

Bogdan Kędzia, *Elżbieta Holderna-Kędzia

Przeciwnowotworowe działanie składników propolisu. Cz. 1. Ester fenyletylowy kwasu kawowego (CAPE)

Anticancerogenic activity of some components of propolis. Part 1. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)

Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu
Dyrektor Instytutu: dr hab. inż. Małgorzata Zimmiewska, prof. IWNiRZ

SUMMARY

The paper presents a review of the publications on the anticancerogenic activity of the biologically active component of propolis – caffeic acid phenethyl ester (CAPE). Literature data indicate numerous biological properties of CAPE, namely: antioxidant, anti-inflammatory, antiviral, immunostimulatory, anti-angiogenic and others. In numerous tests, both in vitro and in vivo, the significant activity of CAPE has been confirmed, including an action against HT-29 human colon adenoma cells, and five: human, murine and other tumor cell cultures. The authors also emphasize that CAPE supports the anticancerogenic effect of drugs, including doxorubicin and cisplatin, due to the reduction of cancer cell survival by 45% and 34%, respectively, compared to the above-mentioned drugs used alone. The conducted research indicates that the induction of apoptosis in cells, i.e. programmed cell death, can be mentioned among the main mechanisms of the anticancerogenic activity of CAPE.

Keywords: propolis, CAPE, anticancerogenic activity, cancer cell lines, apoptosis

STRESZCZENIE

W opracowaniu przedstawiono przegląd publikacji dotyczących przeciwnowotworowego działania biologicznie aktywnego składnika propolisu – estru fenyletylowego kwasu kawowego (CAPE). Dane piśmiennictwa wskazują na jego liczne właściwości biologiczne: przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwwirusowe, immunostymulujące, przeciwingiogenne i inne. W wielu testach, zarówno in vitro, jak i in vivo, potwierdzono silne działanie CAPE, m.in. wobec komórek ludzkiego gruczolaka okrężnicy HT-29, pięciu hodowli komórkowych nowotworów ludzkich, mysich i innych. Autorzy zwracają także uwagę na wspomaganie przez CAPE przeciwnowotworowego działania leków, w tym dokсорubicyny, cisplatyny na podstawie obniżenia przeżywalności komórek nowotworowych odpowiednio o 45 i 34% w porównaniu z wymienionymi lekami stosowanymi samodzielnie. Przeprowadzone badania wskazują, że wśród głównych mechanizmów przeciwnowotworowego działania CAPE można wymienić wywołanie w komórkach apoptozy, czyli zaprogramowanej śmierci komórki.

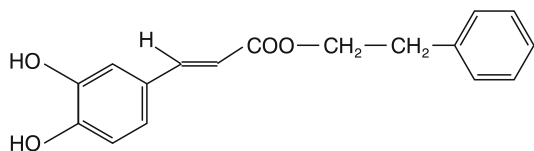
Słowa kluczowe: propolis, CAPE, działanie przeciwnowotworowe, linie komórek nowotworowych, apoptoza

Wstęp

Ester fenyletylowy kwasu kawowego (ang. *caffeic acid phenethyl ester* – CAPE) jest biologicznie aktywnym składnikiem propolisu. Z danych piśmiennictwa wynika, że wykazuje on wiele interesujących właściwości, a mianowicie działa przeciwutleniająco, przeciwzapalnie, przeciwbakteryjnie, przeciwwirusowo, immunostymulująco, przeciwingiogenne. Ponadto hamuje podziały komórkowe i działa cytotoksycznie na komórki nowotworowe, a także powoduje apoptozę (zaprogramowaną śmierć) komórek nowotworowych.

W niniejszym opracowaniu postanowiono dokonać przeglądu publikacji dotyczących przeciwnowotworowego działania CAPE.

Grunberger i wsp. (1) jako pierwsi zwrócili uwagę na to, że ester fenyletylowy kwasu kawowego (CAPE) (ryc. 1) (2) wywiera działanie przeciwnowotworowe. Wymienieni autorzy stwierdzili, że CAPE w stężeniu 0,035 $\mu\text{mol/ml}$ całkowicie hamuje wbudowywanie ^3H -tymidyny do DNA ludzkiego nowotworu sutka MCF-7. Jeszcze lepsze efekty odnotowano w przypadku działania CAPE na komórki takich nowotworów, jak czerniak złośliwy, rak okrężnicy



Ryc. 1. Budowa chemiczna estru fenyletoetylowego kwasu kawowego (CAPE)

i rak nerek. Na tej podstawie uznano, że CAPE jest jednym z najważniejszych związków odpowiedzialnych za przeciwnowotworowe działanie ekstraktów propolisowych.

Rao i wsp. (3) przebadali działanie cytotoksyczne CAPE wobec komórek ludzkiego gruczolakoraka okrężnicy HT-29 i wykazali jego dużą aktywność. CAPE hamował rozwój komórek wymienionego nowotworu w stężeniu 30 $\mu\text{mol/ml}$.

