

\*Robert Kubina

# Przeciwnowotworowy efekt kurkuminy oraz jej pochodnych w stosunku do komórek raka języka linii SCC-25\*\*

## Anticancer effect of curcumin and its derivatives against oral squamous carcinoma cells (SCC-25) *in vitro*

Katedra i Zakład Patologii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach  
Kierownik Katedry: dr hab. n. med. Barbara Stawiarska-Pięta

---

### SUMMARY

**Introduction.** In recent years, a significant increase in morbidity and mortality from cancer including head/neck region, have been seen. The present results indicate that the polyphenols may support standard chemotherapy of tumors. The beneficial effects demonstrated for the use of curcumin and its derivatives.

**Aim.** The aim of this study was to evaluate the cytotoxic and proapoptotic effect of curcumin and its derivatives on cell line squamous cell carcinoma of tongue SCC-25.

**Material and methods.** Cells were cultured as recommended by the manufacturer using DMEM:F12 (1:1) supplemented with 10% FBS serum, 400 ng/mL hydrocortisone and the addition of 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 0.25 µg/mL amphotericin B. In order to investigate cytotoxic activity of test compounds an MTT assay was used, in order to determine the potential proapoptotic activity flow cytometry using Annexin V assay Muse and Dead Cell assay kit was used.

**Results.** The values of  $IC_{50}$  amounted to 41.18 µM for curcumin, 36.67 µM for demetexycurcumin and 27.13 µM for bisdemetoxycurcumin after 24 hours of incubation of the cells. Cytometric analysis using Annexin V staining revealed that curcumin and its derivatives activate physiological cell death process.

**Conclusions.** The demonstrated cytotoxic and proapoptotic activity of curcumin and its derivatives was dependent on the dose and duration of exposure.

---

**Keywords:** tongue cancer, curcumin, cytotoxicity, apoptosis

---

### STRESZCZENIE

**Wstęp.** W ostatnich latach zaobserwowano znaczny wzrost zachorowalności oraz śmiertelności spowodowanej nowotworami złośliwymi, w tym rejonu głowy i szyi. Dotychczasowe wyniki wskazują, że polifenole mogą wspomagać standardową chemioterapię nowotworów. Korzystne działanie wykazano po zastosowaniu kurkuminy oraz jej pochodnych.

**Cel pracy.** Celem pracy była ocena cytotoksycznego oraz proapoptotycznego wpływu kurkuminy oraz jej pochodnych na komórki raka płaskonabłonkowego języka linii SCC-25.

**Material i metody.** Komórki hodowane były zgodnie z zaleceniami producenta przy użyciu podłoża DMEM:F12 (1:1) suplementowanego 10% surowicą FBS, 400 ng/ml hydrokortyzonu oraz dodatkiem 100 IU/ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny oraz 0,25 µg/ml amfoterycyny B. W celu zbadania aktywności cytotoksycznej badanych związków zastosowano test MTT, a w celu wyznaczenia potencjalnego działania proapoptotycznego zastosowano cytometrię przepływową z wykorzystaniem testu Muse Annexin V and Dead Cell Assay Kit.

**Wyniki.** Wyznaczone wartości  $IC_{50}$  wynosiły 41,18 µmol/L dla kurkuminy, 36,67 µmol/L dla demetoksykurkuminy oraz 27,13 µmol/L dla bisdemetoksykurkuminy po 24 godz. inkubacji komórek. Analiza cytometryczna z użyciem barwienia aneksyny V wykazała, że kurkumina i jej pochodne aktywują proces fizjologicznej śmierci komórek.

**Wnioski.** Wykazana aktywność cytotoksyczna oraz proapoptotyczna kurkuminy oraz jej pochodnych była zależna od dawki oraz czasu ekspozycji.

---

**Słowa kluczowe:** rak języka, kurkumina, cytotoksyczność, apoptoza

---

\*\*Badania były finansowane w ramach umowy dla młodych naukowców Nr KNW-2-004/N/5/N.

## Wprowadzenie

Większość nowotworów głowy i szyi oraz górnych dróg oddechowych to nowotwory pochodzenia płaskonabłonkowego. Raki płaskonabłonkowe regionu głowy i szyi zajmują szóste miejsce pod względem częstości występowania na świecie. Każdego roku wykrywanych jest 600 000 nowych przypadków tych raków i są one przyczyną 350 000 zgonów. Pod względem budowy histologicznej w około 95% występuje rak płaskonabłonkowy, zaś inne, takie jak rak brodawkowy, gruczolowy czy nabłonkowy występują znacznie rzadziej. Głównym czynnikiem powstawania nowotworów głowy i szyi, w tym raka języka, są powszechnie znane kancerogeny, wśród których największe znaczenie odgrywają substancje zawarte w dymie tytoniowym oraz wysokoprocentowe alkohole. Bardzo istotnymi z epidemiologicznego punktu widzenia czynnikami kancerogennymi są także higiena jamy ustnej oraz zakażenia wirusowe, takie jak zakażenie onkogennym typem wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV) oraz zakażenia wirusem Epsteina-Barr (EBV). Wirusowy czynnik etiologiczny odgrywa jednak istotną rolę w przypadku raka krtani oraz nosogardzieli.

Rak języka stanowi poważny problem zdrowotny w niektórych krajach Azji Południowo-Wschodniej. Rosnącą liczbę przypadków obserwuje się także w Stanach Zjednoczonych, lecz liczba zgonów jest tam ograniczona przede wszystkim poprzez szczególnie nacisk na wczesne wykrywanie tej choroby.

