrațiile scăzute de menadionă induc apoptoza, în timp ce dozele crescute (≥ 10 microM) au efecte citotoxice. Toxicitatea acestui agent a fost evaluată în studii clinice cu administrare intravenoasă, iar studii *in vivo* au arătat că MD este un chimio- și un radio-sensibilizator eficient. Este recunoscut faptul că efectele apoptogene ale QC și MD sunt mediate de creșterea nivelului citosolic de Ca²⁺, deschiderea porilor mitocondriali de tranziție a permeabilității, anularea potențialului transmembranar mitocondrial și eliberarea citocromului *c* din mitocondrii.

Epigallocatehina galată (EGCG) este un polifenol conținut în anumite plante și alimente (în special în ceaiul verde *Camellia sinensis*) cu numeroase proprietăți farmacologice, între care le remarcăm pe cele antioxidante, antibacteriene, antimutagenice, antiresorbtive, și nu în ultimul rând, antitumorale. Plecând de la observația că celulele tumorale sunt mai sensibile la acțiunea EGCG comparativ cu cele integre (Chen ș.a., 1998; Tao ș.a., 2013), acest compus polifenolic a fost utilizat cu succes în prevenirea precum și în tratamentul a numeroase tipuri de cancer. Mai mult decât atât, studii *in vitro* au demonstrat interacțiuni de tip aditiv sau sinergic între EGCG și alte chimioterapice precum erlotinib, capecitabină, docetaxel și gemcitabină (Amin ș.a., 2009; Stearns ș.a., 2011; Volta ș.a., 2013). Interferența cu mecanismele celulare se face în special prin intermediul caracterului pro- sau antioxidant al EGCG, în funcție de doză (Scalbert ș.a., 2005). Anihilarea speciilor reactive de oxigen sau azot și complexarea cu metale bivalente precum Fe sau Cu validează comportamentul său antioxidant (Scalbert ș.a., 2005), dar în prezența Fe sau Cu, EGCG poate să sufere procese de oxidare a grupărilor fenolice din compoziția sa, generând specii reactive de oxigen (Oquadid-Ahidouch ș.a., 2000).

CONTRIBUȚII PERSONALE

Material și metodă

Culturi celulare

Pentru experimentele prezentei lucrări au fost cultivați limfoblaști umani Jurkat (limfocite T de leucemie acută limfoblastică, clona E6.1 din ATCC). Culturile de celule Jurkat au fost propagate în mediu RPMI 1640 conținând GLUTAMAX-I și HEPES, suplimentat cu 10% FBS, 100 unități/ml penicilină și 100 mg/ml streptomicină, fiind menținute în incubator la 37°C, într-o atmosferă cu 5% CO₂.

Pentru măsurarea densității, viabilității și a morfologiei celulelor s-a utilizat o cameră CCD Logitech QuickCam Pro 4000, conectată la un microscop Olympus CK30 cu contrast de fază. Metoda excluderii cu albastru de tripan a stabilit viabilitatea celulelor. Concentrația celulelor în diferite probe precum și volumul celular mediu au fost măsurate cu ajutorul Countess Automated Cell Counter (Invitrogen).

Pentru caracterizarea efectelor combinațiilor DOX/QC/MD/EGCG în limfoblaști umani leucemici de tip Jurkat, suspensiile celulare Jurkat au fost expuse la combinațiile de DOX și/sau QC și/sau MD și/sau EGCG la dozele indicate pe duratele specificate, apoi au fost investigate pentru evaluarea efectelor biologice.

Supraviețuire celulară clonogenă

După tratamentele efectuate, celulele au fost spălate de două ori cu PBS cald, resuspendate în mediu proaspăt și cald, numărate cu ajutorul Countess Automated Cell Counter (Invitrogen) și distribuite în plăci cu 96 de godeuri, cu o densitate de 3-6 celule/100 μl mediu complet/godeu. După o perioadă de 3-4 săptămâni în care celulele au fost păstrate în incubator, plăcile au fost examinate la microscopul cu contrast de fază. Au fost numărate acele godeuri în care au existat colonii cu minim 50 celule. Eficiența de cultivare a fost calculată ca fiind $[ln 96/(nr. godeuri negative)]/(densitatea celulară) \times 100$ (Băran ș.a., 2010; Băran ș.a., 2011). Supraviețuirea celulară clonogenă s-a determinat ca raport între eficiența de cultivare a celulelor tratate și cea a probei control (celule netratate cu substanța activă, ci cu solventul în care a fost dizolvată aceasta, în aceeași proporție volumică).

Citometrie în flux

Pentru determinarea *apoptozei/necrozei*, $\sim 1 \times 10^6$ celule au fost tratate cu DOX ± QC ± MD ± EGCG. După tratamente, celulele au fost spălate de două ori cu PBS și colorate cu

Anexină V-FITC (Pharmingen) și PI (Pharmingen), corespunzător indicațiilor producătorului. Probele au fost analizate imediat la citometrul Beckman Coulter Gallios. Emisia a fost înregistrată pe FL1 (525/40 nm) pentru Anexină V-FITC și pe FL3 (620/30 nm) pentru PI. Celulele negative atât pentru Anexină V-FITC (detectează externalizarea fosfatidilserinei în celulele apoptotice) cât și pentru PI, au fost considerate celule viabile, cele pozitive pentru Anexină V-FITC și negative pentru PI au fost considerate ca fiind celule aflate în apoptoză timpurie, iar cele pozitive pentru ambii fluorocromi au fost considerate ca fiind aflate în fază de apoptoză/necroză târzie.