W innym eksperymencie Rao i wsp. (2) karmili szczury paszą standardową z dodatkiem 500 $\mu\text{g/g}$ CAPE przez 2 tygodnie, a następnie podawali im karcynogen azoksymetan (AOM) raz w tygodniu przez 2 kolejne tygodnie w ilości 15 mg/kg. Po kolejnych 5 tyg. karmienia zwierząt paszą z dodatkiem

Tab. 1. Wpływ CAPE na powstawanie nadzerek okrężnicy typu nowotworowego wywoływanych azoksymetaniem (wg 2)

Grupy zwierząt doświadczalnych	Liczba nadzerek okrężnicy o charakterze nowotworowym
AOM (kontrola)	123 (0)*
AOM + CAPE	53 (56,9)

*W nawiasach podano obniżenie liczby nadzerek okrężnicy w porównaniu z kontrolą

Tab. 2. Działanie przeciwnowotworowe CAPE w odniesieniu do nowotworów skóry wywoływanych karcynogenami (wg 5)

Dawka CAPE ($\mu\text{mol/dawkę}$)	Liczba myszy z nowotworami skóry (%)	Liczba nowotworów/mysz	Hamowanie rozwoju nowotworu (%)
Kontrola	63	4,7	0
0,01	47	3,8	19
0,1	43	2,5	47
3,0	30	0,5	90

Tab. 3. Cytotoksyczne działanie CAPE na komórki nowotworów ludzkich i mysich (wg 6)

Badany związek	Aktywność cytotoksyczna (EC_{50} , $\mu\text{mol/ml}$)			
	Nowotwory ludzkie		Nowotwory mysie	
	HT-1080	A-549	26-L5	B16-BL6
Ester fenetylowy kwasu kawowego (CAPE)	13,7	44,0	1,8	3,2

CAPE oceniano liczbę powstałych nadzerek okrężnicy o charakterze nowotworowym. Wyniki badań przedstawione w tabeli 1 wskazują, że podawanie szczurom paszy z dodatkiem CAPE zabezpieczało je przed rozwojem nowotworu okrężnicy. W obecności CAPE liczba nadzerek okrężnicy o charakterze nowotworowym zmniejszyła się o 56,9%, w porównaniu z kontrolą (AOM).

Dalsze badania Rao i wsp. (4) wykazały, że podawanie szczurom CAPE w paszy w ilości 750 $\mu\text{g/g}$ zabezpieczało jelito cienkie i okrężnicę tych zwierząt przed powstaniem nowotworu w 57,4% w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi, którym podawano tylko związek karcynogeny – azoksymetan.

Huang i wsp. (5) wywoływali u myszy nowotwory skóry za pomocą karcynogenów: DMBA (7,12-dimetylobenz(a)antracenu) i TPA (octanu 12-O-tetradekano-13-forbolu) stosowanych zewnętrznie, a następnie miejscowo stosowali CAPE w stężeniu 0,01-3,0 $\mu\text{mol/dawkę}$ przez 8 tygodni. Dane zebrane w tabeli 2 wskazują, że efekt leczniczy wzrastał w miarę zwiększania dawki CAPE. Po miejscowym stosowaniu tego związku w stężeniu 3,0 $\mu\text{mol/dawkę}$ liczba myszy z nowotworami skóry zmniejszyła się o 53,4%, liczba zmian nowotworowych na skórze – o 89,4%, a stopień zahamowania rozwoju procesu nowotworowego wzrósł o 90% w porównaniu ze zwierzętami nieleczonymi (kontrola).

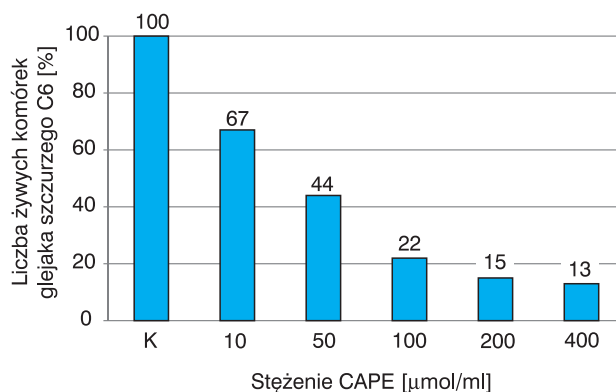
Banskota i wsp. (6) oceniali cytotoksyczne działanie CAPE na komórki nowotworowe ludzkie i mysie. Stwierdzili oni, że związek ten odznaczał się wysoką aktywnością cytotoksyczną (tab. 3). Szczególnie silne działanie CAPE wywierał na komórki nowotworów mysich 26-L5 i B16-BL6 (EC_{50} odpowiednio 1,8 i 3,2 $\mu\text{mol/ml}$).

Badania Usia i wsp. (7) dotyczyły aktywności cytotoksycznej CAPE (tab. 4). Jako kontroli użyto 5-fluorouracylu. Odnotowano, że CAPE odznaczał się wysoką aktywnością cytotoksyczną wobec 5 hodowli komórkowych nowotworów ludzkich i mysich (EC_{50} w granicach 0,3-27,9 $\mu\text{mol/ml}$).