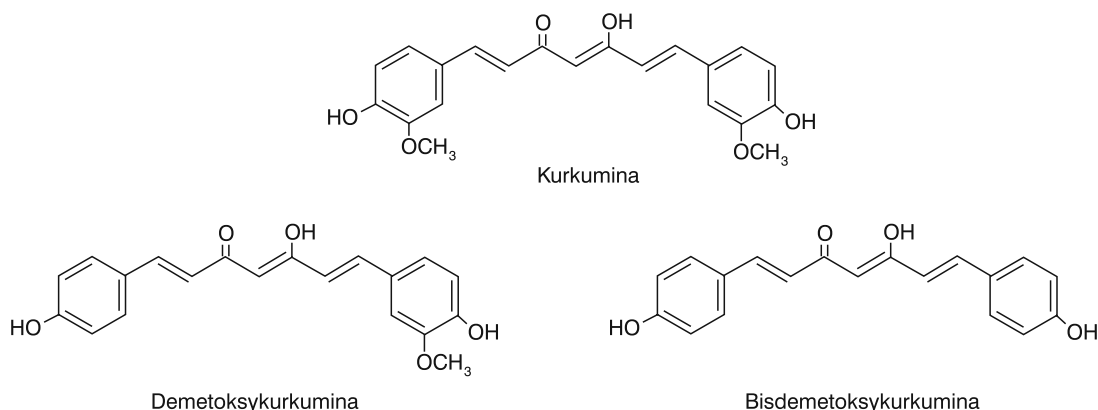
Dużym problemem klinicznym jest ograniczenie chemioterapii z powodu małej chemiowrażliwości tego typu nowotworów. Obecnie poszukuje się nowych związków pochodzenia naturalnego lub związków, które poddane modyfikacji chemicznej wykażą bardziej selektywną aktywność chemioterapeutyczną

lub które będą mogły wspomagać standardową chemioterapię (1-4).

Do związków tych możemy zaliczyć kurkuminy oraz jej pochodne (ryc. 1). Sproszkowana kurkuma jest substancją koloru żółtego i zawiera kurkuminoidy, w tym 77% kurkuminy, 17% demetoksykurkuminy i 3% bisdemetoksykurkuminy.

Kurkumina jest uważana za substancję pomocną w leczeniu wielu chorób, takich jak: nowotwory, choroby neurodegeneracyjne, choroby zakaźne oraz cukrzyca. Zastosowanie tego związku w leczeniu jest utrudnione ze względu na słabą rozpuszczalność w wodzie, nietrwałość w środowisku wodnym oraz niski wychwyty komórkowy (5-8).

Liczne badania potwierdzają, że kurkumina i jej pochodne wykazują działanie przeciwnowotworowe, przeciwutleniające oraz przeciwzapalne (7). Wśród wszystkich właściwości, jakimi cechuje się kurkumina, naukowcy szczególnie zwracają uwagę na wpływ kurkuminy na cykl komórkowy, powodowanie apoptozy oraz zahamowanie proliferacji i migracji komórek nowotworowych. W ostatnim czasie prowadzone są badania mające na celu możliwości wykorzystania kurkuminy oraz jej pochodnych do leczenia chorób proliferacyjnych i zespołów metabolicznych. Badania wskazują, że polifenol ten odznacza się różnorodną aktywnością biologiczną, jednak mechanizmy biochemiczne nie w pełni zostały poznane. Potwierdzono, że kurkumina może oddziaływać z różnymi białkami, np. z czynnikami transkrypcyjnymi, enzymami, receptorami i czynnikami wzrostu. Jest ona także powszechnie znanym przeciwutleniaczem. Jednak ze względu na aktywację wielu szlaków biochemicznych trudno jednoznacznie określić, która z jej aktywności biologicznych odpowiada za efekt przeciwnowotworowy, gdyż działanie to może być wynikiem aktywności przeciwutleniającej, przeciwzapalnej oraz cytotoksycznej (9).



Ryc. 1. Budowa chemiczna kurkuminy oraz jej pochodnych: demetoksykurkuminy oraz bisdemetoksykurkuminy

## Cel pracy

Celem prezentowanej pracy była ocena właściwości cytotoksycznych kurkuminy oraz jej pochodnych (demetoksykurkuminy oraz bisdemetoksykurkuminy) w zależności od użytych stężeń oraz czasu działania powyższych substancji na komórki raka płaskonabłonkowego języka linii SCC-25 w badaniach *in vitro*.

## Materiał i metody

### Związki chemiczne

W badaniach wykorzystano kurkuminę, demetoksykurkuminę, bisdemetoksykurkuminę, bromek 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu (MTT) (Sigma-Aldrich). W badaniach wykorzystano roztwór antybiotyków/antymykotyków, trypsynę, roztwór PBS, płodową surowicę bydlęcą FBS i L-glutaminę (GE Healthcare) oraz etanol i dimetylosulfotlenek (Avantor Performance Materials).

### Hodowla komórkowa

Linie komórkową SCC-25 ludzkiego raka płaskonabłonkowego języka (ATCC CRL-1628) hodowano zgodnie z zaleceniami producenta z zastosowaniem mieszaniny podłoża Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) i Ham F12 (w stosunku 50:50) z dodatkiem 10% surowicy płodowej bydlęcej inaktywowanej termicznie. Pożywkę suplementowano 400 ng/ml hydrokortyzonu oraz roztworami antybiotyków o stężeniu końcowym: 100 UI/ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny i 0,25 mg/ml amfoterycyny B.

Komórki nowotworowe hodowano w temp. 37°C w atmosferze wzbogaconej 5% dwutlenku węgla (CO<sub>2</sub>) w inkubatorze Panasonic MCO-170AICUV-PE. Hodowle komórkowe pasażowano za pomocą 0,25% roztworu trypsyny z EDTA i wysiewano do nowego naczynia hodowlanego w stosunku 1:4.

