

Stacjonarne Studia Doktoranckie  
Genetyki Molekularnej, Cytogenetyki i Biofizyki Medycznej

# **Dominika Anna Komorowska**

## **Ocena skuteczności pochodnych stilbenowych w uwrażliwianiu komórek raka piersi na działanie promieniowania jonizującego**

Evaluation of the effectiveness of stilbene derivatives  
in sensitizing breast cancer cells to ionizing radiation

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Biologii  
Nowotworów i Epigenetyki Instytutu  
Biofizyki

Promotor:

- Dr hab. Aleksandra Rodacka

Składam serdeczne podziękowania Pani

Promotor

dr hab. Aleksandrze Rodackiej

za opiekę, poświęcony czas, wyrozumiałość oraz cierpliwość.

Dziękuję Agnieszce Zaczek, Marlenie Kudłacz oraz Sebastianowi Kalenikowi za pomoc,  
życzliwość i stworzenie najlepszej atmosfery.

oraz

Moim Najbliższym za wiarę, motywację oraz nieustanne wsparcie.

1.	DOROBEK NAUKOWY .....	3
1.1.	PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ .....	3
1.2.	DONIESIENIA KONFERENCYJNE .....	3
1.3.	CZŁONKOSTWO W STOWARZYSZENIACH NAUKOWYCH.....	5
1.4.	DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA.....	5
1.5.	INNE OSIĄGNIĘCIA .....	5
2.	STRESZCZENIE .....	7
3.	ABSTRACT .....	9
4.	WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW .....	11
5.	WPROWADZENIE .....	13
5.1.	RAK PIERSI: DEFINICJA I PODZIAŁ.....	14
5.2.	RADIOTERAPIA.....	16
5.3.	RADIOUCZULACZE .....	17
5.4.	STILBENY .....	18
6.	CEL PRACY .....	21
7.	MATERIAŁY .....	23
7.1.	ODCZYNNIKI DO HODOWLI .....	23
7.2.	BADANE ZWIĄZKI .....	23
7.3.	WYZNACZANIE DAWKI PROMIENIOWANIA JONIZUJĄCEGO .....	24
7.4.	LINIE KOMÓRKOWE .....	25
7.4.1.	CHARAKTERYSTYKA LINII MCF-7 .....	25
7.4.2.	CHARAKTERYSTYKA LINII HCC38 .....	26
7.5.	METODY .....	27
7.5.1.	HODOWLA KOMÓRKOWA .....	27
7.5.2.	INKUBACJA KOMÓREK Z BADANYMI ZWIĄZKAMI .....	28
7.5.3.	OCENA ŻYWOTNOŚCI KOMÓREK RAKA PIERSI.....	28
7.5.4.	OKREŚLANIE ZMIAN APOPTOTYCZNYCH I NEKROTYCZNYCH METODĄ CYTOMETRII PRZEPIYWOWEJ .....	29
7.5.5.	WESTERN BLOTTING .....	30
7.5.5.1.	OTRZYMYWANIE LIZATU KOMÓRKOWEGO.....	30
7.5.5.2.	OZNACZENIE STĘŻENIA BIAŁKA METODĄ LOWRY'EGO .....	30
7.5.5.3.	ELEKTROFOREZA .....	31
7.5.5.4.	TRANSFER BIAŁEK NA MEMBRANĘ IMMOBILONU P .....	31
7.5.5.5.	IMMUNODETEKCJA BIAŁEK.....	31

7.5.5.6.	ANALIZA DENSYTOMETRYCZNA.....	33
7.5.6.	REAKCJA ŁAŃCUCHOWEJ POLIMERAZY Z ANALIZĄ PRZYROSTU PRODUKTU W CZASIE RZECZYWISTYM (RT-PCR).....	34
7.5.7.	TEST AKTYWNOŚCI ENZYMÓW PRZECIWUTLENIAJĄCYCH .....	35
7.5.7.1.	PRZYGOTOWANIE LIZATÓW KOMÓRKOWYCH .....	35
7.5.7.2.	AKTYWNOŚĆ KATALAZY .....	35
7.5.7.3.	AKTYWNOŚĆ PERKOSYDAZY GLUTATIONOWEJ .....	35
7.5.7.4.	AKTYWNOŚĆ DYSMUTAZY PONADTLLENKOWEJ.....	35
7.5.8.	ANALIZA STATYSTYCZNA .....	36
8.	WYNIKI.....	37
8.1.	OMÓWIENIE PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ .....	37
8.2.	UZUPEŁNIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW DLA LINII KOMÓRKOWEJ MCF-7.....	38
8.3.	OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW DLA LINII KOMÓRKOWEJ HCC38 .....	44
9.	PODSUMOWANIE .....	59
10.	WNIOSKI.....	64
11.	LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA .....	65
12.	PRACE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ .....	73
	OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW	



## 1. DOROBEK NAUKOWY

### 1.1. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Praca przeglądowa

- (I) **Komorowska D**, Radzik T, Kalenik S, Rodacka A. Natural Radiosensitizers in Radiotherapy: Cancer Treatment by Combining Ionizing Radiation with Resveratrol. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(18):10627. <https://doi.org/10.3390/ijms231810627>  
**140 MEiN; IF=6,208**

Praca oryginalna

- (II) **Komorowska D**, Gajewska A, Hikisz P, Bartosz G, Rodacka A. Comparison of the Effects of Resveratrol and Its Derivatives on the Radiation Response of MCF-7 Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(17):9511. <https://doi.org/10.3390/ijms22179511>  
**140 MEiN; IF=6,208**

### 1.2. DONIESIENIA KONFERENCYJNE

1. Cecotka A., **Komorowska D.**, Gajewska A., Rodacka A. Wpływ piceatannolu i promieniowania jonizującego na komórki nowotworu sutka. X Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel 2018 (Lublin, marzec 2018).
2. **Komorowska D.**, Gajewska A., Cecotka A., Rodacka A. Wpływ pochodnych stilbenowych na wzrost radiowrażliwości komórek nowotworowych piersi. X Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel 2018 (Lublin, marzec 2018).

3. Cecotka A., **Komorowska D.**, Gajewska A., Rodacka A. Wpływ naturalnie występujących polifenoli w chemoprewencji leczenia raka. IV Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu Bioopen (Łódź, maj 2018).
4. **Komorowska D.**, Galdiero S., Rodacka A., Matczak K. Indukcja autofagii prawidłowych komórek endotelialnych przez wolną doksorubicynę i jej nanoformy z przyłączonym peptydem gH625. IV Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu Bioopen (Łódź, maj 2018).
5. **Komorowska D.**, Gajewska A., Rodacka A. Wpływ resweratrolu i jego pochodnych na wzrost radiowrażliwości hormono-niezależnej linii raka piersi. XI Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel 2019 (Lublin, marzec 2019).
6. **Komorowska D.**, Gajewska A., Rodacka A. Aktywność katalazy w komórkach raka piersi poddanych działaniu pochodnych stilbenowych i promieniowania jonizującego. V Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu Bioopen (Łódź, maj 2019).
7. **Komorowska D.**, Gajewska A., Rodacka A. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w estrogenozależnej linii raka piersi poddanej działaniu promieniowania jonizującego i związków stilbenowych. XVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Badań Radiacyjnych (Kielce, wrzesień 2019).
8. **Komorowska D.**, Gajewska A., Rodacka A. Aktywność peroksydazy glutationowej w estrogenozależnej linii raka piersi poddanej działaniu promieniowania jonizującego i związków stilbenowych. XII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel 2020 (Lublin, wrzesień 2020).
9. **Komorowska D.**, Gajewska A., Rodacka A. Analysis expression of apoptotic genes in MCF-7 cell preincubated with stilbenes and exposure on ionizing radiation. International Young Scientists Conference (conference online, Warsaw, February 2021).
10. **Komorowska D.**, Gajewska A., Rodacka A. Radiowrażliwość ludzkiej linii raka piersi – MCF-7. VI Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu Bioopen (konferencja online, Łódź, kwiecień 2021).

### **1.3. CZŁONKOSTWO W STOWARZYSZENIACH NAUKOWYCH**

1. Członek Polskiego Towarzystwa Biofizycznego, od 2017.
2. Pełnienie funkcji przedstawiciela doktorantów w Wydziałowej Komisji ds. Jakości Studiów Doktoranckich (2018 – 2022).
3. Polskie Towarzystwo Badań Radiacyjnych im. Marii Skłodowskiej-Curie od 2019.

### **1.4. DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA**

1. Przygotowanie warsztatów w ramach Nocy Biologów w latach 2018 i 2020.
2. XIX Festiwal Nauki Techniki i Sztuki, 2019.
3. Współorganizacja i współprowadzenie warsztatów dla uczniów Szkół Ponadpodstawowych 2017.
4. Współorganizacja i współprowadzenie warsztatów w ramach Instytutu Kreatywnej Biologii 2019.
5. Współorganizacja i współprowadzenie V i VI Ogólnopolskiej Konferencji Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen w latach 2019, 2021
6. Promocja studiów doktoranckich w ramach II Dnia Doktoranta Uniwersytetu Łódzkiego 2018 i I Dniu Nauki 2019

### **1.5. INNE OSIĄGNIĘCIA**

1. Dyplom za najlepszy poster w kategorii nauk medycznych i nauk o zdrowiu podczas X Interdyscyplinarnej Konferencji Naukowej TYGIEL „Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju”, 17-18.03.2018, Lublin.
2. Laureat konkursu dla doktorantów i studentów na dofinansowanie udziału w IV Ogólnopolskiej Konferencji Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen 2018, zorganizowanego przez Polskie Towarzystwo Biofizyczne.
3. Opieka nad częścią eksperymentalną pracy magisterskiej P. Aleksandry Cecotki, studentki kierunku Ochrona Środowiska na Wydziale BiOŚ UŁ, pt.: „Wpływ pochodnych stilbenowych na radiowrażliwość komórek raka piersi”.

4. Opieka nad częścią eksperymentalną pracy magisterskiej P. Pauli Kwapisz, studentki kierunku Biologia na Wydziale BiOŚ UŁ, pt.: „Mechanizm działania pochodnych stilbenowych w kombinacji z promieniowaniem jonizującym na komórki raka piersi”.
5. Opieka nad częścią eksperymentalną pracy magisterskiej P. Sebastiana Kalenika, studentki kierunku Biotechnologia na Wydziale BiOŚ UŁ, pt.: „Rola związków pochodzenia roślinnego w przeciwdziałaniu uszkodzeniom indukowanym rotenonem”.

## 2. STRESZCZENIE

Rak piersi jest najczęściej diagnozowanym nowotworem u kobiet. W Polsce rocznie notuje się około 19 tysięcy nowych przypadków zachorowań na ten typ nowotworu. Leczenie polega głównie na chirurgicznym usunięciu tkanki zmienionej nowotworowo, a następnie miejscowym zastosowaniu radioterapii. W wielu przypadkach np. gdy nowotwór jest w zbyt zaawansowanym stadium, bądź stan ogólny pacjenta nie pozwala na wdrożenie innego leczenia, radioterapia jest jedyną możliwą do zastosowania metodą. Jednak radioterapia nie zawsze jest wystarczająco efektywna. Wynika to głównie z wrodzonej bądź nabytej radiooporność komórek nowotworowych. Dlatego poszukuje się sposobów, które zwiększałyby wrażliwość komórek nowotworowych na działanie promieniowania jonizującego, a jednocześnie chroniłyby komórki prawidłowe przed jego szkodliwym działaniem. W tym aspekcie dużym zainteresowaniem cieszą się niskocząsteczkowe związki pochodzenia naturalnego. Dane literaturowe wskazują, że niektóre związki z grupy polifenoli mogą zwiększać efekty cytotoksycznego działania promieniowania jonizującego na szereg rodzajów komórek nowotworowych. Stąd też celem badawczym pracy była ocena i porównanie działania 3 związków, pochodnych stilbenowych, w kombinacji z promieniowaniem jonizującym na komórki raka piersi.

Badania wykonano na komórkach dwóch linii raka piersi: estrogenozależnej linii MCF-7 oraz hormononiezależnej linii HCC38. Badanymi związkami były resweratrol i dwa jego analogi: piceatannol oraz piceidu.

W pracy oceniono cytotoksyczne właściwości pochodnych stilbenowych w połączeniu z promieniowaniem jonizującym na wybrane komórki raka piersi. Oszacowano stopień zaawansowania apoptozy oraz wskazano szlaki, które uczestniczą w jej indukcji. Sprawdzone także czy dochodzi do uruchomienia mechanizmów antyoksydacyjnej odpowiedzi komórek na działanie reaktywnych form tlenu generowanych radiacyjnie. Ponadto na podstawie poziomu ekspresji białka Rad51 i H2AX ustalono czy dochodzi do indukcji napraw uszkodzonego DNA.

W pracy doktorskiej wykazano, że pochodne stilbenowe stosowane w niskich stężeniach (2,5 – 5  $\mu\text{M}$ ) nie wykazują cytotoksycznego działania na komórki obu badanych linii. Działanie cytotoksyczne obserwowano przy wyższych stężeniach badanych związków. Komórki linii MCF- 7 były bardziej wrażliwe w porównaniu do komórek HCC38 zarówno

na działanie samych związków jak i w połączeniu z promieniowaniem jonizującym. Związane jest to ze słabszą aktywacją mechanizmu antyoksydacyjnej odpowiedzi oraz indukcją naprawy radiacyjnie uszkodzonego DNA w komórek MCF-7 niż w komórkach HCC38.

Proces apoptozy zarówno w komórkach MCF-7 jak i w komórkach HCC38 aktywowany jest z udziałem szlaku zewnętrznego jak i szlaku wewnętrznego. Ponadto uzyskane wyniki wskazują, że w przypadku linii MCF-7 aktywacja programowanej śmierci zachodzi niezależnie od białka p53.

Uzyskane w pracy wyniki pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że spośród badanych pochodnych stilbenowych największe radioczułające właściwości wykazuje resweratrol, nieco mniejsze piceatannol, natomiast najmniejszą skutecznością charakteryzuje się piceid.

Uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej wyniki uzupełniają i poszerzają dotychczasowy stan wiedzy dotyczący potencjalnego zastosowania pochodnych stilbenowych w charakterze radioczułaczy w leczeniu raka piersi.

### 3. ABSTRACT

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer in women. In Poland, there are about 19,000 new cases of this type of cancer annually. Treatment consists mainly of surgical removal of the tumor tissue followed by local radiotherapy. In many cases, e.g. when the cancer is too advanced or the patient's general condition does not allow for the implementation of other treatment, the only possible method is radiotherapy. However, radiation therapy is not always effective enough, mainly due to the inherent or acquired radioresistance of the cancer cells. Therefore, new methods for increasing the sensitivity of cancer cells to ionizing radiation and, at the same time, protecting normal cells against its harmful effects are needed. In this aspect, low-molecular compounds of natural origin are of great interest. Literature data indicate that some compounds from the group of polyphenols may enhance the cytotoxic effect of ionizing radiation on several types of cancer cells. Therefore, the study aimed to evaluate and compare the effect of 3 compounds, stilbene derivatives, in combination with ionizing radiation on breast cancer cells.

The research was conducted on two breast cancer cell lines: the estrogen-dependent MCF-7 and the hormone-independent HCC38 lines. The tested compounds were resveratrol and two of its analogs: piceatannol and piceid.

