

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ

**ABORDĂRI INOVATIVE ÎN TRATAMENTUL TUMORILOR
CEREBRALE ASTROCITARE: TERAPIA MOLECULARĂ ȘI
APOPTOZA CELULARĂ**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

Prof. Univ. Dr. Doina Cârstea

STUDENT-DOCTORAND:

Dr. Ada Maria Georgescu

CRAIOVA

2018

Cuprins

INTRODUCERE	Error! Bookmark not defined.
DIAGNOSTICUL GLIOBLASTOAMELOR.....	Error! Bookmark not defined.
2.TRATAMENTUL GLIOBLASTOAMELOR	Error! Bookmark not defined.
2.1 MANAGEMENTUL CHIRURGICAL	Error! Bookmark not defined.
2.2 RADIOTERAPIA.....	Error! Bookmark not defined.
2.3 CHIMIOTERAPIA	Error! Bookmark not defined.
2.4 TERAPIA ȚINTITĂ MOLECULAR	Error! Bookmark not defined.
2.5 PRODUȘI DYE NATURALI.....	Error! Bookmark not defined.
CONTRIBUTII PERSONALE	3
OBIECTIVELE STUDIULUI.....	4
3.MATERIALE SI METODE	Error! Bookmark not defined.
3.1 LINII ȘI CULTURI CELULARE	Error! Bookmark not defined.
3.2 TRATAMENT ȚINTIT MOLECULAR	Error! Bookmark not defined.
3.3 ANALIZA EFECTULUI TRATAMENTULUI	Error! Bookmark not defined.
3.5 ANALIZA STASTISTICĂ.....	36
4. REZULTATE	Error! Bookmark not defined.
4.1 EFECTELE COLORANȚILOR NATURALI SI SINTETICI ASUPRA LINIILOR CELULARE DE GBM	Error! Bookmark not defined.
4.2 EFECTUL TRATAMENTULUI CU CURCUMINA ASUPRA LINIILOR DE GBM PRIMARE SI CORELAȚII CU VITEZA DE CREȘTERE ȘI TIMPUL DE DUBLARE AL ACESTORA	Error! Bookmark not defined.
4.3 EFECTUL TRATAMENTULUI TINTIT MOLECULAR ANTI-EGFR ASUPRA VIABILITATII LINIILOR CELULARE DE GBM SI ASUPRA ACTIVARII CASPAZELOR	Error! Bookmark not defined.
4.4 EFECTUL EXTRACTULUI HIDROALCOOLIC DE LIGUSTRUM VULGARE IN MONOTERAPIE SAU IMPREUNA CU TEMOZOLOMIDA ASUPRA LINIILOR CELULARE DE GBM	Error! Bookmark not defined.
5. DISCUȚII.....	Error! Bookmark not defined.
6. CONCLUZII.....	8
REFERINTE	Error! Bookmark not defined.

Cuvinte cheie: Glioame de grad înalt, Curcimină, Heliantină, Temozolomidă, *Ligustrum Vulgare*

STADIUL CUNOAȘTERII

Există la aceasta ora relatate în literatură de specialitate, peste 120 de tipuri de tumori ale sistemului nervos cerebro-spinal. Aceste tumori se formează în zone diferite, se dezvoltă din diferite tipuri de celule și pot avea diferite opțiuni de tratament. Tumorile astrocitare provin din celulele numite astrocite și sunt cele mai frecvente tipuri de cancere cerebrale. Astrocitoamele alcătuiesc aproximativ 80% din tumorile cerebrale și aproximativ 75% dintre ele sunt reprezentate de glioblastoame (GBM), tumori de grad înalt, extrem de agresive.