Borelli i wsp. (8) określali wpływ CAPE na tworzenie się nadzerek okrężnicy na skutek działania substancji karcynogennej – azoksymetanu (AOM). Wyniki badań ujęte w tabeli 5 wskazują na ochronne działanie CAPE wobec substancji karcynogennej. CAPE podawano zwierzętom dożołądkowo w dawce 50 mg/kg m.c. 5 razy tygodniowo. W 15. i 20. dniu doświadczenia podano AOM dootrzewnowo w dawce 15 mg/kg m.c. Po 11 tygodniach podawania CAPE zwierzęta usypiano i oceniano w okrężnicy liczbę nadzerek nowotworowych oraz w pełni rozwiniętą chorobę nowotworową. Zaobserwowano, że podawanie CAPE zmniejszyło o ok. 40% liczbę nadzerek nowotworowych okrężnicy i całkowicie zabezpieczało zwierzęta przed powstaniem w pełni objawowego nowotworu tego narządu.

Również Liao i wsp. (9) stwierdzili, że CAPE w stężeniu 0,2 $\mu\text{mol/ml}$ hamuje w 47,8% proliferację komórek mięsakoraka okrężnicy CT26. Ponadto dootrzewnowe podanie myszom CAPE w dawce 10 mg/kg/dzień wyraźnie zmniejszyło przerzuty tego nowotworu do płuc i przedłużyło życie zwierząt.

Wpływ stężenia CAPE na przeżywalność komórek glejaka szczurzego C6 badali Lee i wsp. (10). Z danych przedstawionych na rycinie 2 wynika, że CAPE w ilości 50 $\mu\text{mol/ml}$ obniżał liczbę żywych komórek tego nowotworu o 56%, a w ilości 100 $\mu\text{mol/ml}$ o 78%. Świadczy to o wysokiej aktywności CAPE wobec badanych komórek nowotworowych.



Ryc. 2. Wpływ stężenia CAPE na przeżywalność komórek glejaka szczurzego C6 (wg 10)

Chung i wsp. (11) określili wpływ CAPE na rozwój nowotworu ludzkiego wątroby HepG2 w organizmie myszy. Po podskórnym wszczepieniu komórek nowotworowych podjęto podawanie CAPE dwiema drogami: podskórną w dawce 5 mg/kg m.c. 3 razy w tygodniu oraz pokarmową w dawce 20 mg/kg m.c. 6 razy w tygodniu. Doświadczenie prowadzono przez 6 tygodni. Badania wykazały (tab. 6), że po podawaniu CAPE drogą podskórną objętość nowotworu u myszy zmniejszyła się o 56,7%, a po podawaniu drogą pokarmową o 47,1% w porównaniu ze zwierzętami nieleczonymi (kontrola).

W badaniach Chen i wsp. (12) aktywność cytotoksyczna CAPE (IC_{50}) wobec komórek czerniaka ludzkiego wynosiła 0,03 $\mu\text{mol/ml}$.

Z kolei Orsolić i wsp. (13) wykazali, że podawanie myszom CAPE w ilości 50 mg/kg m.c. drogą pokarmową na 5, 10 i 15 dni przed wszczepieniem ludzkiego nowotworu sutka Mca obniżało o 66% przerzuty tego nowotworu do płuc badanych zwierząt.

Tab. 4. Działanie przeciwnowotworowe CAPE na komórki nowotworów ludzkich i mysich (wg 7)

Badane związki	Aktywność cytotoksyczna (EC_{50} , $\mu\text{mol/ml}$)				
	Nowotwory ludzkie			Nowotwory mysie	
	HT-1080	A-549	HeLa	26-L5	B16-BL6
5-Fluorouracyl (kontrola)	1,4	3,6	0,2	0,3	1,2
CAPE	9,5	27,9	2,4	0,3	6,8

Tab. 5. Wpływ CAPE na tworzenie się nadzerek okrężnicy u szczurów traktowanych azoksymetanem (AOM) (wg 8)

Podawane substancje	Liczba zwierząt	Liczba nadzerek okrężnicy/szczura	Liczba zwierząt z nowotworem okrężnicy
AOM	8	114,7	2
AOM + CAPE	8	71,5	0

Tab. 6. Wpływ CAPE na rozwój nowotworu ludzkiego wątroby HepG2 w organizmie myszy (wg 11)

Droga podania CAPE i dawka	Liczba zwierząt	Objętość nowotworu (ml)	
		wartość	procent
Podskórna, 5 mg/kg m.c. Kontrola CAPE	7	3,30	100,0
	7	1,43	43,3
Pokarmowa, 20 mg/kg m.c. Kontrola CAPE	11	3,31	100,0
	7	1,75	52,9

Z kolei podawanie myszom CAPE drogą podskórną w ilości 50 mg/kg m.c. raz dziennie przedłużało życie myszy z wszczepionym nowotworem MCa o 30,8% (14).

Lee i wsp. (15) donoszą o korzystnym działaniu CAPE na linie komórkowe ludzkich nowotworów błon śluzowych jamy ustnej, takich jak rak płaskonaskórkowy języka SAS i rak naskórkowy gardła OEC-M1. Związek ten w ilości 100 μmol /dawkę hamował rozwój komórek wymienionych nowotworów odpowiednio o 72,1 oraz 54,3% w porównaniu z kontrolą. Natomiast w stężeniu 200 μmol /dawkę zahamowanie rozwoju komórek obu nowotworów było całkowite.