This study evaluated the cytotoxic properties of stilbene derivatives in combination with ionizing radiation on selected breast cancer cells. The stage of apoptosis was assessed, and the pathways involved in its induction were indicated. It was also checked whether the mechanisms of the antioxidant defense of cells are activated by reactive oxygen species generated by radiation. In addition, based on expression levels of Rad51 and H2AX, the induction of repair of damaged DNA was determined.

Obtained results showed that stilbene derivatives used in low concentrations (2.5 – 5  $\mu\text{M}$ ) did not exhibit cytotoxic effects against both of the tested cell lines. The cytotoxic effect was observed at higher concentrations of the tested compounds. MCF-7 cells were more sensitive than HCC38 to the compounds used alone or combined with ionizing radiation due to the weaker activation of the antioxidant defense mechanism and induction of repair of damaged DNA.

The process of apoptosis, both in MCF-7 cells and in HCC38 cells, was activated by extrinsic and intrinsic pathways. In addition, the obtained results indicate that in the case of the MCF-7 cell line, the activation of programmed death occurs independently of the p53 protein.

The results obtained in the study clearly state that among the tested stilbene derivatives, resveratrol has the highest radiosensitizing properties, slightly weaker was piceatannol, while piceid possessed the lowest effectiveness.

The results obtained in the doctoral dissertation supplement and broaden the current knowledge on the potential use of stilbene derivatives as radiosensitizers in breast cancer treatment.



#### 4. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

<b>ATCC</b>	amerykańska organizacja non-profit, która zbiera, przechowuje i dystrybuje mikroorganizmy i linie komórkowe oraz biopreparaty do badań naukowych (ang. American Type Culture Collection)
<b>Bax</b>	białko proapoptotyczne należące do rodziny białek Bcl-2 (ang. Bcl-2-associated X protein)
<b>BC</b>	rak piersi (ang. <b>B</b> reast <b>C</b> ancer)
<b>Bcl-2</b>	produkt protoonkogenu Bcl-2, wykryty w białaczkach i chłoniakach wywodzących się z limfocytów B; rodzina białek Bcl-2 (ang. B-Cell Leukemia/lymphoma-2)
<b>BRCA1</b>	gen podatności na raka piersi 1 (ang. breast cancer susceptibility gene 1; breast cancer 1, early onset)
<b>BRCA2</b>	gen podatności na raka piersi 2 (ang. breast cancer susceptibility gene 2; breast cancer 2, early onset)
<b>CAT</b>	katalaza (ang. Catalase)
<b>DMEM</b>	medium wzrostowe (ang. <b>D</b> ulbecco's <b>M</b> odified <b>E</b> agle <b>M</b> edium)
<b>DMSO</b>	dimetylosulfotlenek (ang. dimethylsulfoxide)
<b>DNA</b>	kwasy deoksyrybonukleinowe (ang. <b>d</b> eoxyrybo <b>n</b> ucleic <b>a</b> cid)
<b>ER</b>	receptor estrogenowy (ang. estrogen receptor)
<b>ERBB2</b>	receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (ang. Human epidermal growth factor receptor 2)
<b>GPx</b>	peroksydaza glutationowa (ang. glutathione peroxidase)
<b>GSH</b>	glutation (ang. Glutathione Sulfhydryl)
<b>H2AX</b>	histon H2AX
<b>HCC38</b>	hormononiezależna linia raka piersi
<b>HER2</b>	receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (ang. Human epidermal growth factor receptor 2) – skrót używany wcześniej, aktualnie używa się skrótu ERBB2
<b>IR</b>	promieniowanie jonizujące (ang. <b>i</b> onizing <b>r</b> adiation)
<b>MCF-7</b>	linia komórkowa estrogenozależnego gruczolakoraka piersi (ang. adenocarcinoma estrogen-responsive)

<b>MTT</b>	bromek 3-(4,5-dimetylotriazo-2-yl)-2,5-difenyloctetrazolu (ang. methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide)
<b>NF-κB</b>	czynnik transkrypcyjny zidentyfikowany w limfocytach B, zaangażowany w ekspresję łańcucha lekkiego typu kappa immunoglobulin (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
<b>Nrf2</b>	jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2 (ang. nuclear factor erythroid 2-related factor 2)
<b>p53</b>	białko kodowane przez gen supresorowy TP53 (ang. tumor protein p53)
<b>PBS</b>	zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (ang. <b>Phosphate Buffered Saline</b> )
<b>PR</b>	receptor progesteronowy (ang. progesterone receptor)
<b>R</b>	resweratrol
<b>RFT</b>	reaktywne formy tlenu
<b>RG</b>	piceid
<b>RNA</b>	kwasy rybnukleinowe (ang. <b>RiboNucleic Acid</b> )
<b>ROH</b>	piceatannol
<b>RPMI</b>	medium wzrostowe do hodowli komórkowych (ang. Roswell Park Memorial Institute medium)
<b>RT</b>	radioterapia
<b>SOD</b>	dysmutaza ponadtlenkowa (ang. Superoxide Dismutase)
<b>TNFα</b>	czynnik martwicy nowotworu alfa (ang. tumor necrosis factor α)

## 5. WPROWADZENIE

Rak piersi (BC, ang. breast cancer) jest drugą, zaraz po chorobach układu sercowo-naczyniowego, przyczyną zgonów na świecie. Głównym czynnikiem ryzyka zachorowania na nowotwór piersi jest wiek oraz płeć. Analizując dane statystyczne, uważa się, że nowotwór piersi najczęściej dotyka kobiety w przedziale wiekowym 50-69 lat. Nie oznacza to jednak, że nie pojawia się on u młodszych kobiet. Szacuje się, że około 0,65% przypadków zachorowań dotyczy pacjentek poniżej 30 roku życia (Kamińska i in., 2015). Na raka piersi, pomimo iż zdarza się to bardzo rzadko, bo tylko u około 1% pacjentów, zachorować mogą także mężczyźni (Ahmad, 2019). Pomimo znacznego postępu medycznego, rozwoju nowatorskich metod diagnostycznych oraz terapeutycznych, wieloletnich badań zarówno laboratoryjnych jak i klinicznych, zachorowalność na raka piersi ma tendencję wzrostową. Spowodowane jest to coraz większym odsetkiem ludzi starszych, co wynika ze wzrostu średniej długości życia, a także postępującym zanieczyszczeniem środowiska, brakiem aktywności fizycznej oraz nieodpowiednią dietą, która często prowadzi do dużej otyłości, a w konsekwencji do indukcji procesów kancerogenezy (Siegel i in., 2015). W Polsce rak piersi stanowi około 23% wszystkich zachorowań na nowotwory, co oznacza, że każdego roku wykrywa się 19 tysięcy nowych przypadków (Ciechanowska i in., 2018). W skali światowej zapadalność na nowotwór piersi wynosi 1,7 miliona z czego każdego roku umiera ponad 500 tysięcy pacjentek (Tao i in., 2015). Najwięcej zdiagnozowanych nowotworów piersi odnotowuje się w krajach wysoko rozwiniętych tj. w Ameryce Północnej, Australii czy też w północno-zachodniej części Europy. Mniejszą zachorowalność na nowotwór piersi odnotowuje się we wschodniej i środkowej części Europy, natomiast najmniej przypadków tego nowotworu występuje w Afryce, a także w południowo-wschodniej części Azji. Tak znaczące różnice w diagnozowaniu nowotworów piersi, ale także innych nowotworów, wynikają z różnej dostępności do nowoczesnej diagnostyki medycznej. Paradoksalnie kraje o najmniejszej zachorowalności na nowotwory piersi przodują pod względem umieralności (Shah i in., 2019).

Wśród innych czynników odpowiadających za zwiększone ryzyko zachorowania na nowotwór piersi są predyspozycje rodzinne. W przypadku kobiet, u których wśród żeńskich

krewnych pierwszego stopnia (mama, siostra, córka) występował nowotwór, prawdopodobieństwo zachorowania wzrasta 1,5-2 razy, natomiast w przypadku kiedy nowotwór występował u co najmniej dwóch krewnych prawdopodobieństwo znacznie wzrasta nawet dziewięciokrotnie (Bargieł, 2020).

Na zwiększone ryzyko zachorowalności wpływają także mutacje w genach BRCA1 (ang. breast cancer susceptibility gene 1; breast cancer 1, early onset ) oraz BRCA2 (ang. breast cancer susceptibility gene 2; breast cancer 2, early onset). W przypadku mutacji w genie BRCA1 ryzyko raka piersi wzrasta o około 65-80%, natomiast mutacje w genie BRCA2 zwiększają ryzyko o około 45-85%. Pomimo tego, mutacje te odpowiadają jedynie za około 5 do 10 % wszystkich zachorowań na nowotwór piersi (Sun i in., 2017).

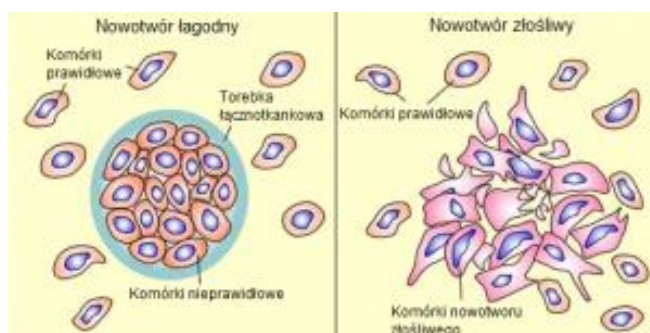
Zwiększone ryzyko nowotworów piersi występuje także u kobiet późno rodzących (po 30 roku życia) oraz niekarmiących piersią. Czynnikiem zwiększającym zachorowalność na raka piersi jest także długotrwałe przyjmowanie doustnej antykoncepcji. Branie takich środków przez okres powyżej 5 lat, zwiększa ryzyko nawet o 25% (Ullah, 2019).

## **5.1. RAK PIERSI: DEFINICJA I PODZIAŁ**

Rak piersi powstaje na skutek niekontrolowanego namnażania się nieprawidłowych komórek nabłonkowych gruczołu piersiowego, które w pierwszej fazie rozwoju formują guzek. Tkanki takie zmieniają się zarówno pod względem czynnościowym jak i morfologicznym. W około 55% przypadków pierwotne zmiany nowotworowe pojawiają się w górnym, bocznym kwadrancie piersi, która znajdującej się najbliżej okolicy dołu pachowego (Hurko i in., 2020).

Nowotwory piersi dzieli się na łagodne i złośliwe. Zmiany łagodne utworzone są z tkanek już zróżnicowanych i dojrzałych dzięki, których morfologia nie odbiega znacząco od tkanek prawidłowych. Komórki tego nowotworu otoczone są torebką, która oddziela guz od komórek prawidłowych. Nowotwory łagodne rosną miejscowo, rozprężająco i nie dają żadnych przerzutów. Ponadto po usunięciu takiej zmiany nie dochodzi do remisji, dzięki czemu nowotwory łagodne są całkowicie wyleczalne. Inaczej sprawa wygląda w przypadku nowotworów złośliwych. Powstają one z komórek niedojrzałych, których budowa znacznie odbiega od komórek prawidłowych zarówno pod względem morfologicznym i funkcjonalnym. Nowotwory złośliwe proliferują bardzo szybko, charakteryzują się zdolnością do naciekania na inne tkanki znajdujące się w pobliżu, dzięki czemu mogą dawać

przerzuty zarówno do naczyń krwionośnych bądź limfatycznych jak i do innych narządów (Sinha, 2018).



**Rys.1.** Schemat przedstawiający budowę nowotworów łagodnych i złośliwych [źródło: <https://zdrowy.wroclaw.pl/czynniki-rozwoju-nowotworow>, dostęp 25.05.2023].

Raka piersi dzieli się na 3 podtypy. Podział ten uzależniony jest od statusu receptorów progesteronowych oraz estrogenowych, a także receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (kiedyś określanego jako HER2, obecnie stosuje się skrót ERBB2). Najczęściej występującym podtypem nowotworu, aż u 70% pacjentek, jest podtyp dodatni pod względem statusu receptorów progesteronowego i estrogenowego oraz ujemny pod względem statusu receptora ERBB2. Drugi co do częstości występowania, diagnozowany u 15-20% pacjentek, jest podtyp potrójnie dodatni. Natomiast najrzadziej występującym podtypem nowotworu piersi jest nowotwór nie posiadający żadnego z trzech receptorów (Waks i Winer, 2019).

Nowotwory piersi zakwalifikować można także pod względem zaawansowania klinicznego. Służy do tego tzw. klasyfikacja TNM, w której bierze się pod uwagę 3 parametry. Pierwszy, oznaczony literą T, mówi o obecności guza oraz o jego wielkości, drugi, który oznaczony jest jako N, informuje o obecności przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych, natomiast ostatni, oznaczony literą M, to informacja dotycząca obecności przerzutów odległych. Zebranie wiadomości dotyczących wyżej wymienionych parametrów pozwala zakwalifikować pacjentkę w skali 0-IV, dzięki czemu możliwe jest dobranie odpowiedniej, indywidualnej dla każdej pacjentki metody leczenia (Hurko i in., 2020).

**Tabela 1.** Stadia rozwoju nowotworu piersi [Na podstawie Hurko i in., 2020].

<b>Stopień</b>	<b>Wielkość (T)</b>	<b>Obecność przerzutów do węzłów chłonnych (N)</b>	<b>Obecność przerzutów odległych (M)</b>
<b>0</b>	Rak Przedinwazyjny	Brak	Brak
<b>I</b>	Maksymalna wielkość guza 2 cm	Brak	Brak
<b>II</b>	Maksymalna wielkość guza 5 cm	Obecne przerzuty w pachowym układzie limfatycznym, węzły powiększone, ruchome	Brak
<b>III</b>	Wielkość guza powyżej 5 cm	Obecne przerzuty w pachowym układzie limfatycznym, obecne przerzuty do okolicznych tkanek	Brak
<b>IV</b>	Każda	Obecne przerzuty w pachowym układzie limfatycznym, obecne przerzuty do okolicznych tkanek	Przerzuty do narządów odległych

Wybór metody leczenia w przypadku osób cierpiących na nowotwór piersi nie jest prosty i zależy od wielu czynników. Do najistotniejszych zaliczyć możemy stopień złośliwości, obecność przerzutów do węzłów chłonnych oraz innych narządów, a także stopień zaawansowania klinicznego nowotworu. Konwencjonalne leczenie w zależności od rodzaju nowotworu opiera się na chirurgicznym usunięciu guza, które połączone jest radioterapią, chemioterapią bądź hormonoterapią (Waks & Winer, 2019).

## **5.2. RADIOTERAPIA**

Jednym z najbardziej rozpowszechnionych i najczęściej wykorzystywanych sposobów leczenia chorych na nowotwory jest radioterapia (RT). Szacuje się, że około 70% pacjentów tzw. onkologicznych wymaga zastosowania radioterapii. Co więcej, w niektórych przypadkach radioterapia jest jedyną metodą możliwą do zastosowania w leczeniu nowotworów. W odróżnieniu od chemioterapii, gdzie na toksyczne chemioterapeutyki narażony jest cały organizm, nowoczesna radioterapia ma na celu skierowanie wysokoenergetycznej wiązki promieniowania jonizującego (IR, ang. ionizing radiation) bezpośrednio w miejsce zmienione nowotworowo, ograniczając do minimum szkodliwe działanie IR w stosunku do komórek prawidłowych, znajdujących się w sąsiedztwie guza (Calvaruso i in., 2019).