### Ocena aktywności cytotoksycznej w teście MTT

Jako wskaźnik aktywności cytotoksycznej kurkuminy oraz jej pochodnych zastosowano test MTT z bromkiem 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ilo)-2,5-dimetylotetrazolu. Jest to metoda kolorymetryczna oceniająca aktywność metaboliczną komórek nowotworowych, oparta na konwersji soli tetrazoliowej do nierozpuszczalnego formazanu. Ilość utworzonego formazanu jest proporcjonalna do ilości żywych komórek. W celu oceny właściwości cytotoksycznych badanych związków w stosunku do komórek linii SCC-25 komórki wysiewano na płytki 96-stanowiskowe w liczbie 5000 komórek na studzienkę, a następnie

dotowano odpowiedniej pożywki hodowlanej w ilości 0,2 ml. Komórki nowotworowe pozostawiono na 72 godz. w celu osiągnięcia wzrostu logarytmicznego. Po upływie tego czasu pożywkę usuwano i na płytce do odpowiednich stanowisk dodano badane substancje w określonych stężeniach.

Komórki hodowano przez 24, 48 i 72 godz. w celu oceny wpływu cytotoksycznego badanych kurkumoidów. Po upływie tego czasu do każdej studzienki dodawano roztwór MTT (Sigma-Aldrich) w pożywce hodowlanej o końcowym stężeniu 2 mg/ml. Komórki pozostawiono z roztworem barwnika na 4 godz. Po tym czasie pożywkę usuwano z komórek i do każdej studzienki dodawano po 200 µl dime-tylosulfotlenku w celu rozpuszczenia powstałych kryształów formazanu. Odczytu absorbancji dokonywano przy użyciu czytnika do mikropłetek (Bio-Tek Instruments) przy długości fali 570 nm. Stopień cytotoksyczności obliczono według następującego wzoru: procent cytotoksyczności (martwe komórki) =  $(1 - [\text{absorbancja badanej próbki} / \text{absorbancja kontroli}]) \times 100\%$ .

### Ocena procesu apoptozy z zastosowaniem cytometrii przepływowej

Apoptozę oraz nekrozę komórek raka języka linii SCC-25 traktowanych kurkuminą oraz jej pochodnymi oceniano przy użyciu zestawu Muse Annexin V and Dead Cell Assay Kit (Millipore) zgodnie z instrukcją obsługi i instrukcją producenta. Po zakończonej ekspozycji komórek na badane związki komórki nowotworowe trypsynizowano i przemywano dwukrotnie jałowym roztworem PBS. Sporządzano zawiesinę komórek w podłożu, tak aby końcowe stężenie wynosiło  $1 \times 10^5$  komórek/ml. Protokół barwienia obejmował dodanie 100 µl zawiesiny komórek do 100 µl odczynnika Muse Annexin V and Dead Cell Assay Kit i wymieszanie roztworu. Próbki inkubowano przez 20 min w temp. pokojowej bez dostępu światła. Odsetek komórek apoptotycznych analizowano metodą cytometrii przepływowej przy użyciu systemu Muse Cell Analyzer (Millipore) i wyrażono jako udział procentowy komórek apoptotycznych. Jako kontrolę negatywną użyto czystego podłoża z dodatkiem surowicy FBS. Jako kontrolę pozytywną zastosowano pożywkę z dodatkiem paklitakselu w stężeniu 100 nmol. Test ten pozwala na rozróżnienie czterech populacji komórek: nieapoptotycznych (żywe) o fenotypie aneksyna V (-) i 7-AAD (-), wczesnoapoptotycznych o fenotypie aneksyna V (+) i 7-AAD (-), późnoapoptotycznych i martwych o fenotypie aneksyna V (+) i 7-AAD (+) oraz nekrotycznych o fenotypie aneksyna V (-) i 7-AAD (+).

### Analiza statystyczna

Do utworzenia bazy danych posłużył program Microsoft Excel 2003 for Macbook. Analizę statystyczną uzyskanych wyników wykonano za pomocą programu Statistica wersja 8.0 (StatSoft). W celu sprawdzenia normalności rozkładu zastosowano test Shapiro-Wilka. Uzyskane wyniki przedstawiono jako średnią oraz odchylenie standardowe z trzech niezależnych eksperymentów, każdy w 12 powtórzeniach (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  test ANOVA Friedman).

## Wyniki

### Aktywność cytotoksyczna kurkuminy oraz jej pochodnych

Hamowanie wzrostu komórek linii SCC-25 traktowanych kurkumina, demetoksykurkumina oraz bisdemetoksykurkumina oceniono w teście żywotności komórek z zastosowaniem barwnika MTT. Efekt cytotoksyczny analizowanych związków w stosunku do komórek raka języka wykazuje znaczący wzrost, zależny od dawki, co przedstawiono na rycinie 2.

Przy zastosowaniu odpowiednich algorytmów matematycznych wyznaczono 50% śmiertelność komórek