În ciuda numărului ridicat de descoperiri făcute în oncologie, supraviețuirea pacienților cu GBM a rămas neschimbată în ultimii ani. Diagnosticul timpuriu anevoios, datorat în principal simptomatologiei nespecifice, heterogenitatea ridicată a populațiilor tumorale întâlnită în cadrul aceleiași tumori, incapacitatea mării majorității agenților terapeutici să străbată bariera hematoencefalică (BHE), fapt care limitează opțiunile terapeutice, au avut o contribuție majoră la progresul deosebit de lent al dezvoltării de noi tratamente pentru această formă de cancer. Un pas important ar fi elucidarea mecanismelor intrinseci care îi conferă GBM fenotipul său deosebit de agresiv caracterizat de progresia rapidă, rezistența la tratament și heterogenitatea ridicată. Progresia galopantă are ca promotor principal evoluția somatică, un proces bazat pe acumularea progresivă de mutații care îi conferă celulei canceroase caracteristici din ce în ce mai diferite de cele ale unei celule sănătoase. Această evoluție implică receptorii tirozinkinazici (RTK) și liganzii acestora, fiind cunoscut rolul deosebit de important al acestora în diviziunea accelerată, invazia țesuturilor din jur, inițierea angiogenezei tumorale, inhibarea apoptozei și metastazare la distanță. Diferiți agenți terapeutici care țintesc aceste structuri celulare au produs un impact major în tratamentul altor neoplazii cum ar fi cancerul de colon, cancerul bronhopulmonar fără celule mici sau melanom. Din nefericire, rezultatele nu au putut fi transpuse și în cazul gliomelor maligne unde supraviețuirea, progresia liberă de boală și calitatea vieții pacienților nu au fost cu mult îmbunătățite de introducerea acestor noi terapii. O abordare care devine din ce în ce mai populară este folosirea de produși naturali ca tratament complementar în diferite forme de cancer. Compușii naturali extrași din plante sunt utilizați din ce în ce mai mult în tratamentul cancerului, în special sub formă de medicamente chemoterapeutice. Foarte multe dintre medicamentele antineoplazice utilizate în ultimele decenii sunt obținute direct din plante sau sunt produse sintetice derivate din compuși naturali. Medicamentele cum ar fi alcaloizii de vinca (vincristina, vinblastina, vinorelbina și vindesina) sunt extrași din *Catharanthus Roseus*, taxanii (paclitaxel) sunt extrași din coaja copacului de drojdie din Pacific, inhibitorii topoizomerazei I și II (irinotecan extras din arborele ornamental chinezesc Camptotheca acuminata și etoposid extras din mandarina sălbatică *Podophyllum peltatum*) s-au dovedit printre cele mai eficiente medicamente anticanceroase. Alte medicamente, cum ar fi catechinele (3-gal-epigallocatechina) extrase din ceaiul verde, izotiocianatele găsite în legume crucifere, izoflavone (pomiferina) au demonstrat că posedă efecte anti-tumorale, atât în experimente *in vitro*, cât și *in vivo*

Curcumina (diferulolmetan) este un polifenol derivat din rizomul plantei *Curcuma Longa*, cunoscută sub denumirea de curcuma. Turmericul a fost folosit din timpuri străvechi (în urmă cu peste 2000 de ani) în medicina indiană ayurvedică pentru tratarea unei game largi de tulburări precum infecții, arsuri, alergii, reumatism, tulburări hepatice plus multe altele [1, 2]

CONTRIBUTII PERSONALE

OBIECTIVELE STUDIULUI

Obiectivul nr. 1 Efectele compușilor dye naturali și sintetici asupra liniilor celulare de GBM. Compușii dye sunt produși naturali (curcumină, quercetin) sau sintetici (helianthină, galben de metil, roșu de metil) care reprezintă o nouă categorie promițătoare de medicamente antitumorale. În ultimii ani, aceste substanțe au captat atenția comunității științifice datorită efectului lor citotoxic asupra celulelor maligne, precum și profilului lor toxic favorabil *in vivo*.