W leczeniu chorych na nowotwory piersi zwykle stosuje się leczenie skojarzeniowe czyli chirurgicznego usunięcia guza w połączenie z radioterapią i hormonoterapią, rzadziej chemioterapią. Niestety nie zawsze radioterapia jest wystraszająco efektywna (Gong i in., 2021). Główne czynniki odpowiedzialne za radiooporność komórek nowotworowych to:

- ✓ skuteczna naprawa uszkodzeń DNA wywołanych działaniem reaktywnych form tlenu (RFT) generowanych radiacyjnie;
- ✓ obecność komórek macierzystych raka w guzach, odpowiedzialnych za przerzuty, nawroty, niepowodzenie RT i złe rokowanie u pacjentów;
- ✓ nieprawidłowa ekspresja białek związanych z regulacją punktów kontrolnych cyklu komórkowego;
- ✓ zdolność aktywacji procesu przejścia epitelialno-mezenchymalnego, który zwiększa potencjał migracyjny i inwazyjny komórek nowotworowych;
- ✓ hipoksja, czyli stan niedotlenienia środowiska guza.

Jak opisano powyżej, radiooporność komórek nowotworowych jest procesem bardzo złożonym (Kabakov i Yakimova, 2021; Y. P. Liu i in., 2021; Lonati i in., 2021; Olivares-Urbano i in., 2020; J. Yang i in., 2020). Dokładne ustalenie mechanizmów związanych z radioopornością jest niezbędne do zidentyfikowania nowych celów terapeutycznych, których hamowanie/aktywacja będą zwiększać wrażliwość komórek na promieniowanie, a w konsekwencji poprawią skuteczność leczenia.

### 5.3. RADIOUCZULACZE

Radiouczulacze są związkami chemicznymi, których zadaniem jest zwiększenie wrażliwości komórek nowotworowych na działanie promieniowania jonizującego. Postulowane mechanizmy działania radiouczulaczy zmieniają się wraz z rozwojem badań, które pozwalają na wprowadzanie nowych materiałów i leków wzmacniających efekty radioterapii (Adams, 1973; Fowler i in., 1976; Gong i in., 2021).

Obecnie przyjmuje się, że mechanizm działania radiouczulaczy związany jest z:

- ✓ hamowaniem naprawy uszkodzeń DNA, które powstają na skutek działania promieniowania jonizującego;
- ✓ zakłóceniem cyklu komórkowego oraz funkcji działania organelli komórkowych, dzięki czemu dochodzi do zwiększenia cytotoksyczności;



- ✓ hamowaniem ekspresji genów tzw. odporności na promieniowanie jonizujące (np. *NF-κB*, *NRF2*) lub aktywacją ekspresji genów zwiększających wrażliwość na promieniowanie (np. geny związane z indukcją procesu apoptozy) (Gong i in., 2021).

Według najnowszych badań radiocuczulacze ze względu na strukturę można podzielić na 3 kategorie: niskocząsteczkowe związki (tlen i mimetyki tlenu jak mitroimidazole, misonidazole, związki pochodzenia roślinnego, cytotoksyny selektywnie uwrażliwiające komórki w stanie hipoksji np. tyrapazamina, ewofosfamid), makrocząsteczki (białka i peptydy, mikroRNA, siRNA, oligonukleotydy) oraz nanomateriały (nanocząstki metali szlachetnych, nanocząstki metali ciężkich, nanocząstki na bazie ferrytów, nanomateriały półprzewodnikowe) (Gong i in., 2021).

W ostatnich latach coraz większym zainteresowaniem, ze względu na radiocuczulające działanie, cieszą się niskocząsteczkowe związki pochodzenia roślinnego m.in. te należące do grupy polifenoli. Niektóre z tych związków np. kurkumina, papaweryna są obecnie badane klinicznie.

#### 5.4. STILBENY

Stilbeny, zwane również stilbenoidami, należą do grupy naturalnie występujących polifenoli. Powstają na drodze szlaku fenylopropanoidowego. Ich szkielet zbudowany jest z pierścieni fenolowych pomiędzy którymi występuje podwójne wiązanie styrenowe. Są związkami aromatycznymi, niskocząsteczkowymi o masie w zakresie 210-270 g/mol. Mogą występować w dwóch formach stereoizomerycznych: *trans*- i *cis*-, co uzależnione jest od pozycji przyłączenia grup funkcyjnych, ich wzajemnego ułożenia względem wiązania podwójnego, a także względem siebie. Dane literaturowe wskazują, że izomery *trans*- są biologicznie bardziej aktywne niż izomer *cis*- (Strumiłło i in., 2015).

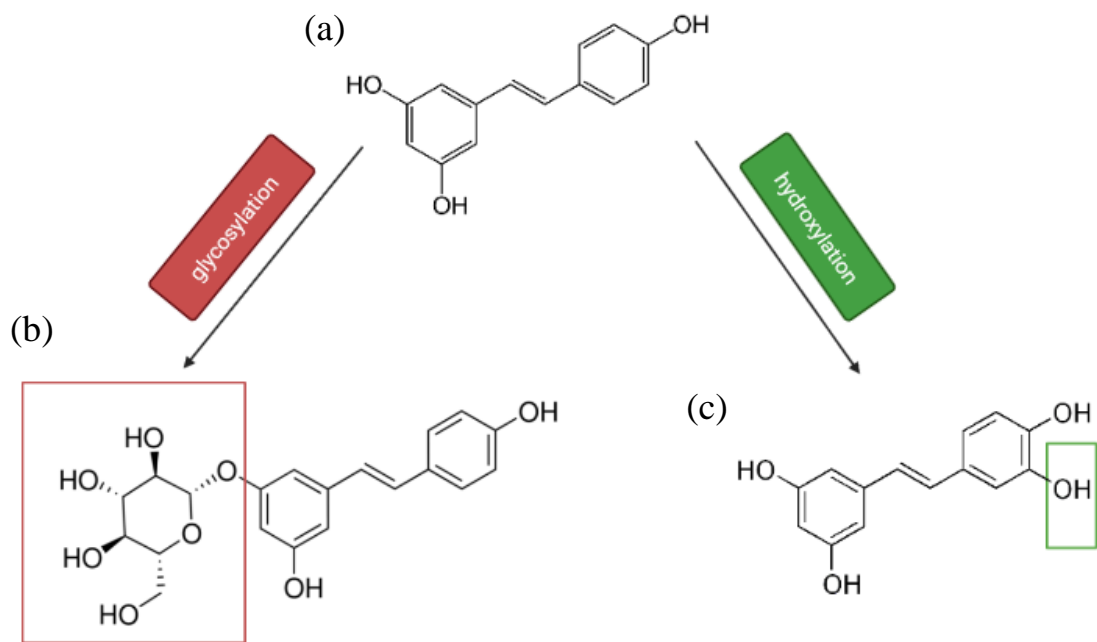
Najbardziej znanym związkiem z grupy stilbenów jest resweratrol (3,4,5-*trans*-trihydroksystilben, w skrócie R). Po raz pierwszy został wyizolowany z ciemńczycy (*Veratrum grandiflorum*), w 1940 roku (Takaoka, 1940). W największych ilościach występuje w rdeście japońskim (*Reynoutria japonica*), orzeszkach ziemnych (*Arachis hypogaea*) i winogronach (*Vitis vinifera*). Wiele dotychczas przeprowadzonych badań potwierdza liczne właściwości biologiczne resweratrolu, m.in.: właściwości przeciwutleniające, neuroprotektcyjne, przeciwzapalne, a także przeciwnowotworowe (Gerszon i in., 2014; Komorowska i in., 2022; Ren i in., 2021). Jednakże największą



przeszkodą stojącą na drodze do wykorzystania resweratrolu w leczeniu jest jego słaba biodostępność. Jest wchłaniany przez przewód pokarmowy, a następnie szybko metabolizowany i wydalany z moczem (Vesely i in., 2021). Dlatego niezwykle ważne jest pokonanie jego niskiej biodostępności m.in. przy użyciu różnych rodzajów nanoosiłników. Innym rozwiązaniem jest stosowanie analogów resweratrolu, które miałyby podobne właściwości biologiczne i jednocześnie lepsze parametry farmakokinetyczne (Chen i in., 2021).

Obok resweratrolu najlepiej poznaną pochodną stilbenową jest piceatannol (3,3', 4,5' - tetrahydroksystilben, w skrócie ROH). Pierwsze doniesienia dotyczące piceatannolu pojawiły się w 1984 roku. Został on po raz pierwszy wyizolowany z wilczomlecza (*Euphorbia lagascea*). Piceatannol można znaleźć głównie w trzcinie cukrowej, białej herbacie, czerwonym winie, orzeszkach ziemnych i marakui. Jest jednym z głównych metabolitów resweratrolu i powstaje przy udziale enzymu CYP1B1 należącego do rodziny enzymów Cytochromu P450. Różni się od resweratrolu obecnością dodatkowej grupy hydroksylowej w pozycji 3', co wiąże się m.in. z większą zdolnością do zmiatania reaktywnych form tlenu. Dotychczas przeprowadzone badania potwierdziły jego lepsze parametry farmakokinetyczne niż w przypadku resweratrolu (Hu i in., 2020). Co więcej, wykazuje on podobne, a wielu aspektach nawet lepsze właściwości biologicznych jak resweratrol (Banik i in., 2020).

Innym związkiem z grupy stilbenów będącym prekursorem resweratrolu jest piceid, zwany również polidatinem (3-O-Glukuronid trans-resweratrolu, w skrócie RG). Jest glikozydową pochodną resweratrolu. Wcześniejsze badania wykazały, że piceid ma podobne biologiczne właściwości jak resweratrol, ale jest mniej podatny na enzymatyczne utlenianie. Ponadto piceid jest znacznie lepiej rozpuszczalny w wodzie w porównaniu z resweratrolem (Su i in., 2013; Tang, 2020).



**Rys.2.** Wzory strukturalne badanych związków a) resweratrolu, b) piceidu, c) piceatannolu

## 6. CEL PRACY

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet. Jak dotąd najbardziej skuteczną metodą leczenia jest chirurgiczne usunięcie guza oraz miejscowe zastosowanie radioterapii. Radioterapię stosuje się także wtedy, gdy stopień zaawansowania nowotworu lub stan ogólny pacjenta nie pozwala na przeprowadzenie innego leczenia. Jednak pomimo rozwoju nowoczesnych technik radioterapii, metoda ta nie zawsze gwarantuje sukces w leczeniu. Główną przyczyną jest wrodzona lub nabyta radiooporność komórek nowotworowych. Stąd też prowadzone są badania mające na celu zwiększenie wrażliwości tkanki nowotworowej na działanie promieniowania jonizującego przy jednoczesnym ograniczeniu toksyczności dla tkanek prawidłowych. Jednym ze sposobów jest stosowanie związków chemicznych tzw. radiouczulaczy, które selektywnie zwiększałyby wrażliwość komórek nowotworowych na działanie radioterapii.

**Celem badawczym** pracy była ocena i porównanie działania trzech pochodnych stilbenowych: resweratrolu, piceatannolu i piceidu, w kombinacji z promieniowaniem jonizującym na komórki nowotworowe piersi.

Cele szczegółowe przeprowadzonych badań obejmowały:

1. Ocenę właściwości cytotoksycznych analizowanych pochodnych stilbenowych i promieniowania jonizującego z zastosowaniem testu MTT;
2. Określenie poziomu apoptozy za pomocą cytometrii przepływowej;
3. Określenie wpływu pochodnych stilbenowych i promieniowania jonizującego na poziom ekspresji genów (*Bcl-2*, *Bax*, *p53*, *kaspaza 3*, *kaspaza 8*) i poziom białek zaangażowanych w proces apoptozy (*Bcl-2*, *p53*, *kaspaza 3*, *kaspaza 8*);
4. Ocenę poziomu enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej 1 i 2, peroksydaz glutationowych oraz katalazy, a także Nrf2, kluczowego białka w mechanizmie antyoksydacyjnej odpowiedzi obronnej komórki;
5. Ocenę poziomu dwóch białek związanych z naprawą DNA: Rad51 oraz histonu H2AX.

Założono, że przeprowadzone badania pozwolą wskazać tę pochodną stilbenową, która spośród badanych związków będzie najefektywniej wzmacniała działanie/efekt

promieniowania jonizującego na wybrane komórki nowotworowe. Ponadto możliwe będzie zaproponowanie molekularnych mechanizmów, które wskazywałyby na to, że badane związki indukują śmierć komórek nowotworowych piersi i przyczyniają się do uwrażliwienia komórek na działanie promieniowania jonizującego.

### **Hipoteza badawcza**

Pochodne stilbenowe uwrażliwiają komórki raka piersi linii MCF-7 oraz HCC38 na działanie promieniowania jonizującego.

## 7. MATERIAŁY

Wszystkie odczynniki, które użyto podczas wykonywania badań, posiadały najwyższy z możliwych do uzyskania stopień czystości. Przygotowane roztwory powstawały z użyciem wody dejonizowanej oczyszczanej w aparacie (Elix3/Mili-Q firmy Millipore), gdzie wykorzystuje się układ odwróconej osmozy. Przewodność wynosi około 0,06  $\mu\text{S/cm}$ .

### 7.1. ODCZYNNIKI DO HODOWLI

- Medium wzrostowe RPMI (ang. Roswell Park Memorial Institute medium)
- Medium wzrostowe DMEM (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- Roztwór trypsyny – 0,25% trypsyna, 1 mM EDTA
- Mieszanina antybiotyków penicylina i streptomycyna – 10 000 jednostek/ml penicyliny oraz 10 000  $\mu\text{g/ml}$  streptomycyny
- Bydlęca surowica płodowa
- Sól fizjologiczna buforowana fosforanem DPBS (ang. Dulbecco's phosphate-buffered saline)

Wszystkie odczynniki wykorzystywane do hodowli zakupiono w firmie Merck Millipore dawniej Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### 7.2. BADANE ZWIĄZKI

W eksperymencie zastosowano trzy pochodne stilbenowe: resweratrol (Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA)), piceatannol (Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)) oraz piceid (Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA)).

Wszystkie związki stilbenowe rozpuszczano w alkoholu etylowym do określonego stężenia wyjściowego. Stężenie określano spektrofotometrycznie przy długościach fali 304 nm w przypadku resweratrolu i piceidu oraz 326 nm w przypadku piceatannolu. Stężenia związków wyliczono na podstawie molowych współczynników absorpcji: dla resweratrolu i piceidu przyjmowano wartość 30335  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Camont i in., 2009), natomiast dla

piceatannolu  $33100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Rhayem i in., 2008). W zależności od typu eksperymentu związki rozcieńczano do określonego stężenia i dodawano do pożywki z komórkami.