Pentru determinări ale *fracțiilor celulare în diferitele faze ale ciclului celular*, probe conținând 10^6 celule, tratate în prealabil, au fost incubate timp de 30 min. în soluție tampon conținând PI/RNA-ză (Pharmingen), în care s-a dizolvat în prealabil Triton X-100 (0.1%) și digitonină (25 μ M). Probele au fost apoi spălate cu PBS, incubate cu iodură de propidiu (PI) pentru 15 min. la întuneric și la temperatura camerei, apoi au fost analizate cu citometrul în flux Beckman Coulter Gallios. Emisia a fost înregistrată pe FL3 (620/30 nm), acumulând cel puțin 10000 de evenimente pentru fiecare probă. Apoptoza a fost evaluată ca fracția celulelor hipodiploide (fracția sub- G_0/G_1). Frațiile G_0/G_1 , S și G_2/M au fost calculate pentru populația celulelor non-apoptotice, prin excluderea evenimentelor hipodiploide din analiza ciclului celular.

Pentru determinările de *polarizare mitocondrială*, JC-1 (1 μ g/ml) a fost adăugat în suspensia de celule în ultimele 20 minute ale tratamentului indicat, apoi celulele au fost spălate de două ori cu SS cald, colorate cu AnnV-APC potrivit instrucțiunilor producătorului și analizate la citometrul Beckman Coulter Gallios. Maximele de emisie ale JC-1 corespunzătoare lungimilor de undă pentru roșu și verde au fost înregistrate pe FL1 (525/40 nm) și FL3 (620/30 nm), după excitație la 488 nm. Maximul de emisie al AnnV-APC a fost detectat pe FL6 (660/20 nm), după excitație la 638 nm.

Pentru evaluarea *stresului oxidativ*, celulele au fost spălate cu SS, resuspendate în SS conținând 0.5 μ M CM- H_2 DCFDA și incubate timp de 10 minute, la 37°C în întuneric. Celulele au fost apoi centrifugate și resuspendate în 0.1 ml SS conținând 7-AAD. După incubare timp de 15 minute la temperatura camerei, în întuneric, probele au fost diluate cu 0.4 ml SS și măsurate imediat la citometru. Emisiile CM- H_2 DCFDA și 7-AAD au fost înregistrate pe FL1 (525/40 nm) și FL4 (675/20 nm).

Spectrofluorimetrie

Suspensia de celule netratate, cu volumul de 1.5 ml și cu densitatea de 10^6 celule/ml, a fost transferată într-o cuvetă de cuarț, la o temperatură constantă de 37°C , sub agitare continuă. Pentru măsurarea efectelor biologice urmărite s-a folosit spectrofluorimetrul Horiba Jobin Yvon, prevăzut cu două monocromatoare. Primele 5 minute ale tuturor experimentelor au vizat atingerea echilibrului termic al probei. Timpul de integrare la înregistrarea spectrelor individuale a fost de 0.1 s, respectiv 0.01 s pentru date în modul cinetic. Concentrația NADH și starea de polarizare a membranei mitocondriale au fost întotdeauna investigate împreună, pentru aceleași probe.

Pentru explorarea *polarizării mitocondriale*, JC-1 (1 $\mu\text{g/ml}$) a fost adăugat în suspensia de celule în ultimele 20 minute ale tratamentului indicat, apoi celulele au fost spălate de două ori cu PBS cald și transferate la spectrofluorimetru. Excitarea celulelor s-a făcut la 490 nm, înregistrându-se câte trei spectre de emisie pentru fiecare probă. Nivelul polarizării mitocondriale a fost evaluat ca raport între două fluorescențe, F594/F534 (fluorescența emisă de JC-1 la 594 nm, respectiv 534 nm), ulterior normalizat la raportul F594/F534 obținut pentru proba control (Băran ș.a., 2013).

Pentru determinarea *concentrației de NADH mitocondrial*, excitația probei s-a făcut la 340 nm, iar spectrele au fost colectate în triplu exemplar. Concentrația de NADH mitocondrial, $[\text{NADH}]_m$, a fost evaluată ca raport între fluorescența emisă la 450 nm și cea emisă la 374 nm. Raportul astfel obținut a fost ulterior normalizat la raportul F450/F374 obținut pentru proba control (Băran ș.a., 2013).

Pentru evaluarea *stresului oxidativ*, celulele au fost spălate cu SS cald, resuspendate (prin aspirarea supernatantului cu pipeta Pasteur) în SS conținând 0.5 μM CM- H_2DCFDA și incubate timp de 10 minute, la 37°C în întuneric. Excitarea celulelor s-a făcut la 490 nm, înregistrându-se câte trei spectre de emisie pentru fiecare probă, iar stresul oxidativ a fost evaluat ca fluorescența emisă de CM- H_2DCFDA la 522 nm.

Pentru înregistrările cinetice, probele au fost excitate la fiecare 20 s, cu următorii parametri de excitație/emisie: 490 nm/522 nm pentru CM- H_2DCFDA și 340 nm/450 nm pentru NADH. La momentele de timp indicate, agenții investigați (EGCG sau MD) au fost adăugați direct în suspensiile de celule, fără întreruperea înregistrărilor (Băran ș.a., 2013).