În studiul nr. 1 am investigat capacitatea curcuminei și a heliantinei de a inhiba creșterea celulelor de gliom malign *in vitro*. Celulele au fost expuse la doze progresive de curcumină și, respectiv, heliantină. Concentrațiile celor doi compuși coloranți studiați au variat între 0,1 μM până la 150 μM . Ratele de proliferare au fost evaluate la 3 zile după tratament, prin efectuarea testului MTT.

Obiectivul nr. 2. Efectul tratamentului cu curcumina asupra liniilor de GBM primare și corelații cu viteza de creștere și timpul de dublare al acestora

Curcumina este un colorant natural galben-portocaliu care a prezentat toxicitate minimă la om, fiind considerat sigur pentru utilizarea umană; nu a fost raportată nici o toxicitate asociată cu administrarea medicamentului în doze de până la 10 g/zi. Am analizat, de asemenea, efectul curcuminei asupra a trei linii celulare de glioblastom cu pasaj scăzut: GB3B, GB4B și GB5B. Pentru a examina efectul medicamentului asupra viabilității celulare, celulele au fost expuse la doze crescânde de curcumină (0,1, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 și 150 μM) timp de trei zile și efectul inhibitor a fost cuantificat prin numărarea celulelor folosind un hemocitometru Burker.

Obiectivul nr. 3 Efectul tratamentului țintit molecular anti-EGFR asupra viabilității liniilor celulare de GBM și asupra activării caspazelor

Ca urmare a cauzei dereglării frecvente a EGFR în HGG, acest receptor reprezintă o țintă terapeutică promițătoare în aceste tumori. AG556 este un inhibitor sintetic cu moleculă mică al activității EGFR. În cadrul studiului nr. 3, am investigat capacitatea acestei substanțe de a inhiba creșterea celulelor HGG *in vitro*. Pentru acest deziderat au fost efectuate teste de proliferare a celulelor MTT pe trei linii celulare HGG: 8, 18 și 38. Celulele au fost expuse la doze progresive de AG556 (10 μM , 20 μM , 30 μM) și efectul citotoxic al inhibitorului a fost evaluat după trei zile.

Obiectivul nr. 4 Efectul extractului hidroalcoolic (EHAL) de *Ligustrum Vulgare* (LV) în monoterapie sau împreună cu Temozolomidă asupra liniilor celulare de GBM.

În cadrul studiului nr. 4 am analizat efectul EHAL de LV pe un număr de patru linii celulare derivate din tumori cerebrale, *in vitro*. Mai departe, am analizat efectul combinației dintre EHAL de LV și agentul chimoterapic TMZ în cele patru linii celulare.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Modificările genetice frecvente ale gliomului au ca rezultat activarea aberantă a căilor mitogene de semnalizare, care guvernează proliferarea celulară, supraviețuirea celulară (apoptoza și necroza), invazia și angiogeneza. În tumorile cerebrale de grad înalt, proto-oncogenă cel mai frecvent activată prin amplificare sau mutații este EGFR, astfel, o serie de inhibitorii specifici receptorului EGFR sunt în curs de dezvoltare sau în studiile clinice pentru tratamentul GBM. Cea mai comună formă mutantă a EGFR în GBM este varianta receptorului III (EGFRvIII), care prezintă activitate constitutivă, independentă de ligand. În plus, prezenta EGFRvIII a fost asociată cu creșterea tumorigenezei celulelor GBM umane prin reducerea apoptozei și creșterea proliferării.

Studiile anterioare arată că atât curcumina cât și heliantina interacționează cu EGFR, diminuându-i activitatea. În studiul nostru am analizat efectul antiproliferativ și apoptotic al tratamentului cu curcumină și heliantină asupra liniei celulare de GBM cu pasaj scăzut GB10B *in vitro*. Avantajul major al acestei abordări este disponibilitatea ridicată a acestor produși, profilul toxic deosebit de scăzut și costurile scăzute care implică un astfel de tratament. De cele mai multe ori, protocoalele clinice sunt precedate de studii preclinice de citotoxicitate utilizând liniile celulare imortalizate. Cu toate acestea, liniile celulare imortalizate sunt adesea incapabile să reproducă caracteristicile originale ale tumorii. De asemenea, liniile celulare cu pasaj înalt tind să acumuleze o serie de mutații genetice, modificări ale morfologiei celulelor, modificări ale ratei de proliferare și expresie a proteinelor, făcându-le disfuncționale [3, 4]. În acest studiu am folosit o linie GBM cu pasaj scăzut obținută în laboratorul nostru din țesutul tumoral proaspăt.