### 7.3. WYZNACZANIE DAWKI PROMIENIOWANIA JONIZUJĄCEGO

Dawkę promieniowania jonizującego regularnie kontrolowano przed przystąpieniem do badań wymagających stosowania promieniowania jonizującego. Dawkę wyznaczano używając dozymetru Frickiego, którego skład przedstawiono w tabeli 2:

**Tabela 2.** Skład dozymetru Frickiego

Wzór związku	Stężenie
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$
NaCl	$10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$
$\text{H}_2\text{SO}_4$	$5 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$

Napromieniowanie dozymetru Frickiego prowadzi do utlenienia jonów  $\text{Fe}^{2+}$  do jonów  $\text{Fe}^{3+}$  w wodnym roztworze  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Ilość powstałych jonów  $\text{Fe}^{3+}$  oznaczano spektrofotometrycznie stosując długość fali równą 305 nm. Jako współczynnik molowy absorpcji dla siarczanu żelazowo-amonowego ( $\text{Fe}^{3+}$ ) przyjęto  $2209 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Dawkę promieniowania jonizującego wyliczono z zależności przedstawionej poniżej:

$$D [\text{Gy}] = \frac{9,65 \times 10^6 \times \Delta A}{G(\text{Fe}^{3+}) \times \varepsilon \times d} = 2,966 \times 10^2 \times \Delta A$$

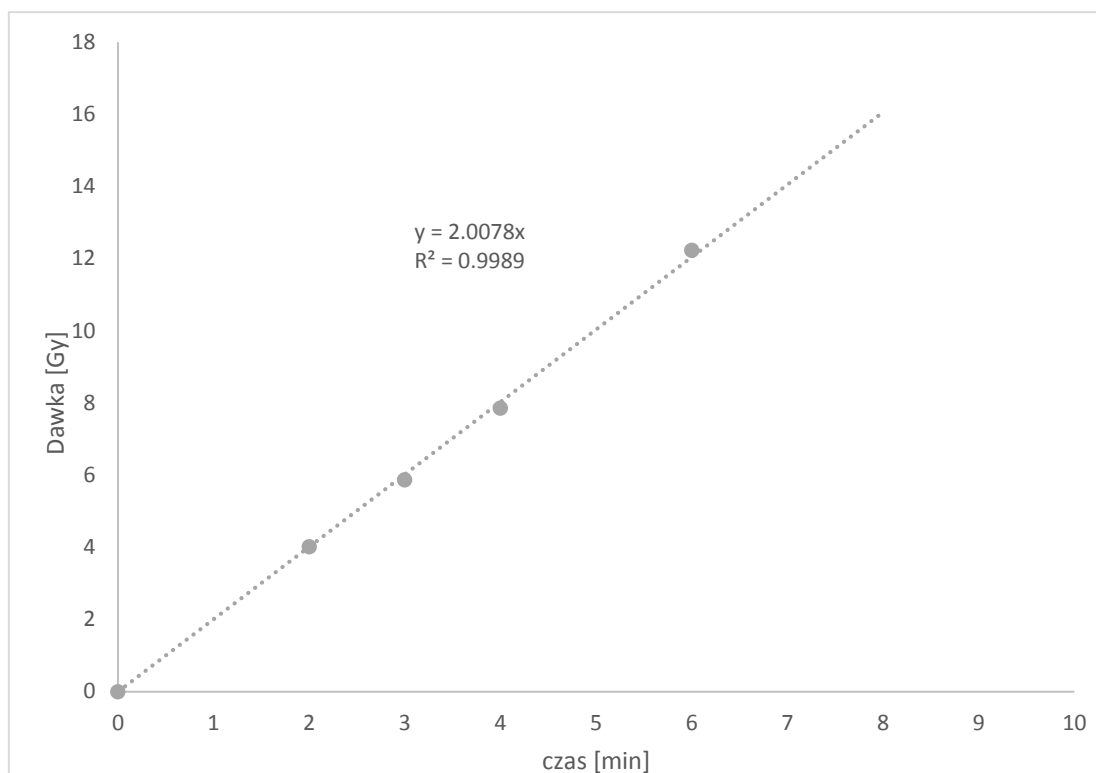
gdzie:

$G(\text{Fe}^{3+})$  – to wydajność radiacyjna tworzenia się  $\text{Fe}^{3+}$ , która wynosi 14,7

$d$  – to gęstość roztworu, wynosząca  $1,002 \text{ g cm}^{-3}$

$\Delta A$  – to przyrost absorbancji dozymetru mierzony przy długości fali równej 305 nm

Przykładowa zależność na podstawie, której ustalano moc dawki promieniowania jonizującego zamieszczono poniżej (Rysunek 3).



**Rys.3.** Zależność dawki od czasu ekspozycji na promieniowanie jonizujące.

Ustawienia aparatu rentgenowskiego były zawsze optymalizowane tak, aby moc dawki wynosiła 2Gy/min.

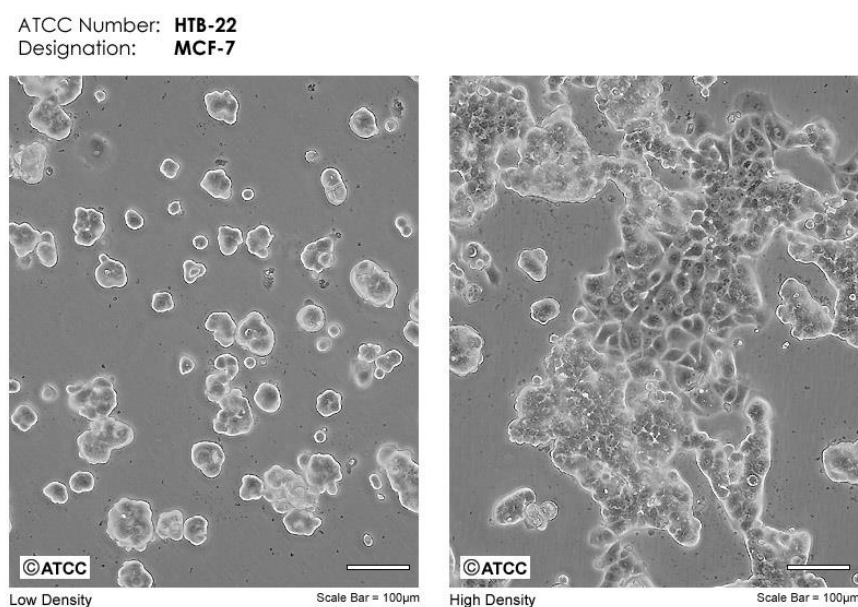
## 7.4. LINIE KOMÓRKOWE

Badania aktywności biologicznej pochodnych stilbenowych w kombinacji z promieniowaniem jonizującym przeprowadzono na komórkach dwóch linii raka piersi: estrogenozależnej linii MCF-7 oraz hormononiezależnej linii HCC38.

### 7.4.1. CHARAKTERYSTYKA LINII MCF-7

MCF-7 jest ludzką linią komórkową raka sutka (ATCC, Manassas, VA, USA). Komórki tej linii po raz pierwszy wyizolowane zostały w 1970 roku od kobiety rasy kaukaskiej. Kobieta ta miała 69 lat oraz grupę krwi 0 Rh+. Komórki wyprowadzone zostały z metastazy nabłonka gruczaloraka gruczołu piersiowego. Nazwa MCF-7 pochodzi od **Michigan Cancer Foundation-7**, Detroit, USA. Komórki tej linii mają zdolność do przetwarzania estradiolu poprzez cytoplazmatyczne receptory estrogenowe. Dzięki

obecności tych receptorów, komórki linii MCF-7 wykazują wrażliwość na chemioterapeutyki. MCF-7 są komórkami adherentnymi, które mają zdolność do wzrostu w monowarstwie. Czynniki martwicy nowotworu alfa ( $TNF\alpha$ , ang. tumor necrosis factor  $\alpha$ ) jest inhibitorem wzrostu komórek tej linii.



**Rys. 4.** Zdjęcie linii komórkowej MCF-7

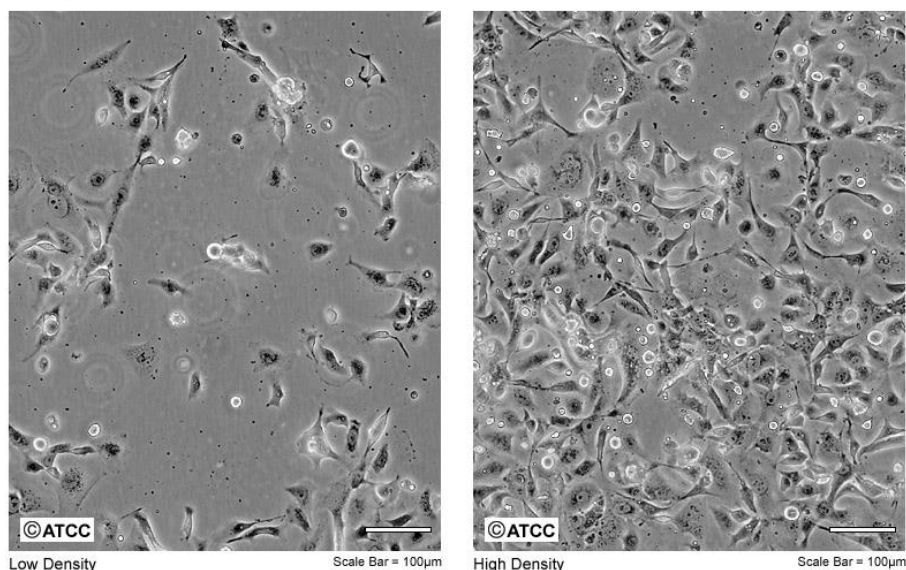
[źródło: [https://www.lgcstandardsatcc.org/~/\\_media/Attachments/Micrographs/Cell/HTB-22.ashx](https://www.lgcstandardsatcc.org/~/_media/Attachments/Micrographs/Cell/HTB-22.ashx); dostęp 8.05.2023]

#### 7.4.2. CHARAKTERYSTYKA LINII HCC38

HCC38 to linia komórkowa, która wyizolowana została z gruczołu sutkowego. Po raz pierwszy wyprowadzona została od 50 letniej kobiety, rasy białej, z wcześniejszą historią mięsaka gładkokomórkowego, której matka zmarła na raka piersi. Komórki linii HCC38 są komórkami, które nie wykazują ekspresji receptorów progesteronowych (PR, ang. progesterone receptor) i estrogenowych (ER, ang. estrogen receptor) jak i receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER2, ang. human epidermal growth factor receptor 2) Nowotwory nie wykazujące ekspresji tych trzech receptorów określa się jako potrójnie ujemne. Komórki linii HCC38 są komórkami adherentnymi, rosnącymi w monowarstwie.



ATCC Number: **CRL-2314**  
Designation: **HCC-38**



**Rys. 5.** Zdjęcie komórek linii HCC38.

[źródło: <https://www.lgcstandardsatcc.org/~media/Attachments/Micrographs/Cell/CRL-2314.ashx>; dostęp 8.05.2023]

## 7.5. METODY

### 7.5.1. HODOWLA KOMÓRKOWA

Hodowlę komórkową prowadzono w warunkach sterylnych, z wykorzystaniem zarówno jałowych naczyń i sprzętu laboratoryjnego. Komórki hodowane były w medium hodowlanym DMEM w przypadku komórek MCF-7 oraz medium RPMI w przypadku komórek HCC-38. Media komórkowe zostały wzbogacone w 10% bydlęcą surowicę płodową (FBS ang. Fetal Bovine Serum) oraz dodatek antybiotyków penicyliny (10 000 jednostek/ml) i streptomycyny (10 000 µg/ml). Komórki hodowano w inkubatorze CO<sub>2</sub>, warunkach standardowych: (37°C, wilgotności 95%, w atmosferze wzbogaconej w 5% CO<sub>2</sub>). Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w fazie logarytmicznego wzrostu komórek, przez pasażowanie do nowych naczyń hodowlanych po osiągnięciu przez hodowlę komórkową konfluencji ok. 75-80%.

### 7.5.2. INKUBACJA KOMÓREK Z BADANYMI ZWIĄZKAMI

Komórki linii HCC38 i MCF-7 wysiewano na 96-dołkowe lub 6-dołkowe płytki, bądź na szalki w zależności od rodzaju wykonywanego eksperymentu. Po upływie 24 godzinnej inkubacji, komórki badanych linii traktowano związkami stilbenowymi (resweratrol, piceatannol bądź piceid) w stężeniach ustalonych na podstawie krzywych przeżywalności (5 lub 25  $\mu\text{M}$  w przypadku linii MCF-7 albo 5 lub 50  $\mu\text{M}$  w przypadku linii HCC38). Następnie komórki preinkubowano 3 godzinny, a po upływie tego czasu, poddawano je działaniu promieniowania jonizującego w dawce 2 lub 6 Gy. Następnie komórki inkubowano 24 h bądź 48 h, po czym wykonywano stosowne oznaczenia.

### 7.5.3. OCENA ŻYWOTNOŚCI KOMÓREK RAKA PIERSI

Komórki w zależności od wykonywanego eksperymentu wysiewano na sterylne szalki ( $\varnothing$  40 mm) bądź 96-dołkowe płytki. Liczby wysiewanych komórek na szalkę oraz płytkę w zależności od stosowanej linii komórkowej oraz czasu inkubacji przedstawiono w Tabeli 3. Liczba wysiewanych komórek została ustalona na podstawie krzywych standaryzacji.

**Tabela 3.** Liczba komórek wysiewanych na płytki/szalki

	MCF-7		HCC38	
	kom/dołek	kom/szalkę	kom/dołek	kom/szalkę
<b>24 h</b>	10000	100 000	5000	50 000
<b>48 h</b>	7500	75 000	4000	40 000

W pierwszym etapie eksperymentu komórki wysiewano na 96-dołkowe płytki i inkubowano w inkubatorze  $\text{CO}_2$  przez 24 h. Po upływie tego czasu komórki traktowano resweratrolem, piceatannołem lub piceidem w stężeniach 2,5-100  $\mu\text{M}$ . Komórki inkubowano z związkami stilbenowymi przez 24 h lub 48 h.

W drugim etapie eksperymentu, komórki wysiewano na 40 mm szalki. Po 24 h do szalek z komórkami dodawano badane związki w stężeniu 5 lub 25  $\mu\text{M}$  w przypadku komórek linii MCF-7 oraz 5 lub 50  $\mu\text{M}$  w przypadku komórek linii HCC38). Po 3 godzinnej preinkubacji, komórki poddawano działaniu promieniowania jonizującego w dawkach 2 i 6

Gy. W eksperymentach zastosowano dawki 2 i 6 Gy ze względu na to, że są to poziomy referencyjne dawek promieniowania rentgenowskiego używane w radioterapii. Komórki następnie inkubowano przez 24 lub 48 godzin. Po upływie odpowiedniego czasu inkubacji do komórek zarówno z pierwszego jak i drugiego etapu eksperymentu dodawano soli tetrazolowej (5 mg/ml) odpowiednio 20  $\mu$ l na dołek płytki hodowlanej lub 200  $\mu$ l na szalkę hodowlaną. Po 2 godzinnej inkubacji z dołków płytek/szalek hodowlanych usuwano medium, a następnie dodawano (100  $\mu$ l na dołek bądź 1000  $\mu$ l na szalkę) dimetylosulfotlenku (DMSO, ang. dimethyl sulfoxide) w celu rozpuszczenia powstałych kryształków formazanu. Absorbancję roztworu formazanu odczytywano spektrometrycznie przy długości fali  $\lambda = 580$  nm i długości fali referencyjnej  $\lambda = 720$  nm. Procent żywych komórek wyliczano porównując wartość absorbancji prób badanych z wartością absorbancji kontroli (komórki nietraktowane związkami). Przyjęto, że absorbancja komórek kontrolnych wynosi 100%.