Pentru *determinarea concentrației mitocondriale de Ca^{2+}* ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) a fost necesară prepararea Dihidro-Rhod-2 (DiH-Rhod-2) prin adăugarea de NaBH_4 dizolvat în metanol peste soluția stoc de Rhod-2/AM, chiar înaintea utilizării. Celulele au fost spălate de două ori cu SS cald, tratate cu 6 μM DiH-Rhod-2, apoi păstrate timp de 20 minute în incubator. După alte două

spălări, probele au fost resuspendate în SS cald, ajustate la concentrația de $5-10 \times 10^6$ celule/ml, incubate pentru 10 minute la 37°C și apoi măsurate cu ajutorul spectrofluorimetrului. Pentru evaluarea fluorescenței DiH-Rhod-2, excitația s-a făcut la lungimea de undă de 552 nm, spectrele de emisie au fost culese la 577 nm. După 7 minute de înregistrare continuă, în suspensia de celule s-a adăugat EGCG în concentrațiile indicate (respectiv DMSO în proba control). În vederea obținerii fluorescenței maxime, după alte 10 minute de înregistrare, s-a adăugat treptat Triton X-100 (TriX) în probe, începând cu concentrația de 1 % și culminând cu 3-4 %.

Pentru caracterizarea *fluorescenței celulare induse de EGCG*, spectrele au fost culese succesiv, cu frecvența de aproximativ unul pe minut. Fiecare înregistrare a cuprins un spectru de emisie, după excitație la 365 nm și un spectru de excitație cu emisia la 390 nm. Curbele obținute au fost corectate pentru semnalul de fond și autofluorescență, apoi exprimate ca sumă a trei funcții gaussiene. Valorile corespunzătoare cuplului excitație/emisie 365 nm/460 nm au fost considerate ca fiind efectul NADH celular. Celelalte două funcții corespunzătoare cuplurilor excitație/emisie 330 nm/390 nm și 350 nm/390 nm au fost în continuare analizate în vederea caracterizării componentelor principale ale fluorescenței induse de EGCG. Două cicluri (fiecare constituit din două înregistrări de spectre) au fost înregistrate după adăugarea de substanțe, după cum urmează. Primul ciclu de măsurători s-a efectuat pe celule netratate, iar al doilea după adăugarea de CsA, AM sau ROT. În cadrul fiecărui ciclu de măsurători, EGCG a fost adăugat în doze succesive, până la atingerea concentrației țintă dorite ($700 \mu\text{M}$ la final). Ulterior, a urmat adăugarea de DNP sau TriX. Pentru date suplimentare, s-au efectuat înregistrări în continuarea adăugării de EGTA, HCl sau NaOH.

Statistică

Analiza datelor a fost realizată cu ajutorul software-ului WinMDI 2.9, iar fitarea datelor cu ajutorul programului Origin, versiunea 7.5. Testarea statistică de semnificație a fost realizată folosind Testul Student T. S-a considerat semnificativă valoarea pentru $p < 0.05$. Rezultatele sunt exprimate sub formă de valoare medie +/- deviație standard și au fost obținute în urma a minimum 3 măsurători desfășurate conform metodologiei prezentate.

Efectele Doxorubicinei : tratamente combinate cu Quercetină și/sau Menadionă

Prima parte a lucrării de față s-a concentrat pe studii *in vitro* de investigare a potențialului chemoterapeutic, a efectelor celulare și mecanismelor de acțiune ale doxorubicinei (DOX) administrată sub formă de monotratement sau în combinație cu quercetină (QC) și/sau menadionă (MD), doxorubicina fiind un medicament antitumoral utilizat cu succes în tratamentul leucemiei acute limfoblastice.

În acest scop, am utilizat limfoblaști umani Jurkat ca model de leucemie acută limfoblastică (LAL) umană și am urmărit în principal efectul antiproliferativ al doxorubicinei și potențarea acestuia de către tratamente cu QC și/sau MD în acest model, în limita parametrilor de tratament cu relevanță clinică (aplicând timpi de expunere specifici schemelor clinice de tratament și concentrații terapeutice ale agenților). După expunerea celulelor la dozele indicate de agenți antiproliferativi, au fost evaluate prin citometrie în flux viabilitatea celulară, apoptoza/necroza, distribuția ciclului celular, polarizarea mitocondrială și statusul oxidativ al celulelor.

Am urmărit să reducem dozele de QC și MD la valori comparative cu nivelurile terapeutice cunoscute, având în vedere și faptul că o administrare prelungită (de 48 h) permite reducerea nivelului plasmatic de doxorubicină în schemele clinice de tratament, cu consecințe benefice pentru pacient. Utilizarea clinică a quercetinei este în prezent limitată de faptul că în schemele de administrare pe termen scurt acest flavonoid prezintă o biodisponibilitate scăzută în plasma sangvină, datorată metabolismului său caracteristic, foarte rapid. De asemenea, pentru a atinge parametrii necesari, care să susțină efectul antitumoral al menadionei și să asigure deci rezultate clinic pozitive, s-a dedus că sunt necesari timpi prelungiți de perfuzie, de 24-48 h.

Monotratementul cu DOX a indicat o creștere considerabilă a mortalității celulare observate la 45-48 h după spălări, comparativ cu rata evaluată imediat după tratament. Efectele citotoxice imediate sunt observate la concentrații >200 nM DOX și indică o dependență de doză bimodală și cooperativă. Combinând DOX cu QC și/sau MD la concentrații clinic relevante, viabilitatea celulară a fost redusă suplimentar, încă de la doze mici de DOX, la fel și gradul de cooperativitate al DOX.

Un grad ridicat de cooperativitate asociat cu efectul citotoxic al unei substanțe prezintă un risc consistent de afectare a țesutului sănătos într-un mod necontrolat, de aceea se dorește

asocierea cu agenți care să reducă acest risc. Acesta este un argument important pentru care combinația DOX:QC:MD, în condițiile de tratament prezentate mai sus, să fie propusă pentru introducerea în studii clinice în vederea elaborării unor scheme de terapeutice pentru leucemie.