Efectul antiproliferativ maxim al medicamentului a fost obținut la doza de 100 μ M și a determinat o reducere a viabilității celulare până la 77%. Această concentrație de curcumină de 100 μ M este considerată sigură deoarece turmericul este folosit în dieta indiană de mii de ani și nu a demonstrat nici o toxicitate atunci când este administrat în doze de până la 10 g pe zi.

Spre deosebire de curcumină, unde efectul anti-neoplazic al compusului a fost intens studiat atât *in vitro* cât și *in vivo*, heliantina a fost studiată până acum doar pe linii celulare de gliom de grad înalt *in vitro*. Studiile noastre anterioare au arătat că heliantina a indus apoptoza în mai multe culturi de celule gliom de grad înalt [5]. În studiul actual, am descoperit că 100 μ M heliantină a indus o scădere drastică a viabilității celulare, ucigând 85% din celulele GB10B. Astfel, datele noastre au arătat că heliantina a avut un efect citotoxic mai mare asupra celulelor GB10B în comparație cu compusul natural curcumină. În concordanță cu lucrarea noastră anterioară, am observat că 1 μ M heliantină a ucis aproximativ 40% din celulele noastre GB10B [5].

Caspazele sunt o familie de endoproteaze care asigură legături critice în rețelele de reglementare celulară care controlează moartea celulară programată sau apoptoza. Este cunoscut faptul că celulele GBM prezintă o dereglare a mecanismelor implicate în reglarea apoptozei. [6]

În lucrarea noastră am investigat, de asemenea, capacitatea curcuminei și a heliantinei de a induce apoptoza în celulele GB10B. Este deja cunoscut faptul că curcumina este capabilă să inducă apoptoza în GBM prin activarea proteinelor pro-apoptotice și inhibarea semnalelor anti-apoptotice. De asemenea, medicamentul este implicat în activarea autofagiei non-apoptotice, inducerea semnalizării cascadei de diferențiere, inhibarea metaloproteinazelor matriceale (MMPs) și a expresiei genice a transportorului glucozo-6-fosfatului (G6PT) și, de asemenea, activarea căilor proteolitice [7-9]. În acest studiu am observat că, după tratarea celulelor GB10B cu curcumină, caspaza 3 s-a activat la 12 ore după tratament și a rămas activă până la 48 ore după administrarea medicamentului. Caspaza 8 a fost activă de la 4 ore până la 12 ore după administrarea de curcumină în timp ce caspaza 9 a devenit activată la 4 ore după administrarea medicamentului și a rămas activată până la 48 de ore după administrarea curcuminei.

În studiile noastre anterioare am raportat că tratamentul cu heliantină a fost asociat cu degradarea PARP fără a afecta expresia proteică a Bcl-2 în linii celulare de gliom de grad înalt [5]. În studiul de față am observat că heliantina a activat caspaza 3 în celule GB10B doar la 12 ore după administrarea medicamentului. Caspaza 8 a devenit activă la 4 ore după administrarea medicamentului și a rămas activă până la 48 ore după. Spre deosebire de caspaza 3 și 8, a fost detectată activarea timpurie a caspazei 9 (la 4 ore după tratament), activitatea crescând succesiv până la sfârșitul tratamentului. Aceste rezultate sugerează că tratamentul cu curcumină și heliantină pot induce moartea celulară programată în celule GB10B, atât prin activarea căilor apoptotice extrinseci, cât și a celor intrinseci. Cu toate acestea, sunt necesare studii suplimentare pentru a înțelege mai bine mecanismele apoptotice induse de această clasă de substanțe în GBM.