#### 7.5.4. OKREŚLANIE ZMIAN APOPTOTYCZNYCH I NEKROTYCZNYCH METODĄ CYTOMETRII PRZEPLYWOWEJ

Komórki wysiewano na sterylne szalki ( $\varnothing$  40 mm) w ilości 1 000 000 w przypadku komórek linii MCF-7 oraz 500 000 w przypadku komórek linii HCC38, a następnie inkubowano 24 h. Po upływie tego czasu komórki preinkubowano z resweratolem bądź jego pochodnymi (piceatannol lub piceid) w stężeniu 25  $\mu$ M (linia MCF-7) lub 50  $\mu$ M (linia HCC38) przez 3 godziny w 37°C, a następnie poddawano działaniu promieniowania jonizującego w dawce 6 Gy. Komórki inkubowano przez 24 h, a następnie trypsynizowano, przemywano DPBS i zawieszano w 1 x Binding Buffer do którego dodawano 5  $\mu$ l aneksyny FITC i 5  $\mu$ l jodku propidyny. Komórki inkubowano przez 15 minut w ciemności, a następnie w przeciągu godziny mierzono fluorescencję. Wszystkie pomiary fluorescencji wykonano w cytometrze Becton Dickinson LSR II. Komórki emitujące słabą zieloną fluorescencję (FITC-aneksyna) i słabą czerwoną fluorescencję (jodek propidyny) zliczono jako apoptotyczne.

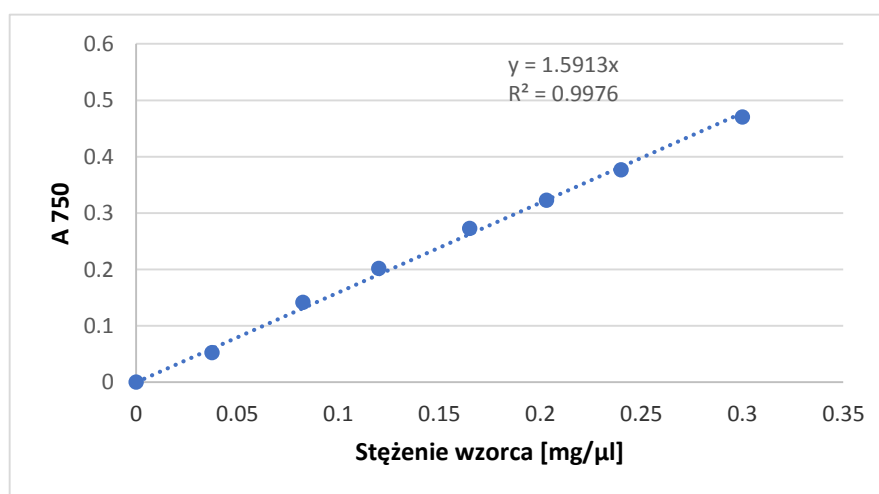
## 7.5.5. WESTERN BLOTTING

### 7.5.5.1. OTRZYMYWANIE LIZATU KOMÓRKOWEGO

Preparaty komórkowe lizowano w buforze RIPA (Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA)) z dodatkiem koktajlu inhibitorów proteaz AEBSF, aprotyninę, bestatynę, E-64, leupeptynę i pepstatynę A (Thermo Scientific 100 × Halt Protease Inhibitor Koktajl). Następnie poddawano 30 minutowej inkubacji na lodzie. Po inkubacji na lodzie, próbki wirowano przy 5000 obr/min przez 5 minut w temperaturze 4°C.

### 7.5.5.2. OZNACZENIE STĘŻENIA BIAŁKA METODĄ LOWRY’EGO

Stężenie białka w preparatach komórkowych określano metodą Lowry’ego. Do 5 µl lizatu komórek dodano kolejno 33 µl 2% roztworu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i 2 µl 2% dodecylosiarczanu sodu. Następnie dodano 200 µl roztworu w którego skład wchodziły: 2% winian sodowo-potasowy, 1% roztwór CuSO<sub>4</sub> oraz 2% roztworu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> w stosunku 1:1:100. Po 10 minutowej inkubacji do każdej próbki dodano 20 µl odczynnika Folina-Ciocalteu’a, który rozcieńczono z wodą w stosunku 1:1, energicznie wymieszano i inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej. Po upływie czasu inkubacji, zmierzono spektrofotometrycznie absorbancję próbek przy długości fali 750 nm. Pomiaru standaryzowano względem kontroli na odczynniki.



**Rys. 6.** Krzywa wzorcowa do oznaczania białka metodą Lowry’ego.

#### 7.5.5.3. ELEKTROFOREZA

Lizaty komórkowe mieszano z Laemmlis Sample Buffer (Serva, Germany) w stosunku 2:1. Przed dodaniem do lizatów komórkowych, Laemmlis Sample Buffer mieszano z 2-merkaptoetanołem w stosunku 0,9 : 0,1. Tak przygotowane próbki elektroforetyczne nanoszono na żel w objętości 30  $\mu$ l.

Rozdział elektroforetyczny próbek przeprowadzono metodą Laemmli (1970) w 12,5% żelu poliakrylamidowym (375 mM Tris-HCl o pH 8,8 oraz 20% SDS). Próbki zatężono w 3% żelu zatężającym (125 mM Tris-HCl pH 6,8 oraz 20% SDS). Elektroforetyczny rozdział próbek został przeprowadzono w układzie: 192 mM glicyna, 0,1% SDS, 25 mM Tris (pH 8,3). Rozdział elektroforetyczny w żelu zatężającym przebiegał przy natężeniu prądu 100 V na pytkę. Po wejściu białek w żel rozdzielający zwiększono natężenie prądu do 120 V na płytkę. Czas rozdziału elektroforetycznego trwał około 2 godzin.

#### 7.5.5.4. TRANSFER BIAŁEK NA MEMBRANĘ IMMOBILONU P

Białka, które uległy rozdzielaniu w żelu poliakrylamidowym zgodnie z metodą Towbina przenoszono elektroforetycznie na membranę Immobilonu-P (o średnicy porów 0,45  $\mu$ m). Elektrotransfer przeprowadzono w buforze o składzie 192 mM glicyna, 20% metanol, 25 mM Tris (pH 8,3) w warunkach 4 °C przy stałym napięciu 60 V przez około 16 godzin.

W celu sprawdzenia jakości elektrotransferu membrany Immobilonu-P barwiono w 0,2% roztworze Ponceau S w 3% kwasie octowym w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Pasma białek odbarwiono w roztworze TBST 0,05 M Tris HCl – 0,15 M NaCl – 0,01% Tween 20, pH 7,5 (TBS-0,01% Tween 20).

#### 7.5.5.5. IMMUNODETEKCJA BIAŁEK

Białka, które unieruchomione zostały na membranie Immobilonu-P poddane zostały immunodetekcji. Metoda ta przebiegała w następujących etapach:

1. Godzinna inkubacja w roztworze TBS – 0,05% Tween 20 (0,05 M Tris HCl – 0,15 M NaCl – 0,05% Tween 20, pH 7,5) w celu ograniczenia niespecyficznego wiązania przeciwciał do membrany.
2. Dwugodzinna inkubacja z rozcieńczonymi roztworem TBS - 0,01%–Tween 20 przeciwciałami I-rzędowymi. Charakterystyka przeciwciał znajduje się w Tabeli 4.
3. 3-krotne przepłukanie membrany za pomocą roztworu TBS – 0,01% Tween 20, w celu usunięcia nadmiaru niezwiązanych z antygenem przeciwciał. Każde z płukań trwało 10 minut.
4. Inkubacja z przeciwciałami II-rzędowymi skompleksowanymi z peroksydazą chrznanu w 0,01% roztworze TBS. Czas inkubacji: 1 godzina.
5. Odplukanie nadmiaru nie związanych z membraną przeciwciał przy użyciu buforu TBS-0,01% Tween 20. Przeciwciała odplukiwano 6-krotnie, a czas każdego płukania wynosił 5 minut.
6. Identyfikacja powstałego kompleksu (antygen-przeciwciało), metodą chemiluminescencji przy użyciu zestawu SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermofisher Scientific™, Litwa).
7. Analiza powstałego kompleksu za pomocą wysokowydajnego systemu Western blot – Azure Imaging Systems (Syngen, Wrocław, Polska).

**Tabela 4.** Charakterystyka przeciwciał wykorzystanych do immunodetekcji.

#### Przeciwciała I-rzędowe

<p><b>Anti-Bcl-2 (sc-7382)</b></p> <p>Mysie przeciwciała monoklonalne klasy IgG skierowane przeciwko białku Bcl-2</p> <p><b>Firma: Santa Cruz Biotechnology®</b></p> <p>1:1000</p>	<p><b>Anti-caspase-3 (sc-7272)</b></p> <p>Mysie przeciwciała monoklonalne klasy IgG skierowane przeciwko białku Kaspazie 3</p> <p><b>Firma: Santa Cruz Biotechnology®</b></p> <p>1:1000</p>
<p><b>Anti-caspase-8 (sc-56070)</b></p> <p>Mysie przeciwciała monoklonalne klasy IgG skierowane przeciwko białku Kaspazie 8</p> <p><b>Firma: Santa Cruz Biotechnology®</b></p> <p>1:1000</p>	<p><b>Anti-GPx1/2 (sc-133160)</b></p> <p>Mysie przeciwciała monoklonalne klasy IgG skierowane przeciwko białku GPx1/2</p> <p><b>Firma: Santa Cruz Biotechnology®</b></p> <p>1:1000</p>

<p><b>Anti-SOD1 (sc-17767)</b></p> <p>Mysie przeciwciała monoklonalne klasy IgG skierowane przeciwko białku SOD1</p> <p><b>Firma: Santa Cruz Biotechnology®</b></p> <p>1:1000</p>	<p><b>Anti-SOD2 (sc-133134)</b></p> <p>Mysie przeciwciała monoklonalne klasy IgG skierowane przeciwko białku SOD2</p> <p><b>Firma: Santa Cruz Biotechnology®</b></p> <p>1:1000</p>
<p><b>Anti-catalase (sc-271803)</b></p> <p>Mysie przeciwciała monoklonalne klasy IgG skierowane przeciwko katalazie</p> <p><b>Firma: Santa Cruz Biotechnology®</b></p> <p>1:1000</p>	<p><b>Anti-p53 (sc-393031)</b></p> <p>Mysie przeciwciała monoklonalne klasy IgG skierowane przeciwko białku p53</p> <p><b>Firma: Santa Cruz Biotechnology®</b></p> <p>1:1000</p>
<p><b>Anti-Nrf2 (sc-365949)</b></p> <p>Mysie przeciwciała monoklonalne klasy IgG skierowane przeciwko białku Nrf2</p> <p><b>Firma: Santa Cruz Biotechnology®</b></p> <p>1:1000</p>	<p><b>Anti-Rad51 (sc-56212)</b></p> <p>Mysie przeciwciała monoklonalne klasy IgG skierowane przeciwko białku Rad51</p> <p><b>Firma: Santa Cruz Biotechnology®</b></p> <p>1:1000</p>
<p><b>Anti-H2A.X (sc-517336)</b></p> <p>Mysie przeciwciała monoklonalne klasy IgG skierowane przeciwko białku H2A.X</p> <p><b>Firma: Santa Cruz Biotechnology®</b></p> <p>1:1000</p>	<p><b>Anti-β-actin (sc-517336)</b></p> <p>Mysie przeciwciała monoklonalne klasy IgG skierowane przeciwko białku β-aktynie</p> <p><b>Firma: Santa Cruz Biotechnology®</b></p> <p>1:1000</p>
<p><b>Przeciwciała II-rzędowe</b></p>	
<p><b>m-IgGκ BP (sc-516102)</b></p>	
<p>Mysie białko wiążące łańcuch lekki IgGκ (m-IgGκ BP sprzężone z peroksydazą chrzanu)</p> <p><b>Firma: Santa Cruz Biotechnology®</b></p> <p>1:5000</p>	

#### 7.5.5.6. ANALIZA DENSYTOMETRYCZNA

Uzyskane wyniki z poziomu badanych białek analizowano densytometrycznie w programie Image J. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie zintegrowanej gęstości optycznej (IOD, ang. Integrated Optical Density). Wartości gęstości optycznych uzyskanych dla pasm odpowiadających poszczególnym białkom dzielono przez wartość gęstości optycznej uzyskanej dla pasma β-aktyny.



### 7.5.6. REAKCJA ŁAŃCUCHOWEJ POLIMERAZY Z ANALIZĄ PRZYROSTU PRODUKTU W CZASIE RZECZYWISTYM (RT-PCR)

Całkowite RNA zostało wyekstrahowane przy użyciu zestawu Extractme Total RNA zgodnie z zaleceniami producenta. Stężenie wyizolowanego RNA oznaczano za pomocą spektrofotometru NanoDrop. Wszystkie uzyskane próbki RNA były przechowywane do dalszych analiz w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . Około  $1\ \mu\text{g}$  wyekstrahowanego RNA poddano odwrotnej transkrypcji do cDNA za pomocą zestawu do odwrotnej transkrypcji (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit), zgodnie z protokołem zamieszczonym przez producenta. Próbkę cDNA trzymano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  aż do użycia.

Ekspresję genów *p53*, *Bcl-2*, *Bax*, *kaspazy 3* i *kaspazy 8* oceniono za pomocą sondy Eva Green (Solis Biodyne, Tartu, Estonia). Gen *HPRT* zastosowano jako gen referencyjny. W Tabeli 5 przedstawione zostały sekwencje starterów stosowanych podczas reakcji RT-PCR (ang. Real Time PCR). Reakcję łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym przeprowadzono przy użyciu termocyklera Eco 48 Real time PCR. Mieszanina reakcyjna składała się z:  $2\ \mu\text{l}$  EvaGreen Supermix,  $1\ \mu\text{l}$  cDNA i  $0,2\ \mu\text{l}$  każdego zestawu starterów,  $6,6\ \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Wszystkie próbki amplifikowano w trzech powtórzeniach. Profil termiczny obejmował:  $12\ \text{s}$  w  $95^{\circ}\text{C}$  i 40 cykli w  $95^{\circ}\text{C}$  przez  $15\ \text{s}$  i  $60^{\circ}\text{C}$  przez  $20\ \text{s}$ .