Efectul citotoxic al doxorubicinei a fost asociat cu apoptoza, concentrații fiziologice de doxorubicină (~100 nM) inducând un procent considerabil de apoptoză timpurie după 45 h de tratament, confirmând și în acest model celular capacitatea sa pro-apoptotică. Adăugând QC și MD în doze cu semnificație clinică tratamentelor cu DOX, se remarcă creșterea ratei de apoptoză timpurie. Acest lucru conferă un avantaj cu potențial chimioterapeutic, comparativ cu o schemă monotratement.

Un efect relevant al expunerii la doxorubicină timp de 45 h constă în creșterea fracției celulare sub-G₀ și blocajul ciclului celular cu aspect bimodal. Astfel, la concentrații de 20-200 nM doxorubicina a oprit selectiv ciclul celular în faza G₂/M, probabil prin inhibarea topoizomerazei II și lezarea ADN-ului prin mecanisme oxidative. La concentrații de aproximativ 300 nM, DOX a reușit blocarea ciclului celular în faza S, mecanismele propuse fiind rupturi ale catenelor ADN și mutații de tip ATM (ataxie – teleangiectazie). Concentrații și mai mari de DOX au dus la creșterea progresivă a fracției de celule aflate în faza G₀/G₁.

Asocierea cu QC sau MD modulează blocajul ciclului celular indus de DOX, pe când adăugarea a 10 μM QC + 2 μM MD a crescut considerabil fracția de celule aflate în faza S (atingând un maxim de 63%, comparativ cu valoarea de 32% obținută la control) și a scăzut semnificativ fracția de celule G₂/M la doze > 300 nM DOX. Combinația 10 μM QC + 5 μM MD a indus blocaj în G₂/M în prezența unui nivel de 40-70 nM DOX și blocaj în faza S în asociere cu > 200 nM DOX.

DOX la doze clinice semnificative induce stres oxidativ la nivel celular, acest fenomen fiind puternic amplificat de MD (10-15 μM). Quercetina are un comportament dual, fiind cu precădere antioxidantă când este adăugată celulelor sănătoase și demonstrând un efect major pro-oxidant în celule tumorale. Această caracteristică a sa ar putea să prevină alterarea celulelor sănătoase sub acțiunea DOX, de exemplu cardiotoxicitatea indusă de aceasta.

În concluzie, datele prezentului studiu demonstrează că doxorubicina scade viabilitatea celulară, induce apoptoza, blocajul ciclului celular și stres oxidativ în modelul celular Jurkat într-o manieră dependentă de doză. Prin combinarea DOX cu QC și MD se exercită un efect antiproliferativ sinergic, fapt ce permite reducerea dozelor de doxorubicină. Din acest motiv, sunt încurajate studii viitoare pentru testarea utilității clinice a acestei combinații în terapia leucemiei acute limfoblastice.

Analiza ciclului celular – optimizare și corelații

Plecând de la rezultatele studiilor legate de citotoxicitatea doxorubicinei, quercetinei și a menadionei în modelul celular studiat, se remarcă apariția unei populații distincte, care prezintă emisie crescută pe FL1, FS și SS, compatibilă cu celule în curs de fragmentare. Propunem astfel o metodă simplă de analiză multiparametrică a înregistrărilor de citometrie în flux, capabilă să recunoască întreaga populație de celule apoptotice (celule cu ADN fragmentat, ce includ fracțiile sub-G₀/G₁, sub-S și sub-G₂/M) și să determine simultan pentru celulele non-apoptotice din probă distribuția pe fazele ciclului celular. Celulele Jurkat au fost anterior tratate, apoi marcate cu PI dizolvată într-o soluție tampon de PI/RNA-ză îmbogățită cu Triton X-100 și digitonină.

Este de menționat că utilizând aceeași metodă, în urma a multiple tratamente diferite cu DOX-QC, DOX-MD, DOX-QC-MD, se observă o corelație similară, foarte puternică, între fracția de celule cu ADN în curs de fragmentare (excluse din analiza ciclului celular) și fracția de celule apoptotice determinată separat, prin marcarea celulelor cu AnnV/PI. În toate aceste cazuri, coeficientul de corelație Pearson a avut valori de peste 0.98.

Utilizând exclusiv graficele FL3/FS, fără a ține cont de datele FL3/SS și FL3/FL1, se pot reproduce cu ușurință rezultatele cantitative care descriu distribuția celulelor pe faze ale ciclului celular. Acest lucru ar scădea doza maximă de agent chimioterapic care se poate administra în suspensia celulară, doză pentru care analiza ciclului celular este încă posibilă. Chiar și așa, intervalul concentrațiilor ce se pot administra este mai larg decât cel utilizabil într-o analiză convențională bazată pe hipodiploidie aparentă (ce consideră doar evenimentele cu conținut de ADN < 2 n).

De exemplu, histogramele PI neprelucrate prezintă distorsiuni ale formei la concentrații ale DOX care depășesc 100 nM, așa încât ele nu pot fi analizate cu ajutorul metodei convenționale. Dacă aplicăm însă filtrul care se bazează pe graficul FL3/FS ca unic criteriu de discriminare pentru evenimentele care implică pierderea de material genetic, se poate extinde limita superioară a dozei de DOX până la valori ce ating 500-1000 nM.

Considerând că suprapunerea spectrală este redusă, am verificat dacă înregistrarea datelor pe FL10 (excitarea probelor a avut loc la 405 nm, iar emisia a fost înregistrată în intervalul 450/40 nm) aduce informații suplimentare. Datele obținute au fost similare înregistrării pe FL1, fără a se observa particularități suplimentare.