Pentru a evalua efectul tratamentului cu curcumină și modul în care acesta se corelează cu viteza de creștere și timpul de dublare (DT), am utilizat în studiul nostru trei linii celulare primare cu pasaj scăzut, izolate din tumori GBM (GB3B, GB4B și GB5B). Rata de proliferare a fost aproximativ aceeași pentru toate cele trei linii celulare. De fapt, s-a constatat că DT a celulelor GB3B este mai mică decât cea a GB4B și cu o durată de 10 ore mai mică decât GB5B, dar diferența dintre acestea nu a fost statistic semnificativă. Toate liniile celulare studiate au răspuns într-o manieră dependentă de doza tratamentului. Cea mai scăzută concentrație de curcumină care a determinat moartea celulelor GBM a fost de 1 μ M pentru toate liniile celulare, citotoxicitatea fiind de 4%. Cele mai mari concentrații de curcumină utilizate în studiul nostru au fost 150 μ M care au redus drastic viabilitatea celulelor până la 24,5% în GB3B, la 11,8% în linia GB4B și 11% în celule GB5B.

Studii preclinice au arătat că este posibil să se anticipeze răspunsul celular la tratamentul medicamentos cu curcumină corelarând IC50 cu măsurători ale DT pentru fiecare linie celulară [10]. Din păcate, nu am observat o corelație statistic semnificativă între valorile IC50 ale curcuminei și DT ($P = 0,2$, $P = 0,552$) pentru liniile celulare de GBM utilizate în acest studiu. De exemplu, linia celulară GB4B care a arătat valoarea IC50 cea mai ridicată, nu a prezentat DT diferit comparație cu liniile GB3B și GB5B. Mai mult, linia celulară GB5B care prezintă cel mai lung DT nu a fost cea mai puțin sensibilă la curcumină. Mecanismul de acțiune al curcuminei asupra celulelor GB poate explica probabil acest rezultat. Se cunoaște că mai mulți agenți anti-neoplazici țințiți acționează prin inactivarea unor structuri legate de supraviețuirea celulară malignă (de exemplu, receptori de factor de creștere, activatori de apoptoză etc.) care nu pot fi direct legate de rata de proliferare sau de DT. În acest context, moartea celulară indusă de curcumină în cazul celulelelor gliomului malign s-ar putea explica prin interferența agentului terapeutic cu structurile vitale implicate în creșterea și progresia tumorală.

În cea de-a doua parte a studiului, am analizat dacă AG556 este capabil să activeze caspazele 3, 8 și 9 în liniile celulare 8, 18 și 38. Pentru experimentele noastre am folosit 3 linii celulare de tumori imortalizate de grad înalt: 8, 18 și 38. Celulele HGG au răspuns în mod dependent de doză la inhibarea EGFR folosind AG556. În linia celulară 18, efectul citotoxic al AG556 30 μM a fost de 36%, în timp ce în linia 38, scăderea supraviețuirii celulare a fost de aproximativ 26,5%. Cel mai puternic efect citotoxic al dozei de 30 μM AG556 a fost obținut în linia celulară 8, acesta fiind de 38,3%.

În timp ce tratamentul cu AG556 a activat caspaza 3 în toate cele 3 linii celulare, la 3 ore după tratament și a rămas activ timp de 24 ore, tratamentul nu a reușit să activeze caspaza 8 în linia celulară 38. Cu toate acestea, în liniile celulare 18 și 8, administrarea AG556 a determinat activarea caspazei 8. Această protează a fost activată la 3 ore după tratament și a rămas activă până la 24 ore.