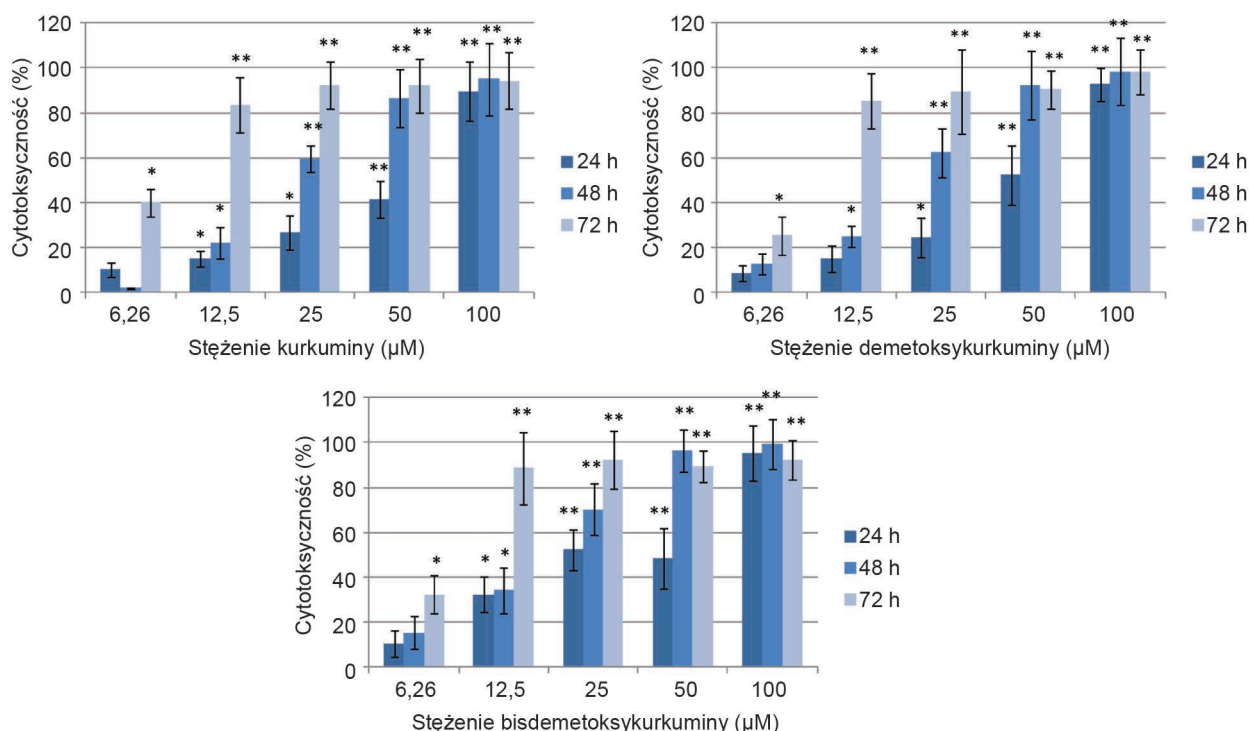
raka języka linii SCC-25.  $IC_{50}$  wyniosło 41,18  $\mu\text{mol/L}$  po 24 godz. inkubacji komórek z kurkumina, 36,67  $\mu\text{mol/L}$  w przypadku demetoksykurkuminy oraz 27,13  $\mu\text{mol/L}$  dla bisdemetoksykurkuminy w wyniku 24 godz. inkubacji komórek. Zmiany wartości  $IC_{50}$  w zależności od czasu przedstawia tabela 1.

Uzyskane dane pozwalają na wyciągnięcie wniosku, że w przypadku linii SCC-25 aktywność cytotoksyczna badanych związków kształtowała się następująco: kurkumina < demetoksykurkumina < bisdemetoksykurkumina.

Po analizie uzyskanych wyników w teście MTT do dalszej analizy cytometrycznej wybrano jedno stężenie badanego związku, tj. 50  $\mu\text{mol/L}$  oraz 24 godz. inkubację komórek z analizowanym związkiem.

**Tab. 1.** Wartości  $IC_{50}$  analizowanych związków w stosunku do komórek raka języka linii SCC-25

Badane substancje	$IC_{50}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )		
	24 h	48 h	72 h
Kurkumina	41,18	22,97	4,11
Demetoksykurkumina	36,67	19,68	6,96
Bisdemetoksykurkumina	27,13	16,84	4,72