**Tabela 5.** Nazwy badanych genów wraz z sekwencjami odpowiednio zaprojektowanych starterów

Nazwa genu	Sekwencja starterów F	Sekwencja starterów R
<b>HPRT</b>	ATGGACAGGACTGAACGTCTT	TCCAGCAGGTCAGCAAAGAA
<b>p53</b>	TAACAGTTCCTGCATGGGCGGC	AGGACAGGCACAAACACGCACC
<b>Bcl-2</b>	TTGTGGCCTTCTTTGAGTTCGGTG	GGTGCCGGTTCAGGTACTIONCAGTCA
<b>Bax</b>	CCTGTGCACCAAGGTGCCGGAAC	CCACCCTGGTCTTGGATCCAGCCC
<b>Caspase 3</b>	TGGACTGTGGCATTGAGAC	CAAAGCGACTGGATGAACC
<b>Caspase 8</b>	CTGGATGATGACATGAACCTGCTG	GCTCTTGTTGATTTGGGCACAGAC



## 7.5.7. TEST AKTYWNOŚCI ENZYMÓW PRZECIWUTLENIAJĄCYCH

### 7.5.7.1. PRZYGOTOWANIE LIZATÓW KOMÓRKOWYCH

W celu określenia aktywności enzymów przeciwutleniających komórki wysiano na sterylne szalki (Ø 40 mm) do hodowli tkankowych. Gęstość wysianych komórek wynosiła 500 000 komórek na szalkę. Komórki hodowano przez 24 godziny, a następnie wstępnie inkubowano z resweratolem i jego pochodnymi (piceatannol lub piceid) w stężeniach (25 µM w przypadku komórek linii MCF-7 bądź 50 µM w przypadku komórek linii HCC38) przez 3 godziny w 37 ° C i eksponowano na IR (2 lub 6 Gy). Komórki inkubowano przez 24 i 48 godzin. Następnie komórki zebrano i przemyto dwukrotnie zimnym DPBS. Supernatant usunięto, a komórki ponownie zawieszono w 100 µl koktajlu inhibitora proteazy, który zawierał sześć inhibitorów proteazy o szerokim spektrum działania: AEBSF, aprotyninę, bestatynę, E-64, leupeptynę i pepstatynę A (Thermo Scientific 100 × Halt Protease Inhibitor Koktajl). Próbkę zamrożono w temperaturze -20°C.

### 7.5.7.2. AKTYWNOŚĆ KATALAZY

Aktywność CAT (ang. catalase) oznaczano monitorując szybkość zanikania H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> przy 240 nm (Aebi, 1984). Jedną jednostką CAT jest aktywność katalazy, która katalizuje konwersję 1 µmola nadtlenku wodoru na minutę.

### 7.5.7.3. AKTYWNOŚĆ PERKOSYDAZY GLUTATIONOWEJ

Aktywność GPx (ang. glutathione peroxidase) określono spektrofotometrycznie przy 340 nm, mierząc szybkość utleniania glutationu (GSH, ang. glutathione gulfhydryl) przez wodoronadtlenek t-butyłu (tBOOH), zgodnie z metodą Rice-Evans i in. (1991) (Rice-Evans i in., 1991).

### 7.5.7.4. AKTYWNOŚĆ DYSMUTAZY PONADTLENKOWEJ

Aktywność SOD (ang. superoxide dismutase ) opierała się na zdolności SOD do hamowania autoutleniania epinefryny w zasadowym pH. Utlenianie epinefryny śledzono pod kątem wytwarzania adrenochromu, który wykazuje maksimum absorpcji przy 480 nm (Misra i Fridovich, 1972). Jedna jednostka SOD jest opisana jako ilość enzymu wymagana

do spowodowania 50% zahamowania autoutleniania epinefryny na 300  $\mu$ l mieszaniny testowej.

Wszystkie aktywności enzymów (CAT, GPx i SOD) wyrażono jako wartości względne, normalizowane względem kontroli. Stężenie białka określono metodą Bradforda. Absorbancje próbek mierzono przy 595 nm, a jako wzorzec stosowano albuminę surowicy bydlęcej.

#### 7.5.8. ANALIZA STATYSTYCZNA

Wyniki badań przedstawiono w postaci średniej  $\pm$  odchylenie standardowe. W celu porównania prób badawczych wykorzystano dwukierunkową analizę wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Tukeya. Analizę wyników przeprowadzono za pomocą programu STATISTICA 13.3. Dla otrzymanych wyników przyjęto poziom istotności  $p < 0,05$ . Średnią różnicę porównano z kontrolą (\*), a także z promieniowaniem jonizującym (#).

## 8. WYNIKI

Praca doktorska składa się z dwóch części. Pierwszą część stanowią dwie publikacje, z których jedna jest pracą przeglądową (I), a druga pracą oryginalną (II). Artykuły opublikowano w czasopismach o międzynarodowym zasięgu, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports. Druga część pracy zawiera nieopublikowane wyniki badań uzyskane dla linii HCC38 oraz uzupełnienie badań dotyczących linii MCF-7.

### 8.1. OMÓWIENIE PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Praca przeglądowa “*Natural Radiosensitizers in Radiotherapy: Cancer Treatment by Combining Ionizing Radiation with Resveratrol*” stanowi obszerne wprowadzenie do tematyki niniejszej pracy doktorskiej. Zawarto w niej opis mechanizmów odpowiedzialnych za radiooporność komórek nowotworowych oraz przedstawiono założenia i cele radioterapii. Ponadto zdefiniowano pojęcie *radiouczulacze* i wskazano molekularne mechanizmy, w których uczestniczą. Opisano również naturalnie występujące związki, które mogą pełnić rolę radiouczulaczy i obecnie są w fazie badań klinicznych (kurkumina, genisteina, papaweryna). Ze względu na tematykę pracy doktorskiej najwięcej uwagi poświęcono resweratrolowi. Jest to pochodna stilbenowa bardzo szeroko badana ze względu na wielokierunkową aktywność biomedyczną. Duża liczba danych literaturowych pozwoliła zawrzeć w pracy rezultaty badań klinicznych dotyczących zastosowania resweratrolu np. u chorych na różnego typu nowotwory, w leczeniu cukrzycy, chorób sercowo-naczyniowych oraz neurodegeneracyjnych. Jeden z rozdziałów zawiera opis badań, głównie *in vitro*, w których resweratrol stosowano w charakterze radiouczulacza.

Praca oryginalna “*Comparison of the Effects of Resveratrol and Its Derivatives on the Radiation Response of MCF-7 Breast Cancer Cells*”, zawiera opis przeprowadzonych badań, które pozwoliły wskazać pochodną stilbenową, która najefektywniej uwrażliwia komórki raka piersi linii MCF-7 na działanie promieniowania jonizującego. W pracy badano 3 pochodne stilbenowe (resweratrol, piceatnol oraz piceid), które stosowano w stężeniach 5 lub 25  $\mu\text{M}$ . Przeprowadzone badania miały na celu ocenę właściwości cytotoksycznych

stosowanych związków stilbenowych w połączeniu z promieniowaniem jonizującym, ocenę poziomu apoptozy, a także ekspresji genów apoptotycznych oraz poziomu enzymów antyoksydacyjnych. Uzyskane wyniki wykazały, że spośród badanych związków resweratrol najbardziej nasilał działanie promieniowania jonizującego w badanych układach. Efekt ten wynikał m.in. ze znacznego spadku aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Ponadto działanie resweratrolu w kombinacji z promieniowaniem zwiększało ekspresję genów apoptotycznych takich jak: *bax*, *p53* i *kaspazy 8*, prowadząc do apoptozy.

## 8.2. UZUPEŁNIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW DLA LINII KOMÓRKOWEJ MCF-7

Wyniki opublikowane w oryginalnej publikacji wchodzącej w skład pracy doktorskiej zostały uzupełnione o dodatkowe oznaczenia. Dzięki temu można było skorygować i uzupełnić wcześniej zaproponowany mechanizm działania resweratrolu i jego pochodnych w kombinacji z promieniowaniem jonizującym w komórkach MCF-7.

Dodatkowe badania przeprowadzono metodą immunodetekcji białek techniką Western blot. Oznaczono poziom białek: **(a)** zaangażowanych w proces apoptozy (Bcl-2, p53, kaspazy 3 i kaspazy 8), **(b)** związanych z antyoksydacyjną odpowiedzią obronną komórki tj. poziom enzymów antyoksydacyjnych: SOD1, SOD2 GPx1/2, katalazy oraz czynnika Nrf2, kluczowego białka kontrolującego ekspresję wielu genów działających cytoprotekcyjnie, **(c)** białek związanych z naprawą DNA tj. Rad51 oraz histonu H2AX.

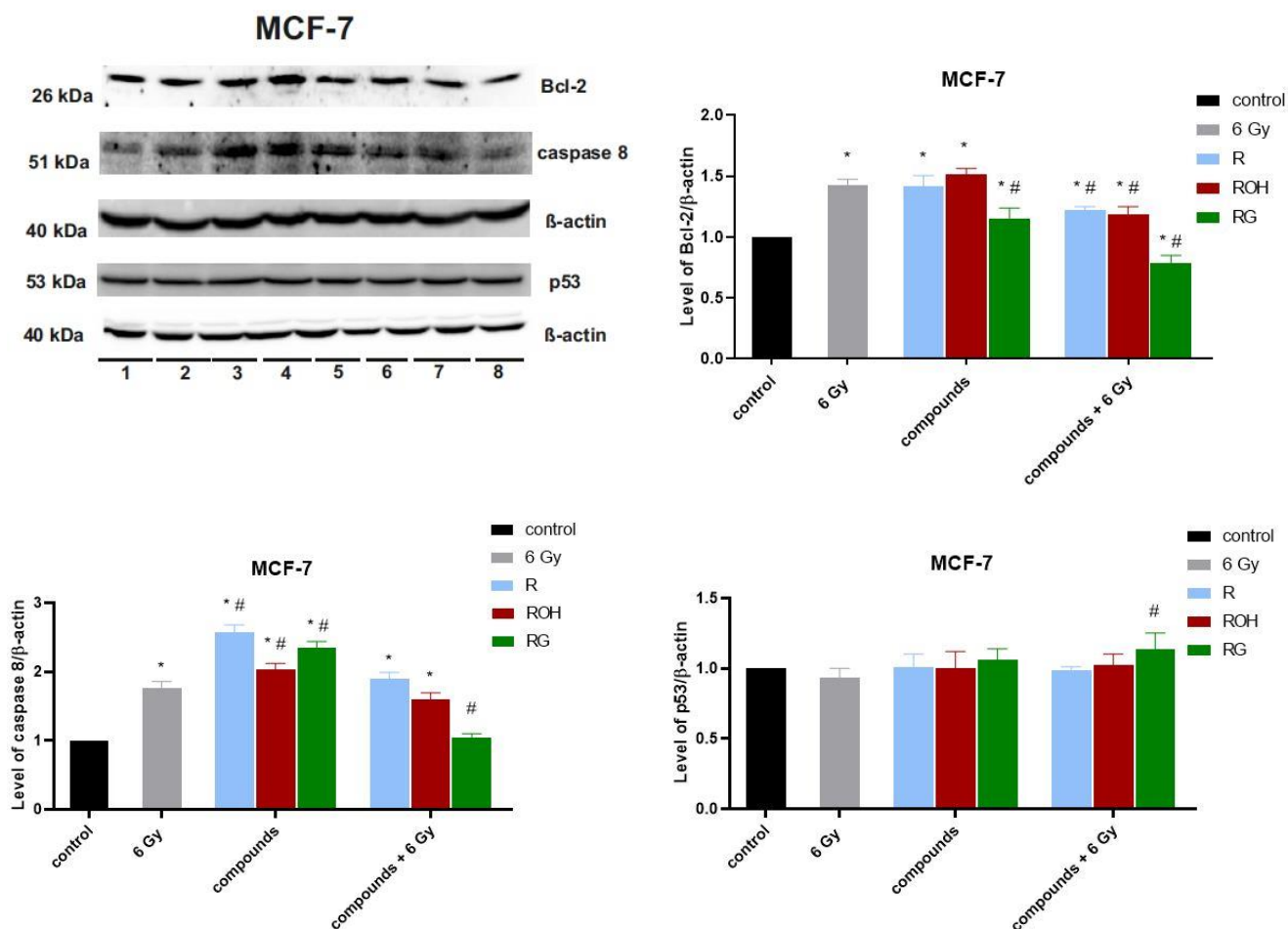
W komórkach MCF-7 poziom ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-2 rośnie we wszystkich badanych układach z wyjątkiem komórek traktowanych piceidem, a następnie naświetlanych. Zaobserwowano jednak, że wzrost poziomu Bcl-2 w komórkach jednocześnie poddawanych działaniu badanych związków i promieniowania jonizującego jest niższy niż w komórkach traktowanych samym promieniowaniem. We wcześniejszych badaniach umieszczonych w pracy oryginalnej (II) oznaczono poziom ekspresji genu *Bcl-2* metodą RT-PCR. Wykazano tam odwrotną tendencję tzn. wyższą ekspresję w komórkach traktowanych badanymi związkami w połączeniu z promieniowaniem jonizującym w porównaniu z poziomem ekspresji *Bcl-2* w komórkach poddanych działaniu samego promieniowania lub samych związków. Nie zawsze jednak wzrost ekspresji genu przekłada

się na wzrost poziomu białka. Badania innych autorów wykazują, że w komórce synteza białek wymaga dużego nakładu energii, nawet do 40% całkowitego zapotrzebowania energetycznego komórki. Stąd też w komórkach uszkodzonych np. na skutek działania RFT poziom białka może być niższy niż poziom ekspresji genów (Braunstein i in., 2009; Buttgerit & Brandt, 1995; Lü i in., 2006).

Przeprowadzone badania wykazały znaczący wzrost poziomu kaspazy 8 zarówno w komórkach MCF-7 traktowanych samym promieniowaniem, samymi związkami oraz resweratolem lub piceatannolem w połączeniu z IR. Brak zmian poziomu białka obserwowano tylko w komórkach traktowanych piceidem i następnie naświetlanych, w porównaniu do komórek kontrolnych. Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdzają, że w badanej linii komórkowej wzrost poziomu kaspazy 8 zachodzi nie tylko na poziomie mRNA, co wykazano w publikacji (II), ale także na poziomie białka. Tym samym potwierdzono, że w komórkach MCF-7 apoptoza zachodzi z udziałem zewnętrznego szlaku apoptotycznego.

W komórkach MCF-7, w żadnym z badanych układów nie wykazano wzrostu poziomu białka p53 w porównaniu do kontroli, pomimo iż wcześniej obserwowano wzrost poziomu mRNA dla p53 (Komorowska i in., 2021). Oznacza to, że w komórkach linii MCF-7 apoptoza aktywowana jest niezależnie od białka p53. Podobny mechanizm indukcji apoptozy w MCF-7 poddanych działaniu promieniowania jonizującego, niezależny od białka p53, obserwowany był również przez innych autorów (Essmann i in., 2004).

W pracy podjęto również próbę oceny poziomu kaspazy 3, jednakże zgodnie z oczekiwaniami nie wykryto tego białka w komórkach MCF-7 (Komorowska i in., 2021).



**Rys.7.** Wynik analizy poziomu białek związanych z procesem apoptozy (Bcl-2, kaspazy 3, kaspazy 8, p53) oznaczony metodą Western Blot po traktowaniu komórek linii MCF-7 związkami stilbenowymi (resweratrol, piceatanol, piceid) oraz po zastosowaniu promieniowania i kombinacji promieniowania z badanymi związkami. Zastosowana dawka promieniowania 6 Gy. Istotności statystyczne w porównaniu do kontroli przedstawiono w postaci \* $p < 0,05$ . Istotności statystyczne w porównaniu do zastosowanej dawki promieniowania przedstawiono w postaci # $p < 0,05$ . Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń.