Mai multe studii au evidențiat rolul extractelor de plante medicinale în tratamentul cancerului [11]. În cadrul studiului nostru am descoperit că EHAL prezintă proprietăți inhibitorii asupra celulelor tumorale primare cerebrale, *in vitro*. Se cunoaște că speciile de ligustrum conțin diferite molecule active, cum ar fi: flavonoide, secoiridoide, mono- și triterpenoide, cumarine, acizi carboxilici polifenolici și derivați, lignani și proteine [12].

Pentru experimentul nostru, am utilizat patru culturi celulare cu pasaj scăzut derivate din tumori cerebrale primare: trei linii celulare derivate din HGG-GBM (GB1B, GB2B și GB8B) și o linie de celule derivate dintr-o tumoră LGG (astrocitom de gradul II)(AC1B).

Rezultatele studiului nostru au arătat că EHAL LV a indus moartea celulară în celulele gliale umane într-o manieră dependentă de timp și de doză. Celulele AC1B, de grad scăzut de astrocitom, au fost mai sensibile la tratamentul cu EHAL LV comparativ cu liniile de GBM GB1B, GB2B sau GB8B.

În studiul nostru, am constatat că tratamentul cu EHAL LV a indus activarea caspazei 3 în toate liniile celulare de GBM. Totuși, am observat că efectul tratamentului

a fost mai pronunțat în liniile celulare GB1B și AC1B, în care caspaza 3 a fost activată la 48h și 72 ore după administrarea EHALLV, în timp ce în liniile celulare GB2B și GB8B, caspaza 3 a fost activată numai la 48h după tratament. În celulele stem umane normale HUC-1, caspaza 3 a fost activată numai la 72 de ore după administrarea medicamentului.

Mai multe studii au raportat că folosirea concomitentă a diferiți compuși a avut un efect sinergic asupra citotoxicității tumorale și a prelungit supraviețuirea pacienților cu cancer cerebral. Gliadel (placa de carmustină), un polimer biodegradabil care conține agentul de alchilare bis-cloretil-nitrosouree (BCNU), în combinație cu radiații, chimioterapie și chirurgie, a produs rezultate în tratamentul gliomului malign de grad înalt [13]. De asemenea, rezultatele studiilor preclinice au sugerat că plantele medicinale în asociere cu TMZ au fost utile pentru tratamentul cancerului, inclusiv tumorile cerebrale [14].

Rezultatele noastre au arătat că EHALLV a avut un impact clar asupra viabilității celulelor tumorale cerebrale și, în mod adițional, combinația dintre EHALLV și TMZ a dus la un efect citotoxic amplificat, așa cum era de așteptat. Chiar dacă tratamentul combinat a fost mai puternic decât tratamentul în monoterapie, sunt necesare mai multe date pentru a sprijini eficiența combinației de medicamente.

CONCLUZII

Studiul nr. 1 Efectele coloranților naturali și sintetici asupra liniilor celulare de GBM.

Acest studiu demonstrează că tratamentul cu curcumină și heliantină induce moartea celulară în celulele GBM *in vitro*, iar heliantina prezintă o capacitate antiproliferativă superioară curcuminei. De asemenea, am constatat că tratamentul cu curcumină și heliantină a determinat activarea caspazei 3, 8 și 9 în celule GB10B. În acest moment, sunt necesare mai multe studii pentru a concluziona dacă curcumina și heliantină ar putea fi agenți chimioterapeutici eficienți *in vivo*.

Studiul nr. 2. Efectul tratamentului cu curcumină asupra liniilor de GBM primare și corelații cu viteza de creștere și timpul de dublare al acestora.

În cadrul studiului nostru, am constatat că curcumina ucide celulele GB *in vitro*, într-o manieră dependentă de doză. Din păcate, nu am observat o corelație statistic semnificativă între valorile IC50 și DT curcumină ($P = 0,2$, $P = 0,552$) pentru celulele GB utilizate în acest studiu.

Studiu nr. 3 Efectul tratamentului țintit molecular anti-EGFR asupra viabilității liniilor celulare de GBM și asupra activării caspazelor.