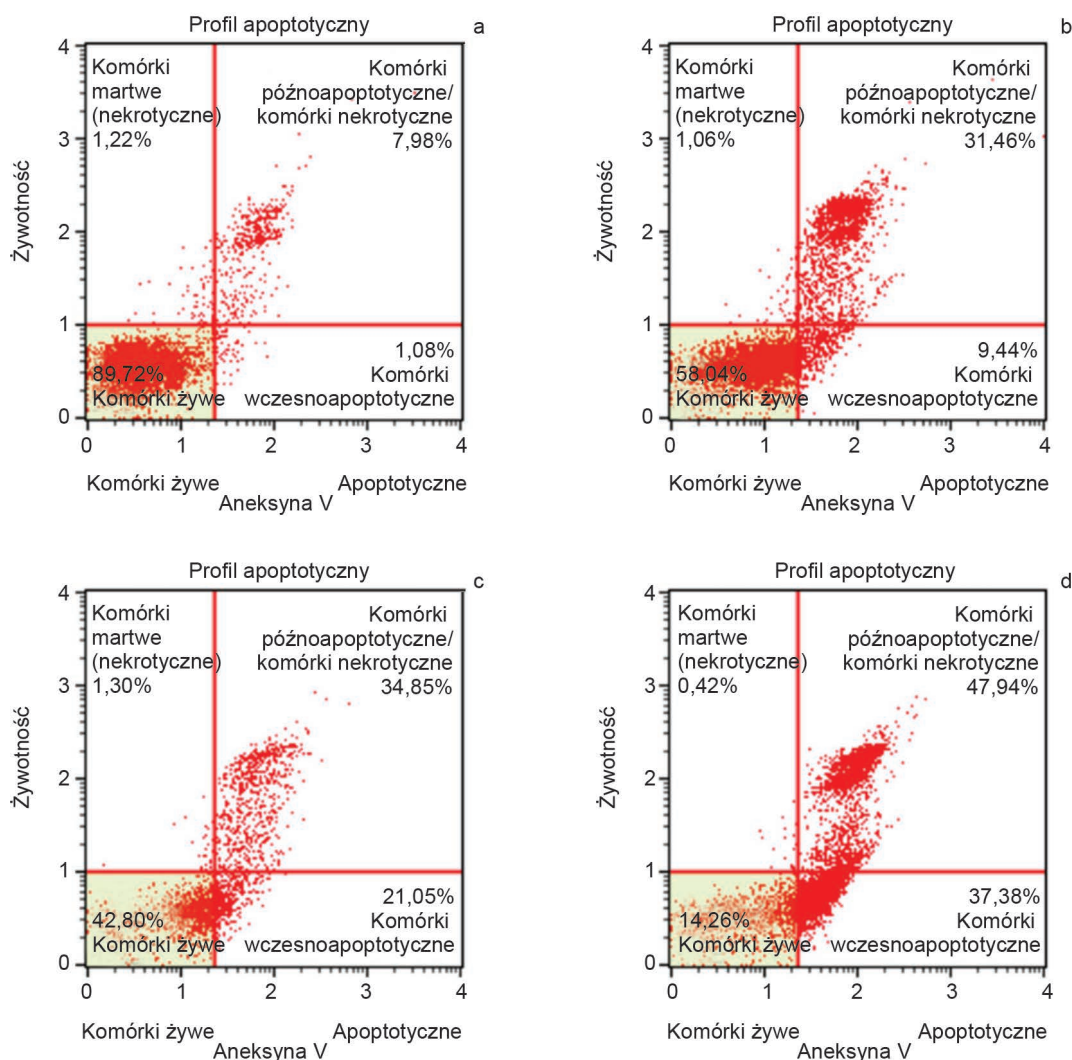


**Ryc. 2.** Cytotoksyczny efekt kurkuminy, demetoksykurkuminy oraz bisdemetoksykurkuminy w stężeniach od 6,26 do 100  $\mu\text{mol/L}$  w wyniku 24, 48 i 72 godz. inkubacji komórek

### Wpływ kurkuminy oraz jej pochodnych na aktywację procesów apoptozy i nekrozy

W wyniku 24-godzinnej inkubacji komórek raka języka linii SCC-25 z 50  $\mu\text{mol/L}$  kurkuminy zaobserwowano istotnie statystyczny wzrost komórek o fenotypie aneksyna V (+) i 7-AAD (-) oraz aneksyna V (+) i 7-AAD (+) w porównaniu do kontroli hodowanej na standardowym podłożu bez dodatku analizowanych związków. Nastąpił wzrost odsetka komórek o fenotypie wczesnoapoptotycznym o 8,36% oraz komórek o fenotypie późnoapoptotycznym o 23,5% w porównaniu z kontrolą. Zastosowanie demetoksykurkuminy o analogicznym stężeniu także spowodowało istotnie

statystyczny wzrost komórek o fenotypie aneksyna V (+) i 7-AAD (-) oraz aneksyna V (+) i 7-AAD (+) w porównaniu do kontroli. W tym przypadku obserwowano wzrost odsetka komórek o fenotypie wczesnoapoptotycznym o 19,97% oraz komórek o fenotypie późnoapoptotycznym o 26,89% w porównaniu do kontroli. Druga pochodna kurkuminy – bisdemetoksykurkumina – także powodowała istotnie statystyczny wzrost komórek o fenotypie aneksyna V (+) i 7-AAD (-) oraz aneksyna V (+) i 7-AAD (+). W tym przypadku odnotowano najsilniejszy wzrost komórek o fenotypie wczesnoapoptotycznym o 36,3% oraz późnoapoptotyczny o 39,96% w porównaniu do kontroli. Szczegółowe dane przedstawia rycina 3.



**Ryc. 3a-d.** Wpływ kurkuminy (3b), demetoksykurkuminy (3c) oraz bisdemetoksykurkuminy (3d) na komórki raka języka linii SCC-25. Komórki kontrolne bez dodatku kurkuminy oraz jej pochodnych przedstawiono na rycinie 3a. Wczesne apoptotyczne komórki znajdują się w prawym dolnym kwadrancie wykresu, a żywe komórki – w lewym dolnym kwadrancie. Wszystkie badane substancje wywołują apoptozę w sposób zależny od dawki, co analizowano w teście Muse Annexin V and Dead Cell przy użyciu cytometrii przepływowej

## Dyskusja

Rak języka jest chorobą występującą często u starszych mężczyzn narażonych na działanie konwencjonalnych czynników ryzyka, w tym tytoniu oraz alkoholu. Chorzy na raka języka to w większości mężczyźni w wieku 45-65 lat. U kobiet, u których rak ten występuje trzy razy rzadziej, szczyt zachorowalności obserwuje się pomiędzy 55. a 75. rokiem życia, czyli o 10 lat później niż u mężczyzn. Wraz z podnoszeniem świadomości społeczeństwa w krajach, w których kampanie antynikotynowe zostały z powodzeniem wdrożone, nastąpił znaczny spadek liczby nowotworów związanych z paleniem tytoniu. Dziś wiadomo jednak, że czynników ryzyka raka języka jest więcej, a obecny wzrost zachorowalności na ten typ nowotworu budzi niepokój u onkologów. Obecnie leczeniem z wyboru w niezaawansowanych rakach języka jest leczenie chirurgiczne z zachowaniem odpowiednich marginesów tkankowych oraz radioterapia następową. W przypadkach zaawansowanych, gdy dochodzi do zniszczenia większości języka przez guz nowotworowy, a w szczególności gdy rak języka obejmuje jego nasadę lub nacieka on okoliczne tkanki kostne, bezwzględnie wskazane jest usunięcie guza wraz z rekonstrukcją języka i ewentualnie usuniętej części żuchwy. Ostatnie doniesienia onkologów wskazują, że zalecana jest także uzupełniająca chemioterapia i radioterapia, które prowadzi się równolegle. Model ten pozwala na synergistyczne działanie obu metod i skutkuje on dobrym efektem antyproliferacyjnym, radiouczulającym oraz możliwością miejscowej kontroli i zwiększenia czasu przeżycia po leczeniu (10).