Având toate aceste rezultate, se impun studii ulterioare comparative cu tehnici standard, care să valideze această metodă și să o verifice pe linii celulare diferite. Primele propuse ar fi metodele TUNEL (Gorczyca ș.a., 1993) și FLICA (Bedner ș.a., 2000), întrucât acestea pot identifica cu succes rupturi ale lanțurilor de ADN prin marcarea directă cu dUTP, încă din stadiile precoce ale apoptozei (Gorczyca ș.a., 1993) și activarea caspazelor prin marcarea cu inhibitori ai acestora legați de molecule fluorocrome (Bedner ș.a., 2000).

Întrucât fixarea celulelor urmată de permeabilizarea membranelor celulare este o etapă obligatorie a tehnicii TUNEL și opțională pentru metoda FLICA, marcarea suplimentară cu PI poate fi combinată cu oricare dintre cele două tehnici cu scopul de a evalua prin citometrie în flux conținutul de ADN celular. Metoda propusă în studiul de față (marcarea cu PI) prezintă avantaje practice precum rapiditate și simplitate, tehnica în sine nefiind sofisticată sau greu de executat. Tehnicile alternative precum TUNEL sau FLICA presupun mai mulți pași și sunt mai elaborate, întrucât presupun folosirea mai multor indicatori de fluorescență. Acest lucru poate impacta afinitatea, specificitatea și caracteristicile spectrale ale moleculelor fluorescente care se leagă de țintele lor moleculare.

În concluzie, metoda propusă în studiul de față poate diferenția celulele care au părăsit ciclul celular într-o manieră foarte accesibilă, prin simpla marcarea a probelor cu PI. În plus, se disting subfracțiile celulare care au luat-o pe drumul apoptotic părăsind ciclul celular din fiecare dintre etapele sale. Aceste informații ar putea fi de un real beneficiu pentru investigațiile clinice care studiază cantitatea de ADN celular sau răspunsul ciclului celular în urma administrării a diferite tratamente.

Efectele Epigallocatehinei-3-Galat: monoterapie versus combinații cu Menadionă

În ultima sa parte, lucrarea de față a reușit să completeze profilul citotoxic al EGCG în sistemul celular Jurkat, folosind tehnica supraviețuirii celulare clonogene, înregistrări de citometrie în flux și de spectrofluorimetrie. Tratamentele de durată scurtă (1 h) reușesc să scadă viabilitatea celulelor într-o manieră dependentă de doză, prin implicarea a trei molecule de EGCG ce interacționează cooperativ. Indexul combinatorial obținut în urma studiilor de supraviețuire clonogenă (0.3–0.6) demonstrează îmbunătățirea efectului antiproliferativ al EGCG de către menadionă în mod sinergic. Înregistrările de citometrie în flux pe celule marcate cu AnnV și PI sugerează că efectul citotoxic al EGCG administrat în monoterapie sau în combinație cu MD este însoțit de apoptoză.

Dacă după expunerea celulelor timp de o oră la EGCG, polifenolul are efecte antioxidante, după îndepărtarea sa din suspensia celulară este stimulat un mecanism generator de stres oxidativ. În paralel, EGCG induce depolarizarea precoce a membranei mitocondriale în timpul expunerii, însă în ora care succede spălarea probelor membrana mitocondrială devine hiperpolarizată, efect durabil în timp.

Caracterul cooperativ al EGCG se poate observa și legat de efectul imediat de depolarizare a membranei mitocondriale, prezența MD amplificându-l de la două molecule la patru molecule de EGCG care conlucrează în acest scop. Dacă în absența MD generarea de SRO părea să se datoreze interacțiunii dintre o moleculă de EGCG cu ținta sa celulară (insensibilă la MD), tratamentele combinate au stimulat un mecanism pro-oxidant suplimentar, ce presupune cooperativitate între patru molecule de EGCG. Mai mult decât atât, se pare că EGCG și MD interacționează sinergic pentru a activa această nouă "sursă" de SRO.

În condițiile de lucru propuse în studiul de față, EGCG a reușit să scadă, tot într-o manieră cooperativă și dependentă de doză, concentrația mitocondrială de calciu. Parametrii care caracterizează cantitativ acest efect (IC_{50} , coeficientul Hill) sunt similari celor obținuți în urma studiilor de supraviețuire clonogenă, fapt ce în contextul actual sugerează că efectul antiproliferativ al EGCG poate fi mediat de alterarea homeostaziei calciului (mitochondrial mai ales) în sistemul celular studiat. La analiza atentă a datelor se constată, fără a confirma o relație de tip cauză – efect, corelații importante între efectul citotoxic al EGCG și disfuncția mitocondrială indusă, respectiv generarea de stress oxidativ. Este nevoie de studii suplimentare care să confirme aceste ipoteze.

Totuși, plecând de la parametrii cantitativi obținuți (IC_{50} , coeficientul Hill) corobați cu coeficienții Pearson rezultați în urma analizei corelației între seturile de date, putem deduce că moartea celulară în celulele Jurkat este puternic corelată cu scăderea promptă a nivelului de calciu mitocondrial, care a persistat cel puțin două ore după expunere și care este independentă de generarea de stress oxidativ sau de modificarea stării de polarizare a membranei mitocondriale, cu stresul oxidativ ce apare la cel puțin 2 h după adăugarea agentului în suspensia celulară, cu colapsul mitocondriei, identificabil în timpul expunerii și persistent pe perioada tratamentelor de lungă durată, cu creșterea rapidă a nivelului de NADH, probabil prin inhibarea Complexului III al lanțului respirator și nu în ultimul rând cu creșterea fluorescenței celulare F350 în paralel cu variația concentrației de NADH (lungimea de undă pentru excitație a fost 350 nm, iar pentru emisie 400 nm).