Badania Jina i wsp. (16) oraz Hwanga i wsp. (17) dowodzą, że CAPE jest silnym inhibitorem metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej, które uczestniczą w rozprzestrzenianiu się komórek nowotworowych i tworzeniu wtórnych ognisk nowotworowych (przerzutów) w organizmie. Dowiedziono, że CAPE hamuje aktywność metaloproteinazy-9 macierzy pozakomórkowej w stężeniu (IC_{50}) 0,001-0,002 μmol /ml, prowadząc do zahamowania namnażania się *in vitro* komórek ludzkiego raka wątroby Hep3B (16). Podobnie CAPE działa na metaloproteinazę-2 macierzy pozakomórkowej, hamując namnażanie się *in vitro* komórek ludzkiego włókniako-mięsaka HT-1080 (17).

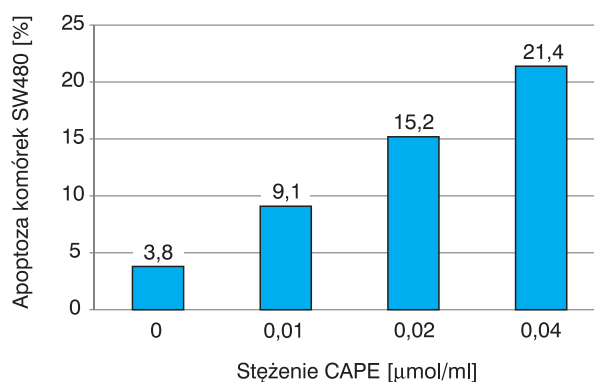
Wpływ CAPE na komórki ludzkiego raka jelita grubego SW480 badali He i wsp. (18). Ich badania wykazały, że stopień zahamowania wzrostu hodowli tych komórek *in vitro* postępuje w czasie (tab. 7).

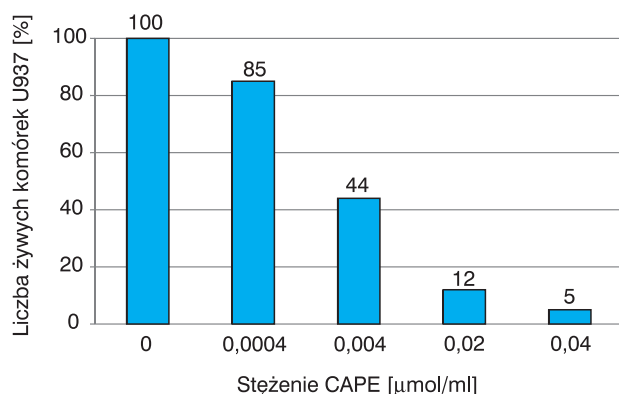
Tab. 7. Wpływ czasu działania CAPE na stopień zahamowania wzrostu komórek ludzkiego raka jelita grubego SW480 (wg 18)

Czas działania (godz.)	Stopień zahamowania wzrostu komórek SW480 (%)
24	66,7
48	76,0
72	88,0
96	96,5

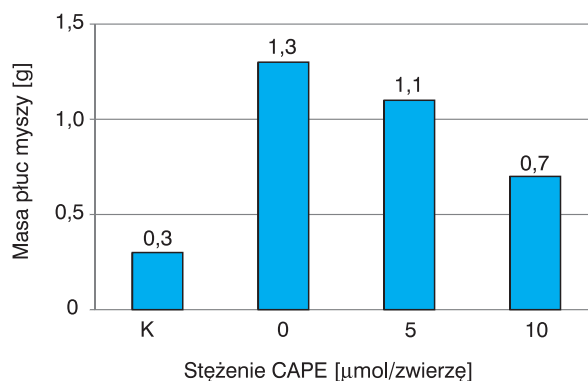
Po 24 godz. działania CAPE w stężeniu 0,2 μmol /ml stopień zahamowania namnażania komórek wynosił 66,7%, natomiast po 96 godz. – 96,5%. Wraz ze wzrostem stężenia CAPE wzrastała również apoptoza (zaprogramowana śmierć) komórek SW480 (ryc. 3). Przy stężeniu 0,04 μmol /ml tego związku apoptoza wzrosła 5,6 razy w porównaniu z kontrolą. Autorzy przypuszczają, że na skutek działania CAPE zahamowanie wzrostu komórek nowotworu SW480 i ich apoptoza związane są z obniżeniem poziomu β -kateniny, swoistego antygenu nowotworowego obecnego w białku badanych komórek.

W kolejnym badaniu zajęto się wpływem CAPE na przeżywalność komórek ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej U937 (19). Wykazano, że już niewielkie stężenia tego związku hamują namnażanie komórek badanego nowotworu (ryc. 4). Po 12 godzinach liczba żywych komórek nowotworowych w obecności 0,004 μmol /ml CAPE obniżyła się do 44%, a w obecności 0,04 μg /ml – do 5% w odniesieniu do wartości początkowej. Autorzy dowiedli, że apoptoza komórek ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej zachodziła w wyniku fragmentacji DNA w połączeniu z uwalnianiem cytochromu C, unieczynnianiu kaspazy 3 i innych elementów mitochondriów komórkowych.