Chemioterapia w leczeniu nowotworów głowy i szyi ma bardzo ograniczone zastosowanie ze względu na małą wrażliwość komórek nowotworowych na chemioterapeutyki. W określonych przypadkach stosuje się u pacjentów z zaawansowanym rakiem języka chemioterapię przedoperacyjną, a następnie radioterapię, gdyż badania wskazują na silny efekt synergistyczny związków platyny (cisplatyny, karboplatyny, oksaliplatyny) i radioterapii. Poszukiwanie nowych związków pochodzenia roślinnego, zdolnych do zwiększania wrażliwości komórek raka języka na chemioterapeutyki lub znalezienie nowego chemioterapeutyku zdolnego do zahamowania proliferacji komórek lub pobudzania procesu apoptozy w komórkach nowotworowych, jest obecnie celem wielu badań dotyczących tematyki nowotworów regionu głowy i szyi (2, 3, 10).

W doświadczeniach prowadzonych na liniach komórek nowotworowych wykazano, że kurkumina oraz jej pochodne wykazują efekt chemoprotekcyjny oraz

przeciwnowotworowy na drodze wywoływania śmierci komórek nowotworowych, zahamowania cyklu komórkowego, hamowania angiogenezy oraz obniżenia zdolności do przerzutów nowotworu. W badaniach wykazano, że kurkumina oraz jej pochodne wykazują działanie przeciwnowotworowe w stosunku do komórek raka sutka (11), raka wątroby (12), raka szyjki macicy (12), raka płuc (13), raka jajnika (14), gruczolakoraka jelita grubego (15), białaczki limfoblastycznej (16), raka prostaty (17), raka trzustki (18), glejaka (19), siatkówczaka (20) oraz nowotworów regionu głowy i szyi (21-24).

Wykazano, że kurkumina hamuje wzrost ludzkich komórek raka piersi w badaniach *in vitro*. Khazaei-Koohpar i wsp. (11) wykazali, że kurkumina wywiera działanie przeciwnowotworowe poprzez zahamowanie proliferacji oraz wywoływanie fizjologicznej śmierci komórek – apoptozy w komórkach raka piersi. W badaniach tych porównano wpływ różnych dawek kurkuminy (do 100 mmol) w stosunku do estrogenozależnych komórek gruczolakoraka sutka linii MCF-7. Po 24-godzinnej inkubacji z kurkuminą zaobserwowano obkurczenie komórek raka sutka linii MCF-7. Naukowcy zaobserwowali także znaczne zmniejszenie żywotności komórek poprzez wzbudzenie apoptozy w sposób zależny od dawki i czasu ekspozycji komórek na kurkuminę.

Ding i wsp. (12) zbadali działanie przeciwnowotworowe trzech rodzajów pochodnych kurkuminy (pochodne fosforylowane, eteryfikowane oraz zestyfikowane) i oceniano ich działanie przeciwnowotworowe wobec ludzkiego raka sutka linii MCF-7, raka wątroby Hep-G2 oraz ludzkich komórek raka szyjki macicy linii HeLa. W porównaniu z kurkuminą niektóre pochodne wykazywały silniejsze działanie przeciwnowotworowe wobec komórek HeLa, a niektóre również wyższą aktywność przeciwnowotworową niż kurkumina wobec komórek raka sutka linii MCF-7, osiągając wartość  $IC_{50}$  równą  $6,78 \mu\text{mol/L}$  (wartość  $IC_{50}$  kurkuminy wynosiła  $17,67 \mu\text{mol/L}$ ). Badano także wpływ analizowanych związków na apoptozę komórek HeLa barwionych DAPI, jak również poprzez barwienie aneksyną V-FITC i jodkiem propidyny (PI) z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Wyniki wykazały, że efekt ten jest zależny od dawki i czasu kontaktu komórek z badanymi związkami.

Guan i wsp. (25) w celu potwierdzenia aktywności przeciwnowotworowej kurkuminy testowali jej wpływ na proliferację komórek i apoptozę w modelu *in vitro* z użyciem komórek raka sutka linii MDA-MB-231. Komórki inkubowano w pożywce hodowlanej z dodatkiem 5, 10, 25 i  $50 \mu\text{mol/L}$  kurkuminy przez 72 godz. oraz z dodatkiem  $25 \mu\text{mol/L}$  kurkuminy w trzech przedziałach

czasowych: 24, 48, i 72 godz. Wykazano, że kurkumina znacznie zmniejsza proliferację komórek oraz zwiększa apoptozę w sposób zależny od czasu ekspozycji oraz stężenia. Badano także ekspresję kaspazy 3, kluczowego białka w procesie apoptozy, i zaobserwowano, że traktowanie komórek kurkumina zwiększa ilość tego białka w komórkach raka sutka. Ponadto zaobserwowano, że zdolność do migracji komórek po zastosowaniu kurkuminy była znacznie zahamowana.

Ye i wsp. (13) analizowali analog karbonylowy kurkuminy oraz badali jego wpływ na mechanizm wywoływania apoptozy w komórkach ludzkiego raka płuc linii H460. Wykazano, że związek ten nie tylko powoduje ekspresję białka CHOP, ale także wywołuje apoptozę w sposób zależny od dawki, a efekt ten jest powiązany z odpowiednią aktywacją ważnych składników znajdujących się w siateczce śródplazmatycznej (ER). Gdy w badaniu ekspresja CHOP została wyłączona przez swoiste siRNA, związek ten nadal wzbudzał apoptozę komórek, jednak znacznie słabiej, co dodatkowo obrazuje, że droga aktywacji apoptozy jest zależna od ER. W badaniach wykazano także, że pochodna karbonylowa ma lepszą stabilność i aktywność przeciwnowotworową niż kurkumina w stosunku do komórek linii H460.