Antimicina A împreună cu EGCG au indus aceeași fluorescență celulară, având emisia la 400 nm și două benzi de excitație la 330 nm și 350 nm, efect care nu a fost observat după expunerea celulelor la alte substanțe, precum ar fi: rotenon, quercetină, menadionă, 2,4-dinitrofenol, dantrolen, rianodină, cafeină, ionomicină sau doxorubicină. Se pare că structurile care emit fluorescența descrisă mai sus sunt cel mai probabil variante conformaționale sau stări energetice diferite ale aceleiași macromolecule ce aparține unui organit intracelular și care este sensibilă la CsA, calciu și la modificări de pH. Cele două stări sunt asociate cu maxime ale spectrelor de excitație la 330 nm și 350 nm și se pare că expun două, respectiv un situs de legare pentru EGCG, în primul caz cele două situsuri având efecte diferite (stimulatoare, respectiv inhibitoare) asupra emisieii fluorescenței celulare descrise.

Coroborând toate rezultatele, ne putem gândi că fluorescența celulară specifică detectată după incubarea celulelor Jurkat cu EGCG și AM poate proveni dintr-un supercomplex mitocondrial, alcătuit din dimerul Complexului III și dimerul ATP-sintazei, reprezentând un instrument valoros pentru a caracteriza proprietățile funcționale ale lanțului respirator mitocondrial. EGCG pare să fie un inhibitor direct al respirației celulare în modelul studiat, dar sunt necesare experimente viitoare care să caracterizeze acest efect și mai ales să confirme această legătură funcțională dintre EGCG și Complexul III al lanțului respirator.

Concluzia certă care se desprinde din lucrarea de față afirmă că tratamentele combinate cu EGCG – MD (concentrații moderate 10 μ M EGCG, 10 μ M MD, durate cuprinse între 6 și 48 h) sunt capabile să scadă semnificativ viabilitatea celulară în modelul celular studiat, proces însoțit de o rată importantă de apoptoză. Rămâne de investigat dacă acest efect al tratamentului este reglat diferit în celulele normale comparativ cu cele canceroase, astfel încât acesta să poată fi adresat aplicațiilor clinice. Datorită toxicității remarcate la administrarea continuă timp de

24–48 h, trebuie stabilită cu prudență fereastra terapeutică pentru a evita efecte secundare nedorite.

Se pare că administrarea EGCG prin intermediul lipozomilor sau a nanocapsulelor este asociată cu îmbunătățirea absorbției intestinale a polifenolului, permițând reducerea de până la de 10 ori a dozei, cu păstrarea eficacității efectului antitumoral (Chow ș.a., 2005; Luo ș.a., 2014; Siddiqui ș.a., 2014). Utilizând această formulă de administrare, concentrația de EGCG liber în plasmă necesară pentru efecte echivalente este semnificativ mai mică, întrucât nivelul de care este nevoie intracelular este atins prin fuziunea transportorului moleculei de EGCG cu membrana celulară a celulei țintă.

Rezultatele obținute în studiul de față dezvăluie noi aspecte legate de mecanismele de acțiune ale EGCG și ale combinației sale cu MD în modelul celular Jurkat și invită la experimente ulterioare menite să aprofundeze potențialul chimioterapeutic al combinației EGCG-MD pe modele diferite *in vitro* sau/și pe modele animale.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

În continuare sunt menționate o serie de articole publicate în reviste cotate ISI și BDI, precum și lucrări prezentate la conferințe, în care autorul acestei lucrări este regăsit drept autor principal sau coautor.

Articole în reviste cotate ISI:

1. Babeș R*, **Tofolean IT***, Sandu RG, Băran OE, Coșoreanu V, Ilie MT, Duță AI, Ceașescu MC, Ciucur PM, Costache S, Ganea C, Băran I. 2018. *Simple discrimination of sub-cycling cells by propidium iodide flow cytometric assay in Jurkat cell samples with extensive DNA fragmentation. CELL CYCLE 17(6): 766-779. IF 3.53 (* autori cu contribuție egală) <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1426415> - autor principal.*

2. **Tofolean IT**, Ganea C, Ionescu D, Filippi A, Garaiman A, Goicea A, Gaman MA, Dimancea A, Băran I. 2016. *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 103: 300-17. IF 4.408 <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.12.013> - autor principal.*

3. Băran I, Ionescu D, Filippi A, Mocanu MM, Iftime A, Babeș R, **Tofolean IT**, Irimia R, Goicea A, Popescu V, Dimancea A, Neagu A, Ganea C. 2014. *Novel insights into the antiproliferative effects and synergism of Quercetin and Menadione in human leukemia Jurkat T cells. LEUKEMIA RESEARCH 38(7): 836-849. IF 2.764 <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2014.04.010>*

Articole în reviste cotate BDI:

4. Irimia R*, **Tofolean IT***, Sandu RG, Băran OE, Ceașescu MC, Coșoreanu V, Ilie MT, Babeș R, Ganea C, Băran I. 2015. *Quercetin, Menadione, Doxorubicin combination as a potential alternative to Doxorubicin monotherapy of acute lymphoblastic leukemia. DOCUMENTA HAEMATOLOGICA 34(1-2): 52-61, ISSN 1582-196X (* autori cu contribuție egală) <https://doi.org/10.1515/dch-2015-0005> - autor principal.*

Lucrări științifice prezentate la conferințe naționale:

1. Ceașescu MC, Băran OE, **Tofolean IT**, Băran I. "*Efectul amplificator al combinației quercetină/menadionă asupra citotoxicității doxorubicinei în celulele leucemice Jurkat prin inducerea stresului oxidativ, apoptozei și blocarea ciclului celular*", Prezentare orală, Congresul Național pentru Studenți și Tineri Medici, Ediția a XIX-a, 10 - 13 Decembrie 2015, București

Lucrări științifice prezentate la conferințe internaționale:

2. Babeș R, **Tofolean IT**, Ciucur PM, Ganea C, Băran I. "*Quercetin - menadione combinations modulate the chemotherapeutic effect of doxorubicin in Jurkat T-cells*", Poster, International Summer School and Joint Symposium on Flow Cytometry, 6 - 9 Iunie 2017, București, România, abstract publicat în Book of Abstracts, Page: 24, 2017, ISBN: 978-606-93974-4-2, distins cu Premiul al II-lea

3. Băran OE, **Tofolean IT**, Ceașescu MC, Ganea C. "*Analysis of convergent effects of doxorubicin, quercetin and menadione in treatments of human leukemia Jurkat T cells*", Poster, World Cancer Conference, 26 - 28 Septembrie 2016, Londra, Marea Britanie, abstract publicat în Journal of Cancer Science and Therapy, Volume: 8, Supplement: 9, Page: 73, 2016, ISSN: 1948-5956

4. Coșoreanu V, **Tofolean IT**, Babeș R, Băran I. "Cytotoxic effects of Doxorubicin on human leukemia Jurkat cells: Drug interactions with quercetin", Poster, World Cancer Conference, 26 - 28 Septembrie 2016, Londra, Marea Britanie, abstract publicat în Journal of Cancer Science and Therapy, Volume: 8, Supplement: 9, Page: 74, 2016, ISSN: 1948-5956

5. Ilie TM, **Tofolean IT**, Babeș R, Băran I. "*Cytotoxic effect of Doxorubicin/Menadione combination on human leukemia Jurkat cells*", Poster, World Cancer Conference, 26 - 28 Septembrie 2016, Londra, Marea Britanie, abstract publicat în Journal of Cancer Science and Therapy, Volume: 8, Supplement: 9, Page: 75, 2016, ISSN: 1948-5956

6. **Tofolean IT**, Ganea C, Babeș R, Băran I. "*Modulation of the chemotherapeutic potential of doxorubicin by quercetin-menadione combinations in human leukemia Jurkat cells*", Poster, Conferința internațională "From Science to Guidance and Practice", 19 - 21 Octombrie 2015,

București, România, abstract publicat *in extenso* în Cartea de abstracte, ISBN: 978-973-708-854-3

7. Sandu RG, **Tofolean IT**, Ganea C, Băran I. "*Enhancement of the antiproliferative effect of doxorubicin by quercetin-menadione combinations in human leukemia Jurkat cells*", Poster, The EMBO Meeting, Ediția a VI-a, 5 - 8 Septembrie 2015, Birmingham, Anglia

8. Garaiman A, **Tofolean IT**, Ganea C, Băran I. "*Synergic antiproliferative effect of Epigallocatechine-3-gallate and menadione in human leukemia Jurkat T cells*", Poster, 5th Lower Saxony International Summer Academy (LISA) in Immunology, 15 - 30 August 2015, Hanovra, Germania

9. Băran OE, **Tofolean IT**, Irimia R, Băran I, Ganea C. "*Antiproliferative effect of doxorubicin/quercetin/menadione combination in leukemia Jurkat T cells*", Poster, Congresul European de Biofizică, Ediția a 10-a, 18 - 22 Iulie 2015, Dresda, Germania

10. Ilie TM, **Tofolean IT**, Ganea C, Dimancea A, Băran I. "*Chemotherapeutic potential of the doxorubicin/menadione combination in a human leukemia cell model*", Poster, Congresul European de Biofizică, Ediția a 10-a, 18 - 22 Iulie 2015, Dresda, Germania

11. Coșoreanu V, **Tofolean IT**, Ganea C, Goicea A, Băran I. "*Growth-suppressive action of doxorubicin on human leukemia Jurkat cells. Modulation by quercetin*", Poster, Congresul European de Biofizică, Ediția a 10-a, 18 - 22 Iulie 2015, Dresda, Germania

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Amin AR, Khuri FR, Chen ZG, Shin DM. Synergistic growth inhibition of squamous cell carcinoma of the head and neck by erlotinib and epigallocatechin-3-gallate: the role of p53-dependent inhibition of nuclear factor-kappaB. *Cancer Prev. Res.* 2009; 2: 538–545.

Babeş R, Tofolean IT, Sandu RG, Băran OE, Coşoreanu V, Ilie MT, Duţă AI, Ceauşescu MC, Ciucur PM, Costache S, Ganea C, Băran I. Simple discrimination of sub-cycling cells by propidium iodide flow cytometric assay in Jurkat cell samples with extensive DNA fragmentation. *Cell cycle.* 2018; 17(6): 766-779.

Băran I, Ganea C, Scordino A, Musumeci F, Barresi F, Tudisco S et. al. Effects of menadione, hydrogen peroxide and quercetin on apoptosis and delayed luminescence of human leukemia Jurkat T-cells. *Cell Biochem Biophys.* 2010; 58(3): 169-79.

Băran I, Ganea C, Ursu I, Băran V, Călinescu O, Iftime A et. al. Fluorescence properties of quercetin in human leukemia Jurkat T-cells. *Rom Journ Phys.* 2011; 56(3-4): 388-98.