**Ryc. 3.** Wpływ stężenia CAPE na apoptozę komórek ludzkiego raka jelita grubego SW480 (wg 18)



Ryc. 4. Wpływ CAPE na zdolność namnażania komórek ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej U937 (wg 19)



Ryc. 5. Wpływ CAPE na przerzuty komórek wszczepialnego glejaka szczurzego C6 do płuc myszy (wg 21)

Badania Szliszki i wsp. (20) wykazały, że CAPE charakteryzuje się umiarkowaną aktywnością cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych HeLa powodujących raka szyjki macicy. Związek ten obniżał liczbę komórek HeLa o 5,9%. W obecności czynnika TRAIL, aktywującego apoptozę, obniżenie liczby żywych komórek wspomnianego nowotworu wynosiło 50%, a zatem wzrosło 8,5-krotnie.

Warto także przytoczyć wyniki badań Lin i wsp. (21) dotyczące wpływu CAPE na hamowanie przerzutów komórek wszczepialnego glejaka szczurzego C6 do płuc myszy. Komórki glejaka podawano myszom drogą dożylną w ilości 10^6 /zwierzę i dwukrotnie podawano im CAPE tą samą drogą w ciągu dwóch kolejnych dni. Masę płuc badanych zwierząt określano po upływie 4 tygodni. Wyniki badań przedstawione na rycinie 5 wskazują, że CAPE hamuje przerzuty komórek nowotworowych do płuc. W przypadku stężenia CAPE w wysokości $10 \mu\text{mol}$ /zwierzę zahamowanie kolonizacji glejaka C6 w płucach myszy wzrosło prawie dwukrotnie w porównaniu ze zwierzętami nieleczonymi. Świadczy to o przeciwnowotworowych właściwościach CAPE. I co bardzo ważne, nie uszkadza on normalnych komórek organizmu, co stwarza możliwości wykorzystania go w praktyce medycznej.

El-Rafaei i El-Naa (22) badali wpływ CAPE na aktywność angiogenną i apoptotyczną surowicy krwi myszy z wszczepionym rakiem Ehrlicha. Po wszczepieniu podskórnym nowotworu czterem grupom myszy, jedną z nich pozostawiono nieleczoną (kontrola), a trzem pozostałym podawano w miejsce wszczepienia CAPE w dawkach 5, 10 i 15 mg/kg m.c. co 5 dni przez 50 dni. Następnie w surowicy krwi zwierząt oznaczano poziom międzykomórkowej metaloproteiny-9, jako wskaźnika aktywności angiogennej, oraz poziom endostatyny, jako wskaźnika aktywności apoptotycznej. Badania wykazały, że najsilniejsze działanie wykazywało CAPE w dawce 15 mg/kg m.c. (tab. 8). Pod wpływem CAPE poziom metaloproteiny-9 po zakończeniu badań obniżył się o 78,1%, a poziom endostatyny wzrósł o 35,7% w porównaniu ze zwierzętami nieleczonymi (kontrolnymi), zbliżając się do poziomu obu tych wskaźników oznaczanych u zwierząt bez wszczepionego nowotworu (fizjologicznych). Świadczy to o przeciwnowotworowym działaniu CAPE.

Badano także wpływ CAPE na przeżywalność hodowli komórek ludzkiego astrogleju (nadmiernego patologicznego rozplemu swoistych komórek mózgowych) (23). Do tego celu użyto linii komórkowej SVGp12, na które działało CAPE w ilości 5-50 $\mu\text{mol/ml}$. Wykazano, że po 72 godzinach liczba komórek ludzkiego

Tab. 8. Wpływ CAPE na aktywność angiogenną i apoptotyczną surowicy krwi myszy z wszczepionym rakiem Ehrlicha (wg 22)

Grupy zwierząt	Aktywność metaloproteiny-9 (ng/ml)	Aktywność endostatyny (ng/ml)
Bez wszczepionego nowotworu (fizjologiczna)	130,9	2,2
Z wszczepionym nowotworem (nieleczona, kontrolna)	181,9	1,4
Z wszczepionym nowotworem (leczona CAPE, 15 mg/kg m.c.)	142,1	1,9

astrogleju zmniejszyła się w obecności najwyższej dawki CAPE (50 $\mu\text{mol/ml}$) o 74,2%. A zatem CAPE wyraźnie hamował rozwój badanych komórek nowotworowych.

CAPE odznacza się działaniem na nowotwory jamy ustnej. Kuo i wsp. (24) podają, że w stężeniu 72,1 $\mu\text{mol/ml}$ hamował on wzrost hodowli komórkowej raka płaskokomórkowego jamy ustnej i gardła linii TW2.6. Nowotwór ten w większości przypadków, po zaatakowaniu jamy ustnej, gardła, krtani i tchawicy, źle rokuje i odznacza się wysoką śmiertelnością. Warto dodać, że podawanie dootrzewnowe CAPE myszom w dawkach 10-30 mg/kg m.c. przez 7 dni nie wywoływało działania toksycznego i nie obniżało masy ciała zwierząt.

Wykazano, że CAPE charakteryzuje się silnym działaniem na komórki ludzkiego raka sutka MCF-7 (25). Związek ten w stężeniu IC_{50} ($\mu\text{mol/ml}$) po 48-godzinnej ekspozycji okazał się w ok. 71% cytotoksyczny, zmniejszał o około 80% namnażanie komórek i obniżał o ok. 72% ich przeżywalność (tab. 9).