În lucrarea noastră am constatat că tratamentul cu AG556 a determinat efecte citotoxice similare în liniile celulare de gliom malign de grad înalt 18 și 8, în timp ce în linia celulară

38, eficiența medicamentului a fost mai limitată. Medicamentul a fost capabil să activeze caspazele 3, 8 și 9 în liniile celulare 18 și 8. În linia celulară 38 administrarea de AG556 a activat exclusiv caspaza 3 și 9, în timp ce caspaza 8 a rămas inactivă. Toate aceste experimente au demonstrat încă o dată că EGFR rămâne o țintă promițătoare în terapia HGG, iar inhibitorii cu molecule mici cum ar fi AG556, pot fi utilizați în terapii individualizate.

Studiul nr. 4 Efectul extractului hidroalcoolic de *Ligustrum Vulgare* în monoterapie sau împreună cu Temozolomida asupra liniilor celulare de GBM

Rezultatele noastre au arătat că EHAL a avut un impact clar asupra viabilității celulelor tumorale cerebrale și, în plus, combinația dintre EHAL LV și TMZ a dus la un efect citotoxic amplificat, așa cum era de așteptat. Chiar dacă tratamentul combinat a fost mai puternic decât tratamentul în monoterapie, sunt necesare mai multe date pentru a sprijini eficiența combinației medicamentoase.

REFERINȚE

1. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol* 2007; 595: 1-75.
2. Araujo MC, Antunes LM, Takahashi CS. Protective effect of thiourea, a hydroxyl-radical scavenger, on curcumin-induced chromosomal aberrations in an in vitro mammalian cell system. *Teratog Carcinog Mutagen* 2001; 21: 175-180.
3. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G et al. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 2005; 21: 1-26.
4. Chang-Liu CM, Woloschak GE. Effect of passage number on cellular response to DNA-damaging agents: cell survival and gene expression. *Cancer Lett* 1997; 113: 77-86.
5. Alexandru O, Dragutescu L, Tataranu L et al. Helianthin induces antiproliferative effect on human glioblastoma cells in vitro. *J Neurooncol* 2011; 102: 9-18.
6. Eisele G, Weller M. Targeting apoptosis pathways in glioblastoma. *Cancer Lett* 2013; 332: 335-345.
7. Nagai S, Kurimoto M, Washiyama K et al. Inhibition of cellular proliferation and induction of apoptosis by curcumin in human malignant astrocytoma cell lines. *J Neurooncol* 2005; 74: 105-111.
8. Kang SK, Cha SH, Jeon HG. Curcumin-induced histone hypoacetylation enhances caspase-3-dependent glioma cell death and neurogenesis of neural progenitor cells. *Stem Cells Dev* 2006; 15: 165-174.
9. Romero-Hernandez MA, Eguia-Aguilar P, Perezpena-DiazConti M et al. Toxic effects induced by curcumin in human astrocytoma cell lines. *Toxicol Mech Methods* 2013; 23: 650-659.
10. Fallahi-Sichani M, Honarnejad S, Heiser LM et al. Metrics other than potency reveal systematic variation in responses to cancer drugs. *Nat Chem Biol* 2013; 9: 708-714.

11. Ullah MF, Khan MW. Food as medicine: potential therapeutic tendencies of plant derived polyphenolic compounds. *Asian Pac J Cancer Prev* 2008; 9: 187-195.
12. Gao BB, She GM, She DM. Chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Ligustrum*. *Chem Biodivers* 2013; 10: 96-128.
13. Limentani SA, Asher A, Heafner M et al. A phase I trial of surgery, Gliadel wafer implantation, and immediate postoperative carboplatin in combination with radiation therapy for primary anaplastic astrocytoma or glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2005; 72: 241-244.
14. Mittal A, Tabasum S, Singh RP. Berberine in combination with doxorubicin suppresses growth of murine melanoma B16F10 cells in culture and xenograft. *Phytomedicine* 2014; 21: 340-347.