Băran I, Ionescu D, Filippi A, Mocanu MM, Iftime A, Babeş R, Tofolean IT, Irimia R, Goicea A, Popescu V, Dimancea A, Neagu A, Ganea C. Novel insights into the antiproliferative effects and synergism of quercetin and menadione in human leukemia Jurkat T cells. *Leuk Res.* 2014; 38(7): 836-49.

Băran I, Ionescu D, Privitera S, Scordino A, Mocanu MM, Musumeci F, Grasso R, Gulino M, Iftime A, Tofolean IT, Garaiman A, Goicea A, Irimia R, Dimancea A, Ganea C. Mitochondrial respiratory Complex I probed by delayed luminescence spectroscopy. *J. Biomed. Optics.* 2013; 18: 127006.

Băran I, Katona E, Ganea C. Quercetin as a fluorescent probe for the ryanodine receptor activity in Jurkat cells. *Pflugers Archiv.* 2013; 465(8): 1101-19.

Băran I. Gating Mechanisms of the Type-1 Inositol Trisphosphate Receptor. *Biophysical Journal.* 2005; 89: 979-998.

Băran I. Integrated Luminal and Cytosolic Aspects of the Calcium Release Control. *Biophysical Journal.* 2003; 84: 1470-1485.

Băran I. Proliferare celulară versus apoptoză. Mecanisme și particularități în condiții de stres genotoxic sau oxidativ, Ed. Universitară Carol Davila; 2014.

Bedner E, Smolewski P, Amstad P et al. Activation of caspases measured in situ by binding of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA): correlation with DNA fragmentation. *Exp Cell Res.* 2000; 259(1): 308–313.

Carr BI, Wang Z, Kar S. Vitamins, PTP antagonism and cell growth arrest. *J Cell Physiol.* 2002; 193(3): 263-74.

Chen ZP, Schell JB, Ho CT, Chen KY. Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Cancer Lett.* 1998; 129: 173–179.

Chow HH, Hakim IA, Vining DR et al. Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of Polyphenon E in healthy individuals. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 4627–4633.

Gibellini L, Pinti M, Nasi M, Montagna JP, De Biasi S, Roat E, Bertoncelli L, Cooper EL, Cossarizza A. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011; 2011: 591356.

Gorczyca W, Gong J, Ardelt B et al. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res.* 1993; 53(13): 3186–3192.

Irimia R, Tofolean IT, Sandu RG, Băran OE, Ceașescu MC, Coșoreanu V, Ilie MT, Babeș R, Ganea C, Băran I. Quercetin, Menadione, Doxorubicin combination as a potential alternative to Doxorubicin monotherapy of acute lymphoblastic leukemia. *DOCUMENTA HAEMATOLOGICA.* 2015; 34(1-2): 52-61.

Jamison JM, Gilloteaux J, Tarper HS, Summers JL. Evaluation of the in vitro and in vivo antitumor activities of vitamin C and K3 combinations against human prostate cancer. *J Nutr.* 2001; 131(1): 158S-160S.

Kanadaswami C, Lee L, Lee PH, Hwang J, Ke F, Huang Y, Lee M. The antitumor activities of flavonoids, in vivo. *Mutat Res.* 2000; 459(3): 211-8.

Lamson DW, Plaza SM. The anticancer effects of Vitamin K. *Altern Med Rev.* 2003; 8(3): 303-18.

Loke WM, Hodgson JM, Proudfoot JM, McKinley AJ, Puddley IB, Croft K. Pure dietary flavonoids Quercetin and (-)-epicatechin augment Nitric Oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88(4): 1018-25.

Luo X, Guan R, Chen X, Tao M, Ma J, Zhao J. Optimization on condition of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) nanoliposomes by response surface methodology and cellular uptake studies in Caco-2 cells. *Nanoscale Res. Lett.* 2014; 9: 291.

Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature.* 2005; 434(7033): 652–658.

Ouadid-Ahidouch H, Chaussade F, Roudbaraki M, Slomianny C, Dewailly E, Delcourt P, Prevarskaya N. KV1.1 K⁺ channels identification in human breast carcinoma cells: involvement in cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 278: 272–277.

Rice-Evans C, Packer L. *Flavonoids in Health and Disease*, Ed. a IX-a, Ed. Marcel Dekker, New York; 2003.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2005; 45: 287–306.

Siddiqui IA, Bharali DJ, Nihal M, Adhami VM, Khan N, Chamcheu JC, Khan MI, Shabana S, Mousa SA, Mukhtar H. Excellent anti-proliferative and pro-apoptotic effects of (–)-epigallocatechin-3-gallate encapsulated in chitosan nanoparticles on human melanoma cell growth both in vitro and in vivo. *Nanomedicine.* 2014; 10: 1619–1626.

Stearns ME, Wang M. Synergistic effects of the green tea extract epigallocatechin-3-gallate and taxane in eradication of malignant human prostate tumors. *Transl. Oncol.* 2011; 4: 147–156.

Tao L, Forester SC, Lambert JD. Pro-oxidant effects of the green tea catechin, (–)-epigallocatechin-3-gallate in oral cancer cells: a role for the mitochondria. *Cancer Res.* 2013; 73: 3667.

Tofolean IT, Ganea C, Ionescu D, Filippi A, Garaiman A, Goicea A, Gaman MA, Dimancea A, Băran I. 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. *Pharm. Res.* 2016. 103: 300-17.

Volta V, Ranzato E, Martinotti S, Gallo S, Russo MV, Mutti L, Burlando B. Preclinical demonstration of synergistic active nutrients/drug (AND) combination as a potential treatment for malignant pleural mesothelioma. *PLoS One.* 2013; 8: e58051.