Budisan i wsp. (26) oceniali oddziaływanie CAPE na komórki dwóch linii nowotworów okrężnicy, a mianowicie RKO i HCT-116. W wyniku badań ustalono, że zahamowanie namnażania komórek, ich ruchliwość i zjadliwość oraz stymulowanie apoptozy i autofagii pod wpływem CAPE było znacznie silniejsze w odniesieniu do linii komórkowej HCT-116 ($\text{IC}_{50} = 3,3 \mu\text{mol/ml}$) niż w odniesieniu do linii komórkowej nowotworu

okrężnicy RKO ($\text{IC}_{50} = 36,9 \mu\text{mol/ml}$). Oznacza to, że w przypadku linii komórkowej HCT-116 aktywność biologiczna ujawniła się przy ponad 10-krotnie mniejszym stężeniu CAPE w porównaniu z linią komórkową RKO tego nowotworu.

Warto także przytoczyć kilka publikacji wskazujących na kompleksowe działanie CAPE z innymi lekami przeciwnowotworowymi. Balkhi i wsp. (27) donoszą o wspomaganie przez CAPE działania Dasatinibu (DSB), leku stosowanego w terapii glejaka, w modelu zwierzęcym (27). W doświadczeniu użyto szczurów, u których wywoływano, na drodze iniekcji hodowli komórek linii szczurzego glejaka C6, objawy podobne do glejaka ludzkiego. Następnie leczono je za pomocą CAPE oraz CAPE i DSB, w dawkach 10 mg/kg m.c., przez 21 dni. Po zakończeniu doświadczenia w wątrobie zwierząt oznaczano poziom progresywnych czynników nowotworowych. Stopień zmian tych czynników pod wpływem CAPE oraz CAPE i DSB przedstawiono w tabeli 10. Wyniki wskazują, że podawanie CAPE zwierzętom z glejakiem powodowało u nich wzrost komórkowego antygenu przeciwnowotworowego (p53) o 31,8%, obniżenie receptora wzrostu epidermalnego (EGFR) o 77,1%, obniżenie markera namnażania komórkowego (PCNA) o 54,8% oraz obniżenie poziomu białka szlaku sygnałowego (AKT) o 83,3%. Natomiast łączne podawanie szczurom CAPE i DSB zwiększyło poziom progresywnych czynników nowotworowych odpowiednio do 86,4; 97,1; 87,5 i 88,7%. Średnia zmian tych czynników w przypadku CAPE wynosiła 61,8%, a w przypadku CAPE i DSB kształtowała się na poziomie 88,7%, stąd wniosek, że CAPE wyraźnie wspomaga skuteczność przeciwnowotworowego działania DSB i w sumie ich wspólne działanie na glejaka jest blisko o 30% wyższe.

Inne badania wykazały, że CAPE wzmacnia działanie leku przeciwnowotworowego cyklodekstryny γ (28). Badaniami objęto dwie hodowle komórkowe nowotworów ludzkich, a mianowicie raka płuca A-549 i włóknakiomięsaka HT-1080.

Tab. 9. Działanie CAPE na hodowlę komórkową ludzkiego raka sutka MCF-7 (wg 25)

Aktywność biologiczna	Stężenie IC_{50} ($\mu\text{mol/ml}$) maksymalnie obniżające aktywność (%)*
Cytotoksyczność	70,5
Namnażanie	79,9
Przeżywalność	71,9

*Po działaniu na hodowlę komórkową CAPE w stężeniu IC_{50} ($\mu\text{mol/ml}$) przez 48 godz.

Tab. 10. Przeciwnowotworowe działanie CAPE i Desatinibu (DSB) w modelu zwierzęcym (wg 27)

Progresywne czynniki nowotworowe	Stopień zmian (%) czynnika pod wpływem leku	
	CAPE	CAPE + DSB
Komórkowy antygen przeciwnowotworowy (p53)	31,8 \uparrow	86,4 \uparrow
Receptor wzrostu epidermalnego (EGFR)	77,1 \downarrow	97,1 \downarrow
Marker namnażania komórkowego (PCNA)	54,8 \downarrow	83,9 \downarrow
Białko szlaku sygnałowego (AKT)	83,3 \downarrow	87,5 \downarrow
Średnia zmian (%)	61,8	88,7

Do hodowli tych nowotworów dodano CAPE w ilości 20 $\mu\text{mol/ml}$ oraz kompleks CAPE i cyklodekstryny γ (obie substancje w ilości po 20 $\mu\text{mol/ml}$). Inkubację próbek prowadzono przez 48 godz.