W celu określenia wpływu kurkuminy na żywotność komórek oraz rodzaj śmierci komórkowej Yu i wsp. (20) przeprowadzili 24-godziną hodowlę komórek siatkowczaka linii Y79 z różnymi stężeniami kurkuminy (0-80  $\mu\text{mol/L}$ ). Stopień apoptozy oceniali przy użyciu cytometrii przepływowej i wykazali wzrost komórek apoptotycznych po zastosowaniu kurkuminy. W badaniach wykazali, że kurkumina wpływa także na potencjał błonowy w komórkach siatkowczaka i odgrywa ważną rolę w regulowaniu funkcji komórkowych.

Xi i wsp. (21) w badaniach *in vitro* analizowali wpływ kurkuminy na żywotność komórek raka gardła linii FaDu oraz raka języka linii Cal 27. Wykazali, że kurkumina w dawkach od 1,7 do 25  $\mu\text{mol/L}$  hamowała żywotność komórek obu analizowanych linii. W teście tworzenia kolonii badacze potwierdzili, że ekspozycja komórek w środowisku z dodatkiem kurkuminy powoduje znaczące zahamowanie tworzenia kolonii.

Wyniki badań uzyskane w tej pracy wskazują, że wartości  $\text{IC}_{50}$  w stosunku do linii raka płaskonabłonkowego języka wynosiły 22,97; 19,68 oraz 16,84  $\mu\text{mol/L}$  odpowiednio dla kurkuminy, demetoksykurkuminy oraz bisdemetoksykurkuminy. Zaobserwowano, że kurkumina oraz jej pochodne powodują przemieszczenie ujemnie naładowanej fosfatydyloseryny do zewnętrznej monowarstwy błony komórkowej. Ponadto wykazano, że odsetek komórek apoptotycznych oraz późnoapoptotycznych znacznie wzrasta pod wpływem

kurkuminy oraz jej pochodnych. Największą zdolność do pobudzenia procesu apoptozy wykazywała bisdemetoksykurkumina. Odsetek komórek o fenotypie komórki wczesnoapoptotycznej wynosił po zastosowaniu bisdemetoksykurkuminy 37,38% (kontrola 1,08%).

Tsang i wsp. (22) badali wpływ kurkuminy na komórki raka języka linii (CAL27, HN21B oraz HN96) z kurkumina w stężeniach od 0 do 100  $\mu\text{mol/L}$ . Uzyskane przez badaczy wartości  $\text{IC}_{50}$  były podobne do wartości wykazanych w prezentowanej pracy. Wartość  $\text{IC}_{50}$  kurkuminy wynosiła 21,5  $\mu\text{mol/L}$  dla komórek linii CAL27; 25,82  $\mu\text{mol/L}$  dla komórek linii HN21B oraz 36,01  $\mu\text{mol/L}$  w przypadku linii HN96. Aby ocenić wpływ kurkuminy na zdolność adhezji, komórki języka traktowano kurkumina i mierzono zdolność ich przylegania. Wykazano, że kurkumina znacznie utrudnia przyleganie komórek raka płaskonabłonkowego języka do powierzchni pokrytej kolagenem. Ponadto wykazano wpływ kurkuminy na zahamowanie migracji komórek badanych linii.

Ip i wsp. (23) badali mechanizmy śmierci komórek nowotworowych pod wpływem kurkuminy. Analizowano hamowanie cyklu komórkowego oraz wywoływanie apoptozy w komórkach ludzkiego raka języka SCC-4. Autorzy zaobserwowali, że kurkumina hamowała wzrost komórek SCC-4 w sposób zależny od dawki, wzmagając hamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M wraz ze spadkiem poziomów cyklin B/Cdk1 i CDC25C. Ponadto wykazano, że kurkumina znacząco pobudza apoptozę komórek SCC-4 wraz ze spadkiem poziomu białka Bcl-2, obniżeniem mitochondrialnego potencjału błonowego ( $\Delta\Psi$  (m)) i zwiększeniem ilości aktywnych form kaspazy-3. Autorzy sugerują, że kurkumina aktywuje proces apoptozy w szlaku zależnym od mitochondriów.

## Wnioski

1. Badania wykazały zależną od dawki oraz czasu ekspozycji aktywność cytotoksyczną kurkuminy oraz jej naturalnie występujących pochodnych: demetoksykurkuminy oraz bisdemetoksykurkuminy w stosunku do komórek raka płaskonabłonkowego języka linii SCC-25.
2. Najsilniejszą aktywność cytotoksyczną wykazała pochodna kurkuminy – bisdemetoksykurkumina.
3. Stwierdzono, że kurkumina i jej pochodne zdolne są do aktywowania apoptozy w hodowli komórkowej raka płaskonabłonkowego języka.
4. Obiecujące wyniki eksperymentu stanowią punkt wyjścia do dalszych badań nad działaniem tych produktów wobec innych nowotworów głowy i szyi oraz do badań nad mechanizmem ich działania przeciwnowotworowego.