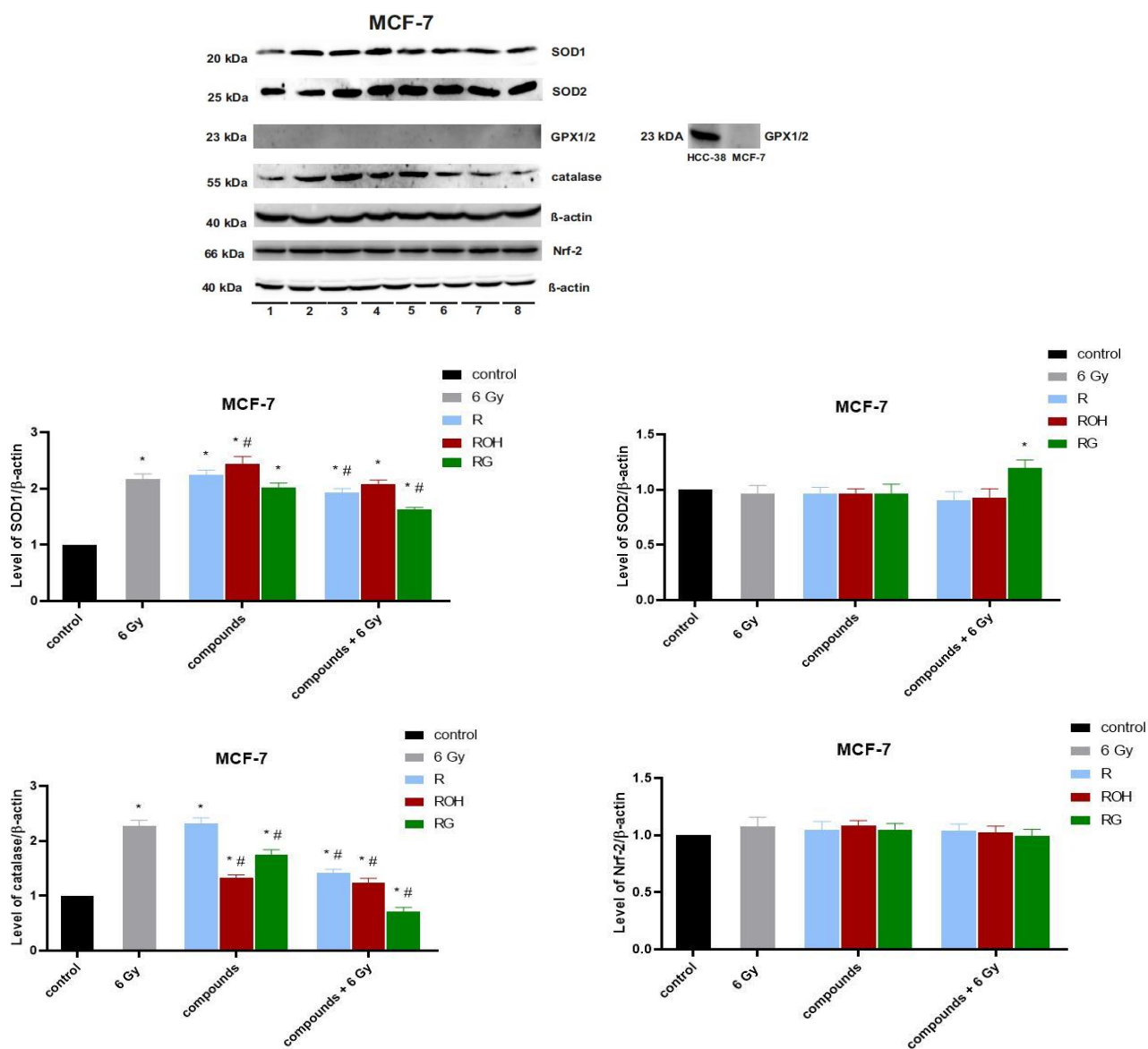
W kolejnym etapie oceniono poziom ekspresji enzymów antyoksydacyjnych oraz białka Nrf2. Pierwszymi z badanymi enzymów były dysmutazy ponadtlenkowe: cytoplazmatyczna (SOD1) oraz mitochondrialna (SOD2). We wszystkich badanych układach obserwowano znaczący statystycznie, około dwukrotny wzrost poziomu SOD1. Nie odnotowano natomiast zmian poziomu SOD2 w stosunku do kontroli, z wyjątkiem komórek traktowanych piceidem i naświetlanych, w których wzrost poziomu białka wynosił ok. 30%. Poziom białek SOD1 i SOD2 nie we wszystkich przypadkach koreluje z oznaczoną

całkowitą aktywnością enzymatyczną dysmutazy zamieszczoną w publikacji (II). Różnice te wynikać mogą z różnych czasów inkubacji, którym poddano komórki przed wykonaniem oznaczenia. Poziom białka metodą Western Blot wykonywano po 24 h, natomiast poziom aktywności po 48 h od naświetlania. Dodatkowo zastosowana w pracy metoda pozwoliła oznaczyć całkowitą aktywność w komórkach, a nie tylko aktywność izoenzymów SOD1 i SOD2.

Poziom katalazy w MCF-7 wzrasta we wszystkich układach za wyjątkiem komórek preinkubowanych z piceidem, a następnie naświetlanych. Największy, około dwukrotny wzrost obserwowano w komórkach poddanych działaniu samego promieniowania jonizującego oraz samego resweratrolu. Khan i wsp. w swoich badaniach również zaobserwowali wzrost poziomu katalazy w komórkach traktowanych resweratrolem (Khan i in., 2013). W pozostałych przypadkach wzrost poziomu katalazy jest znacznie niższy. Istotny w kontekście radioterapii jest znaczący spadek poziomu katalazy w komórkach preinkubowanych z badanymi stilbenami i naświetlanych w porównaniu do komórek poddawanych działaniu samego promieniowania. Szczególnie w układzie, w którym komórki traktowano resweratrolem i jednocześnie promieniowaniem [(MCF-7 + resweratrol)+IR] spadek poziomu katalazy koreluje ze znacznym spadkiem jej aktywności enzymatycznej. Zwiększony poziom nadtlenu wodoru w komórce może prowadzić m.in. do wzmożonej indukcji procesu apoptozy, co obserwowano w tym układzie.

Ostatnimi enzymami, dla których podjęto próbę oznaczenia poziomu w komórkach MCF-7 były dwa izoenzymy peroksydazy glutationowe 1 i 2. Jednak zastosowaną metodą nie wykryto ich. Wynika to prawdopodobnie z ich braku bądź niskiego poziomu w komórkach tej linii, co wcześniej odnotowali inni Autorzy. Kulak i wsp. obserwowali niski poziom mRNA dla GPx1, jednak nie wykazali obecności białka metodą Western Blot (Kulak i in., 2013). Z kolei Chu i wsp., pomimo iż odnotowali aktywność GPx2 to wykazali bardzo niski poziom białka w komórkach Chu i in., 1999). W badaniach wchodzących w skład niniejszej rozprawy oznaczono także całkowitą aktywność GPx w komórkach. Wyniki zamieszczono w pracy oryginalnej (II). Wykazano wzrost aktywności peroksydazowej w komórkach poddanych działaniu promieniowania jonizującego, zarówno w obecności jak i pod nieobecność pochodnych stilbenowych.

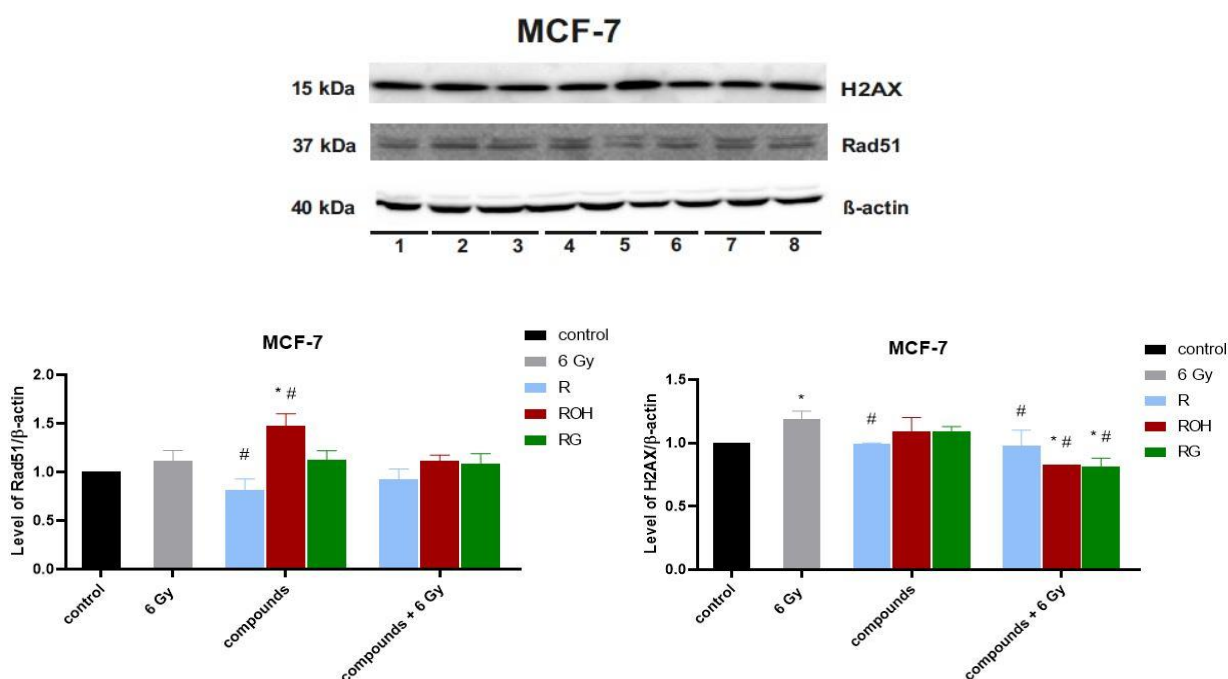
Za aktywację szlaków odpowiedzi antyoksydacyjnej w komórce odpowiedzialny jest m.in. czynnik transkrypcyjny Nrf2. Nie wykazano jednak zmian poziomu tego białka w stosunku do kontroli w MCF-7 w żadnym z badanych układów.



**Rys. 8.** Wynik analizy poziomu enzymów antyoksydacyjnych (SOD1, SOD2, GPx1/2, katalazy) oraz poziomu białka Nrf2 oznaczony metodą Western Blot po traktowaniu komórek linii MCF-7 związkami stilbenowymi (resweratrol, piceatanol, piceid) oraz po zastosowaniu promieniowania i kombinacji promieniowania z badanymi związkami. Zastosowana dawka promieniowania 6Gy. Istotności statystyczne w porównaniu do kontroli przedstawiono w postaci \*p<0,05. Istotności statystyczne w porównaniu do zastosowanej dawki promieniowania przedstawiono w postaci #p<0,05. Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń.



Radiowrażliwość komórek nowotworowych w dużej mierze zależy od skuteczności naprawy uszkodzonego DNA. W związku z tym w pracy oznaczono poziom ekspresji dwóch białek zaangażowanych w procesy naprawy DNA – białka Rad51 oraz histonu H2AX. Uzyskane wyniki wskazują, że badane pochodne stilbenowe nie wzmagają, a w niektórych przypadkach nawet obniżają poziom ekspresji białka Rad51 i H2AX w komórkach poddanych działaniu RFT generowanych radiacyjnie. Jedynym przypadkiem w którym obserwujemy wzrost poziomu białka Rad51, w stosunku do kontroli, są komórki traktowane samym piceatannolem.



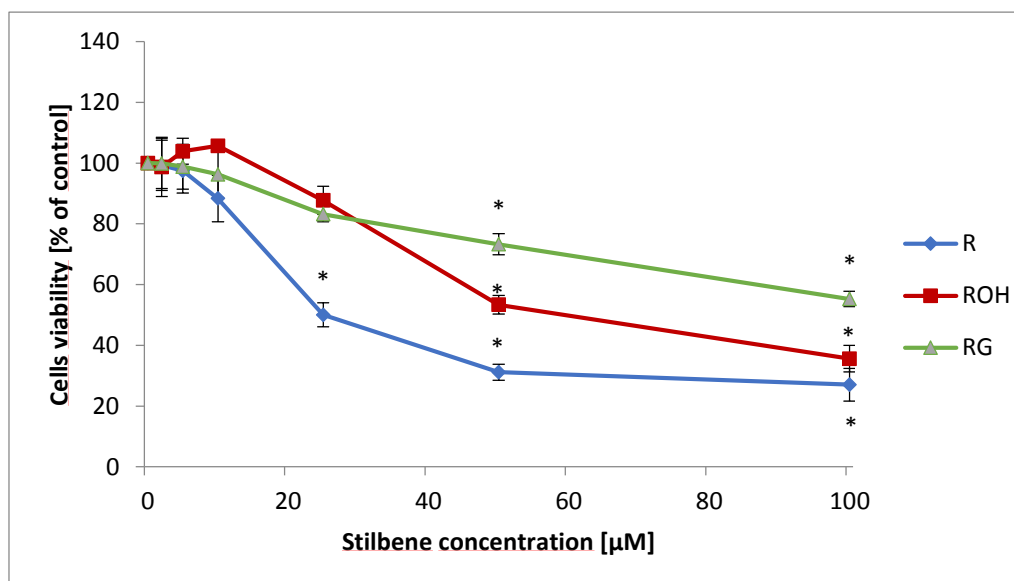
**Rys. 9.** Wynik analizy poziomu białek związanych z naprawą i uszkodzeniami DNA (Rad51, H2AX) oznaczony metodą Western Blot po traktowaniu komórek linii MCF-7 związkami stilbenowymi (resweratrol, piceatanol, piceid) oraz po zastosowaniu promieniowania i kombinacji promieniowania z badanymi związkami. Zastosowana dawka promieniowania 6 Gy. Istotności statystyczne w porównaniu do kontroli przedstawiono w postaci \*p<0,05. Istotności statystyczne w porównaniu do zastosowanej dawki promieniowania przedstawiono w postaci #p<0,05. Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń.

### 8.3. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW DLA LINII KOMÓRKOWEJ HCC38

W tej części pracy do badań wybrano komórki linii HCC38, które wywodzą się z potrójnie ujemnego raka piersi. Komórki te nie wykazują ekspresji receptorów hormonalnych (estrogenowych i progesteronowych) oraz nie posiadają nadekspresji receptora HER2. Potrójnie ujemny rak piersi jest jednym z agresywniejszych podtypów tego nowotworu.

Wyniki eksperymentalne uzyskane dla linii HCC38 pozwalają porównać skuteczność radiouczulającego działania resweratrolu i jego dwóch pochodnych: piceatannolu i piceidu.