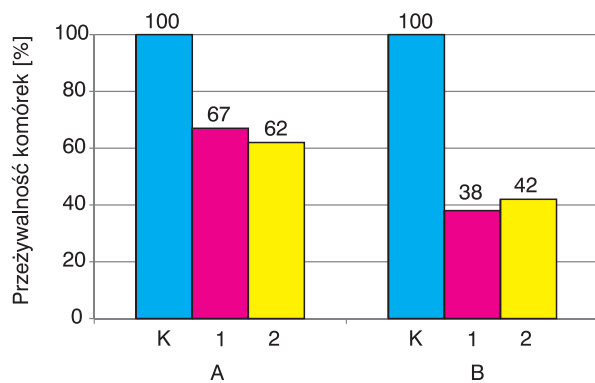
Wyniki przedstawione na rycinie 6 wskazują, że kompleks CAPE i cyklodekstryny γ obniżał liczbę komórek raka płuca A-549 o 43% w porównaniu z CAPE, jak również obniżał liczbę komórek włókniakomięsaka HT-1080 o 32% w porównaniu z CAPE. A zatem można stwierdzić, że CAPE wyraźnie zwiększa działanie cytostatyczne cyklodekstryny γ .

I jeszcze kolejny przykład wspomagania przez CAPE przeciwnowotworowego działania leków. Matsunaga i wsp. (29) dowiedli, że CAPE wraz z doksorubicyną, a także z cisplatyną, działa silniej na komórki ludzkiego nowotworu żołądka w porównaniu z wymienionymi lekami stosowanymi samodzielnie. W badaniach użyto hodowli komórkowej raka żołądka MKN45, do której dodawano doksorubicynę w stężeniu 20 $\mu\text{mol/ml}$, doksorubicynę i CAPE w stężeniach 20 $\mu\text{mol/ml}$, cisplatynę w stężeniu 100 $\mu\text{mol/ml}$ oraz cisplatynę i CAPE odpowiednio w stężeniach 100 i 20 $\mu\text{mol/ml}$. Wyniki badań zilustrowane na rycinie 7 wskazują, że połączenie doksorubicyny z CAPE obniżało przeżywalność komórek nowotworowych o 45%, a połączenie

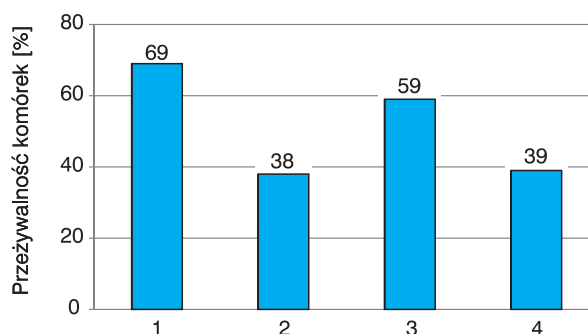
cisplatyny z CAPE obniża ich przeżywalność o 34% w porównaniu z wymienianymi lekami przeciwnowotworowymi stosowanymi samodzielnie. Wśród mechanizmów przeciwnowotworowego działania zastosowanych w doświadczeniu leków wymienia się apoptozę, wolne rodniki ponadtlenkowe oraz zaburzenie funkcji proteazomowej komórek.

Podsumowanie

Z powyższego przeglądu piśmiennictwa wynika, że CAPE odznacza się dość znaczną aktywnością cytostatyczną (0,001-100 $\mu\text{mol/ml}$) wobec wielu linii komórek nowotworów zwierzęcych i ludzkich, co udowodniono na drodze badań prowadzonych *in vitro* (hodowle komórkowe) i *in vivo* (zwierzęta doświadczalne). Przeprowadzone badania wskazują, że głównym mechanizmem działania CAPE na komórki nowotworowe jest wywoływanie w nich procesu apoptozy (zaprogramowana śmierć). Przedstawione dane piśmiennictwa, odnośnie działania CAPE na komórki nowotworowe, stwarzają możliwości wykorzystania tego związku w praktyce medycznej, zarówno jako samodzielnego preparatu przeciwnowotworowego, jak i wspomagającego działanie innych leków przeciwnowotworowych.



Ryc. 6. Działanie CAPE oraz kompleksów CAPE i cyklodekstryny γ na hodowle komórkowe nowotworów ludzkich (wg 28) K – kontrola, 1 – rak płuca A 549, 2 – włókniakomięsak HT-1080 A – CAPE (20 $\mu\text{mol/ml}$), B – CAPE + cyklodekstryna γ (po 20 $\mu\text{mol/ml}$)



Ryc. 7. Działanie CAPE oraz CAPE łącznie z doksorubicyną i cisplatyną na hodowlę komórkową raka żołądka MKN45 (wg 29)

1 – doksorubicyna (20 $\mu\text{mol/ml}$), 2 – doksorubicyna (20 $\mu\text{mol/ml}$ + CAPE [20 $\mu\text{mol/ml}$]), 3 – cisplatyna (100 $\mu\text{mol/ml}$), 4 – cisplatyna (100 $\mu\text{mol/ml}$ + CAPE [20 $\mu\text{mol/ml}$]) Inkubację wymienionych substancji z hodowlą raka żołądka prowadzono przez 48 godz.

Piśmiennictwo

- Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K i wsp. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 1988; 44:230-2.
- Rao CV, Desai D, Simi B i wsp. Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. *Cancer Res* 1993; 53:4182-8.
- Rao CV, Desai D, Kaul B i wsp. Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. *Chem Biol Interact* 1992; 84:277-90.
- Rao CV, Desai D, Rivenson A i wsp. Chemoprevention of colon carcinogenesis by phenylethyl-3-methylcaffeate. *Cancer Res* 1995; 55:2310-5.