## Piśmiennictwo

- Anandharaj A, Ekshyyan O, Jia Y i wsp. EBV and not HPV sensitizes tobacco-associated head and neck cancer cell line FaDu to radiotherapy. *Acta Otolaryngol* 2016; 136(4):354-62.
- Kruk-Zagajewska A, Wierzbicka M. Rak języka i dna jamy ustnej – rozpoznawanie i postępy w leczeniu. *Wspol Onkol* 2003; 7(4):264-74.
- Ali H, Sinnott SJ, Corcoran P i wsp. Oral cancer incidence and survival rates in the Republic of Ireland, 1994-2009. *BMC Cancer* 2016; 16(1):950.
- García-Kass AI, Herrero-Sánchez A, Esparza-Gómez G. Oral tongue cancer in public hospitals in Madrid, Spain (1990-2008). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2016; 21(6):e658-e664.
- Nagahama K, Utsumi T, Kumano T i wsp. Discovery of a new function of curcumin which enhances its anticancer therapeutic potency. *Sci Rep* 2016; 6:30962.
- Deptuła T, Gruber B, Krówczyński A. Kurkumina i jej pochodne – zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej i chemoprewnicy. *Post Fitoter* 2014; (3):155-65.
- Qadir MI, Naqvi ST, Muhammad SA. Curcumin: a polyphenol with molecular targets for cancer control. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016; 17(6):2735-9.
- Liu W, Zhai Y, Heng X i wsp. Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. *J Drug Target* 2016; 24(8):694-702.
- Jankowski J. Kurkuma jako lek przeciwpalny i przeciwnowotworowy. *Post Fitoter* 2004; (2):89-90.
- Rak języka – wywiad z prof. zw. dr hab. med. Aliną Morawiec-Sztandera; <http://publicznecentraonkologii.pl/pacjent/rak-jezyka-prof-zw-dr-hab-med-alina-morawiec-sztandera-województki-szpital-specjalistyczny-im-m-kopernika-w-lodzi/>.
- Khazaei-Koohpar Z, Entezari M, Movafagh A i wsp. Anticancer activity of curcumin on human breast adenocarcinoma: role of Mcl-1 gene. *Iran J Cancer Prev* 2015; 8(3):e2331.
- Ding L, Ma S, Lou H i wsp. Synthesis and biological evaluation of curcumin derivatives with water-soluble groups as potential antitumor agents: an *in vitro* investigation using tumor cell lines. *Molecules* 2015; 20(12):21501-14.
- Ye H, Wei X, Wang Z i wsp. A novel double carbonyl analog of curcumin induces the apoptosis of human lung cancer H460 cells via the activation of the endoplasmic reticulum stress signaling pathway. *Oncol Rep* 2016; 36(3):1640-8.
- Bondi ML, Emma MR, Botto C i wsp. Biocompatible lipid nanoparticles as carriers to improve curcumin efficacy in ovarian cancer treatment. *J Agric Food Chem* 2017 Feb 7. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b04409.
- Dasiram JD, Ganesan R, Kannan J i wsp. Curcumin inhibits growth potential by G1 cell cycle arrest and induces apoptosis in p53-mutated COLO 320DM human colon adenocarcinoma cells. *Biomed Pharmacother* 2017; 86:373-80.
- Pimentel-Gutiérrez HJ, Bobadilla-Morales L, Barba-Barba CC i wsp. Curcumin potentiates the effect of chemotherapy against acute lymphoblastic leukemia cells via downregulation of NF-κB. *Oncol Lett* 2016; 12(5):4117-24.
- Klippstein R, Bansal SS, Al-Jamal KT. Doxorubicin enhances curcumin's cytotoxicity in human prostate cancer cells *in vitro* by enhancing its cellular uptake. *Int J Pharm* 2016; 514(1):169-75.
- Zhou X, Su J, Feng S i wsp. Antitumor activity of curcumin is involved in down-regulation of YAP/TAZ expression in pancreatic cancer cells. *Oncotarget* 2016; 7(48):79076-88.
- Marslin G, Sarmiento BF, Franklin G i wsp. Curcumin encapsulated into methoxy poly(ethylene glycol) poly(ε-caprolactone) nanoparticles increases cellular uptake and neuroprotective effect in glioma cells. *Planta Med* 2016 (Epub ahead of print).
- Yu X, Zhong J, Yan L i wsp. Curcumin exerts antitumor effects in retinoblastoma cells by regulating the JNK and p38 MAPK pathways. *Int J Mol Med* 2016; 38(3):861-8.
- Xi Y, Gao H, Callaghan MU i wsp. Induction of Bcl-2 interacting Killer, BiK, is mediated for anti-cancer activity of curcumin in human head and neck squamous cell carcinoma cells. *J Cancer* 2015; 6(4):327-32.
- Tsang RK, Tang WW, Gao W i wsp. Curcumin inhibits tongue carcinoma cells migration and invasion through downregulation of matrix metalloproteinase 10. *Cancer Invest* 2012; 30(7): 503-12.
- Ip SW, Wu SY, Yu CC i wsp. Induction of apoptotic death by curcumin in human tongue squamous cell carcinoma SCC-4 cells is mediated through endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathways. *Cell Biochem Funct* 2011; 29(8):641-50.
- Masloub SM, Elmalahy MH, Sabry D i wsp. Comparative evaluation of PLGA nanoparticle delivery system for 5-fluorouracil and curcumin on squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol* 2016; 64:1-10.
- Guan F, Ding Y, Zhang Y i wsp. Curcumin suppresses proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells through autophagy-dependent akt degradation. *PLoS One* 2016; 11(1):e0146553.

Adres/address:

\*dr n. med. Robert Kubina

Katedra i Zakład Patologii, Wydział Farmaceutyczny  
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu  
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach  
ul. Ostrogórska 30, 41-200 Sosnowiec  
tel. +48 (32) 364-13-54  
e-mail: rkubina@sum.edu.pl

## Konflikt interesów

## Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 15.02.2017

zaakceptowano/accepted: 23.03.2017