5. Huang M-T, MaW, Yen P i wsp. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in mouse skin and the synthesis of DNA, RNA and protein in Hela cells. *Carcinogenesis* 1996; 17:761-5.
6. Banskota AH, Nagaoka T, Sumioka LY i wsp. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell Lines. *J. Ethnopharmacol* 2002; 80:67-73.
7. Usia T, Banskota AH, Tezuka Y i wsp. Constituents of Chinese Propolis and their antiproliferative activities. *J Nat Prod* 2002; 65:673-6.
8. Borelli F, Izzo AA, Di Carlo G i wsp. Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. *Fitoterapia* 2002; 73(supl. 1):S38-S43.
9. Liao HF, Chen YY, Liu JJ i wsp. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis. *J Agric Food Chem* 2003; 51:7907-12.
10. Lee Y-J, Kuo H-C, Chu C-Y i wsp. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK I caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Biochem Pharmacol* 2003; 66:2281-9.
11. Chung T-W, Moon S-K, Chang Y-C i wsp. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanisms. *FASEB J* 2004; 18:1670-81.
12. Chen C-N, Weng M-S, Wu C-L i wsp. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *Evid Based Complement Alternat Med* 2004; 1:175-85.
13. Oršolič N, Knežević AH, Šverl I i wsp. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J Ethnopharmacol* 2004; 94:307-15.
14. Oršolič N, Trezič S, Mihajlevič Ž i wsp. Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biol Pharm Bull* 2005; 28:1928-33.
15. Lee Y-T, Don M-J, Hung P-S i wsp. Cytotoxicity of phenolic acid phenethyl esters on oral cancer cells. *Cancer Lett* 2005; 23:19-25.
16. Jin UH, Chung TW Kang SA i wsp. Caffeic acid phenethyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: isolation and identification. *Clin Chim Acta* 2005; 362:57-64.
17. Hwang HJ, Park HJ, Chung HJ i wsp. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on cancer cell metastasis mediated by the down-regulation of matrix metalloproteinase expression in human HT 1080 fibrosarcoma cells. *J Nutr Biochem* 2006; 17:356-62.
18. He Y-J, Liu B-H, Xiang D-B i wsp. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of SW480 colorectal tumor cells involves β -catenin associated signaling pathway down-regulation. *World J Gastroenterol* 2006; 12:4981-5.
19. Jin U-H, Song K-H, Motumara M i wsp. Caffeic acid phenethyl ester induces mitochondria-mediated apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells. *Mol Cell Biochem* 2008; 310:43-8.
20. Szliszka E, Czuba ZP, Domino M i wsp. Ethanolic extract of propolis (EEP) enhances the apoptosis – inducing potential of TRAIL in cancer cells. *Molecules* 2009; 14:738-54.
21. Lin W-L, Liang W-H, Lee Y-J i wsp. Antitumor progression potential of caffeic acid phenethyl ester involving p75^{NTR} in C6 glioma cells. *Chem Biol Interact* 2010; 188:607-15.
22. El-Rafaei MF, El-Naa MM. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on mice bearing tumor involving angiostatic and apoptotic activities. *Chem-Biol Interact* 2010; 186:152-6.
23. Markiewicz-Żukowska R, Car H, Naliwajko SK i wsp. Ethanolic extract of propolis, chrysin, CAPE inhibit human astroglia cells. *Adv Med Sci* 2012; 57(2):208-16.
24. Kuo Y-Y, Jim W-T, Su L-C i wsp. Caffeic acid phenethyl ester is a potential therapeutic agent for oral cancer. *Int J Mol Sci* 2015; 16:10748-66.
25. Kabala-Dzik A, Rzepecka-Stojko A, Kubina R i wsp. Caffeic acid versus caffeic acid phenethyl ester in the treatment of breast cancer MCF-7 cells: migration rate inhibition. *Integr Cancer Ther* 2018; 17(4):1247-59.
26. Budisan L, Gulei D, Jurj A i wsp. Inhibitory effect of CAPE and kaempferol in colon cancer cell lines-possible implications in new therapeutic strategies. *Int J Mol Sci* 2019; 20:1199-2017.
27. Balkhi HM, Haq E, Gul T i wsp. Anti-glioma effects of caffeic acid phenethyl ester and Dasatinib combination therapy *in vivo* rat glioma model. *Anti-Canc Agents Med Chem* 2018; 18:1729-35.
28. Ishida Y, Gao R, Shah N i wsp. Anticancer activity in honeybee propolis: Functional insights to the role of caffeic acid phenethyl ester and its complex with γ -cyclodextrin. *Integr Cancer Ther* 2018; 17(3):867-73.
29. Matsunaga T, Tsuchimura S, Azuma N i wsp. Caffeic acid phenethyl ester potentiates gastric cancer cell sensitivity doxorubicin and cisplatin by decreasing proteasome function. *Anti-Cancer Drugs* 2019; 30:251-9.

Konflikt interesów**Conflict of interest**

Brak konfliktu interesów
None

otrzymano/received: 03.03.2020

zaakceptowano/accepted: 18.03.2020

Adres/address:

*mgr farm. Elżbieta Holderna-Kędzia
Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich
ul. Wojska Polskiego 71B, 60-630 Poznań

tel. (61) 84-55-867

e-mail: bogdan.kedzia@iwnirz.pl