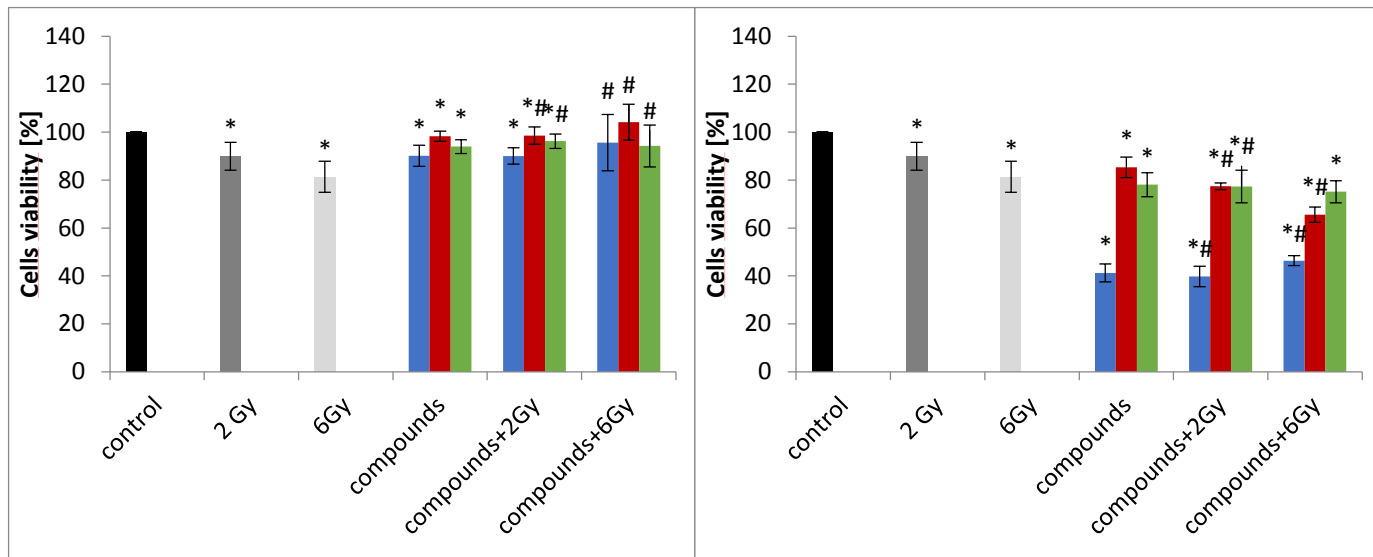
W pierwszej części pracy sprawdzono jakie stężenia wybranych do badań pochodnych stilbenowych są cytotoksyczne w stosunku do komórek HCC38. Komórki traktowano związkami w zakresie stężeń 2,5–100  $\mu\text{M}$  przez 48 godzin. Cytotoksyczność określano za pomocą testu MTT. Na podstawie przeprowadzonych oznaczeń stwierdzono, że związki zastosowane w najniższych stężeniach tj. 2,5 - 10  $\mu\text{M}$  nie wpływały znacząco lub zwiększały żywotność metaboliczną komórek. Działanie cytotoksyczne obserwowano: dla resweratrolu gdy stężenie było wyższe niż 10  $\mu\text{M}$ , natomiast dla piceatannolu i piceidu, gdy stężenie było wyższe niż 25  $\mu\text{M}$ . Inni autorzy również wykazali, że resweratrol i piceatannol, a także inne niskocząsteczkowe związki roślinne, stosowane w niskich stężeniach działają stymulująco zwiększając np. żywotność komórek nowotworowych, podczas gdy wyższe stężenia związków działają cytotoksycznie (Tan i in., 2017; X. Wang i in., 2016; Xiong i in., 2016).



**Rys. 10.** Krzywa przeżywalność komórek linii HCC38

Do oceny cytotoksycznego działania wybranych pochodnych stilbenowych w kombinacji z promieniowaniem jonizującym zastosowano dwa stężenia związków: 5 µM i 50 µM oraz dawkę promieniowania jonizującego równą 2 i 6 Gy. Test MTT przeprowadzono po 48 h od napromieniowania komórek, które wcześniej poddano działaniu wybranymi związkami. Ustalono, że samo promieniowania jonizującego spowodowało spadek żywotności komórek o ok. 10% i 20% odpowiednio po dawce 2 i 6 Gy. Zastosowanie resweratrolu, piceatannolu bądź piceidu w niskich stężeniach (5 µM) w połączeniu z promieniowaniem jonizującym zwiększa przeżywalność komórek w porównaniu z komórkami poddanymi działaniu jedynie samego promieniowania. Efekt działania związków w stężeniu 10-krotnie wyższym (50 µM) w połączeniu z IR uzależniony był od rodzaju stosowanego związku. Piceatannol lub piceid w połączeniu z promieniowaniem obniżył aktywność metaboliczną maksymalnie o ok. 7% w porównaniu do komórek traktowanych samym promieniowaniem. W przypadku skojarzonego działania resweratrolu z promieniowaniem spadek aktywności metabolicznej wynosił około 50% i 30% w porównaniu z komórkami poddanymi działaniu promieniowania, odpowiednio przy dawce 2 Gy i 6 Gy. Zgodnie z danymi literaturowymi wyniki testu MTT nie są w pełni wiarygodne, jeśli w badaniach stosowano promieniowanie jonizujące. Test MTT mierzy tempo metabolizmu mitochondriów i pośrednio odzwierciedla liczbę żywych komórek. Rai i in., potwierdzili w badaniach na komórkach wywodzących się z różnych linii nowotworowych, w tym na komórkach raka piersi, że promieniowanie jonizujące zmniejsza

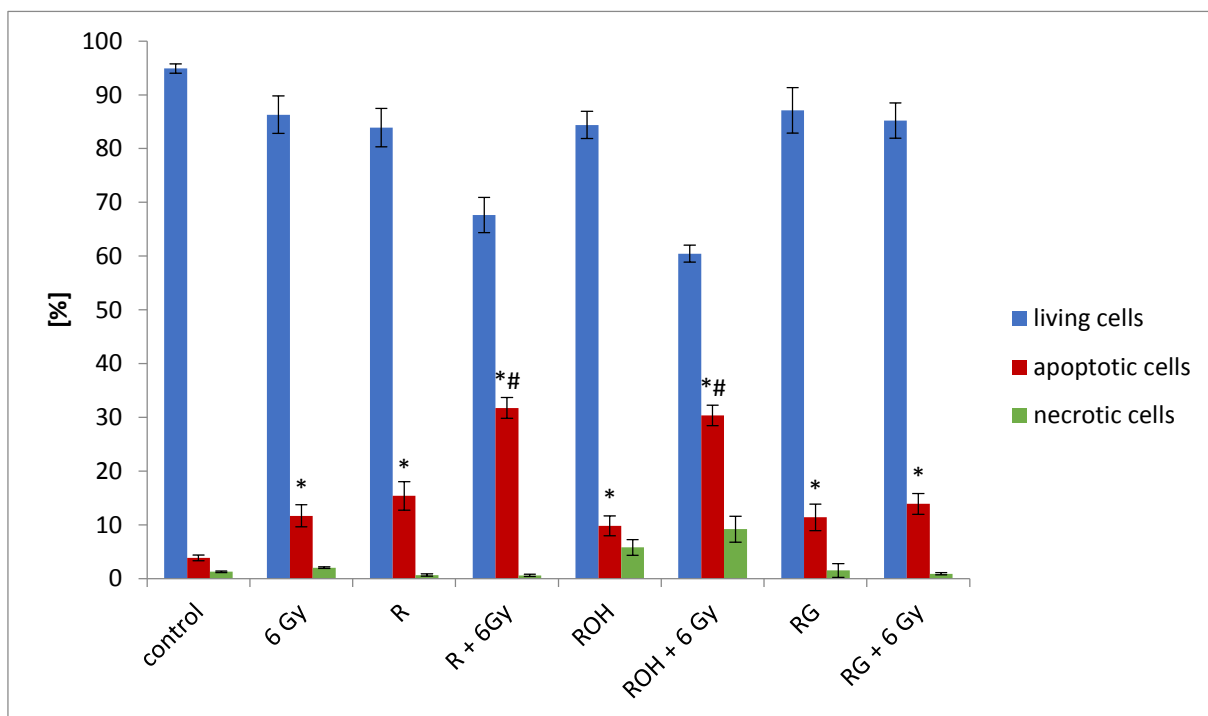
liczbę żywych komórek w większym stopniu niż wskazują wyniki z testu MTT. Autorzy wykazali, że promieniowanie indukuje biogenezę i hiperaktywację mitochondriów prowadząc do zwiększonej żywotności metabolicznej i redukcji MTT (Rai i in., 2018).



**Rys. 11.** Przeżywalność komórek linii HCC38 po zastosowaniu związków w stężeniu a) 5  $\mu$ M oraz b) 50  $\mu$ M samych bądź w kombinacji z promieniowaniem jonizującym w dawce 2 lub 6 Gy. Istotności statystyczne w porównaniu do kontroli przedstawiono w postaci \* $p < 0,05$ . Istotności statystyczne w porównaniu do zastosowanej dawki promieniowania przedstawiono w postaci # $p < 0,05$ .

W celu weryfikacji wyżej opisanych wyników i ustalenia mechanizmu działania pochodnych stilbenowych w kombinacji z promieniowaniem jonizującym sprawdzono w jakim stopniu dochodzi do śmierci komórek w badanych układach. Ocenę tę przeprowadzono metodą cytofluorymetryczną z zastosowaniem zestawu Annexin V-FITC Apoptosis Kit. Dalsze badania wykonano stosując 50  $\mu$ M stężenie badanych związków oraz dawkę promieniowania równą 6 Gy.

W komórkach poddanych działaniu samego promieniowania jonizującego, bądź też samych związków, zaobserwowano porównywalny poziom apoptozy, który wynosił ok 12% w komórkach napromieniowanych oraz 15%, 10% i 11% w komórkach traktowanych kolejno resweratrolem, piceatannolem oraz piceidem. Zastosowanie obu czynników tj. preinkubacja ze związkami, a następnie naświetlanie znacząco wzmagало apoptozę w komórkach traktowanych resweratrolem i piceatannolem. Można zatem stwierdzić, że zarówno resweratrol jak i piceatannol uwrażliwiał komórki linii HCC38 na działanie promieniowania jonizującego. Podobne efekty działania resweratrolu obserwowano dla innych komórek nowotworowych np. komórek nowotworowych głowy i szyi (Baek i in., 2016), komórek raka prostaty (Fang i in., 2012), jak również dla komórek nowotworu piersi (komórki MCF-7) (da Costa Araldi i in., 2018; Komorowska i in., 2021). Brakuje natomiast danych literaturowych dotyczących działania analogów resweratrolu np. piceatannolu czy piceidu na komórki nowotworowe. Niniejsze badania dowodzą, że nawet niewielkie różnice strukturalne powodują, że związki w różny sposób działają na procesy komórkowe.

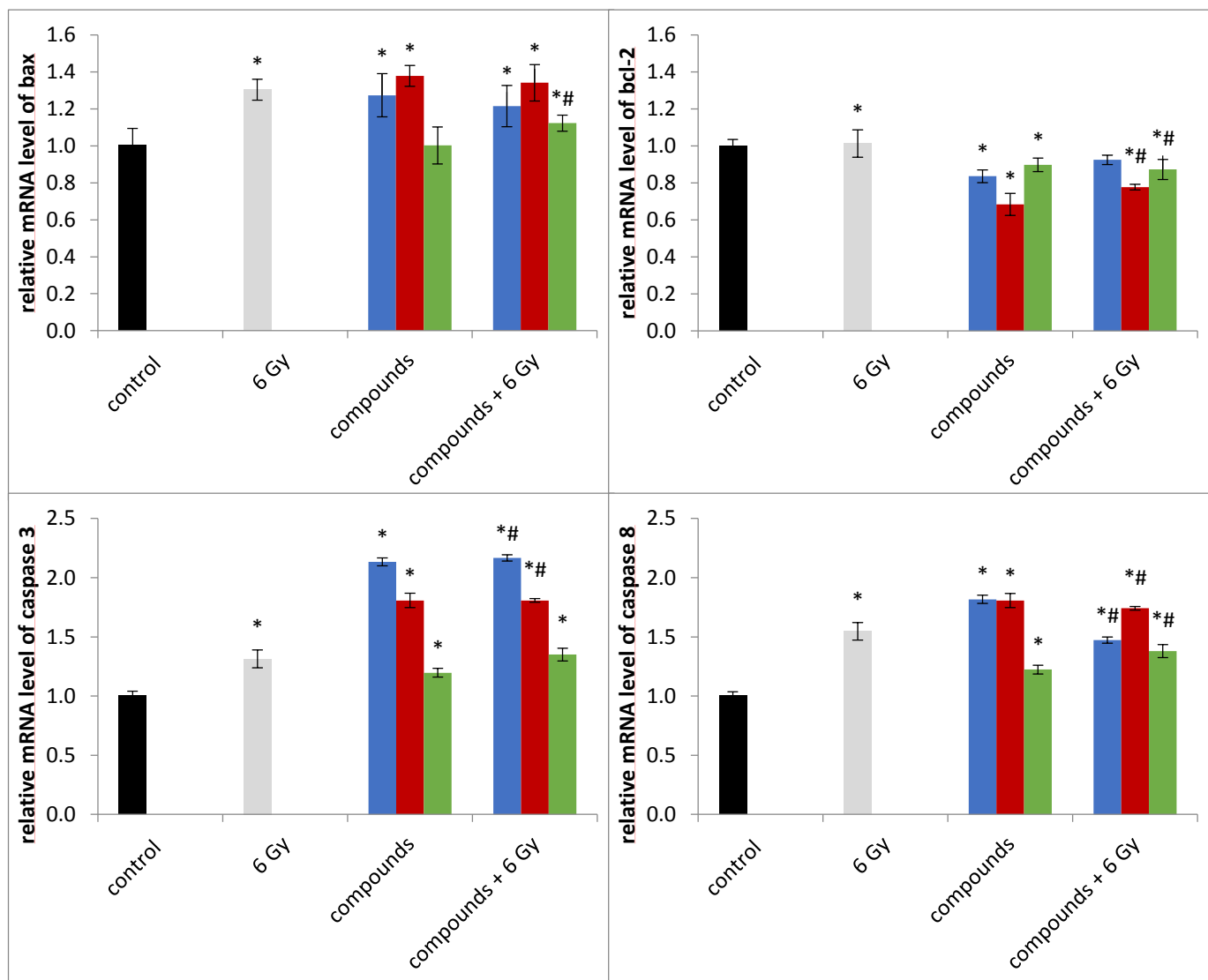


**Rys. 12.** Wyniki analizy poziomu apoptozy lub nekrozy w komórkach linii HCC38 traktowanych badanymi związkami w stężeniu 50  $\mu$ M samymi bądź w skojarzeniu z promieniowaniem jonizującym w dawce 6 Gy. Istotności statystyczne w porównaniu do kontroli przedstawiono w postaci \* $p < 0,05$ ;. Istotności statystyczne w porównaniu do zastosowanej dawki promieniowania przedstawiono w postaci # $p < 0,05$ .

Następnym etapem badań było sprawdzenie ekspresji genów, które biorą udział w procesie apoptozy: *kaspazy 3*, *kaspazy 8*, *Bax* i *Bcl-2*, a także sprawdzenie poziomu ekspresji białek: kaspaz 3 i 8, p53 oraz Bcl-2. Podjęto również próbę oceny ekspresji białka Bax, jednakże w żadnej z badanych linii nie uzyskano wyników, co najprawdopodobniej wynikało ze złej jakości zakupionych przeciwciał.

Wykazano, że poziom mRNA dla antyapoptotycznego białka Bcl-2 był obniżony zarówno w komórkach traktowanych samymi związkami jak i w tych traktowanych związkami i promieniowaniem. Poziom białka Bcl-2, oceniony metodą Western Blot, wzrasta w niewielkim stopniu w komórkach traktowanych piceatannolem lub piceidem oraz piceidem w kombinacji z IR. W pozostałych układach jego poziom jest zbliżony do wartości kontrolnych (komórki nie traktowane żadnym z badanych czynników). Z kolei poziom mRNA dla proapoptotycznego białka Bax, był znacząco podwyższony w przypadku komórek traktowanych resweratrolem lub piceatannolem, a także w przypadku komórek traktowanych badanymi związkami w kombinacji z promieniowaniem jonizującym.

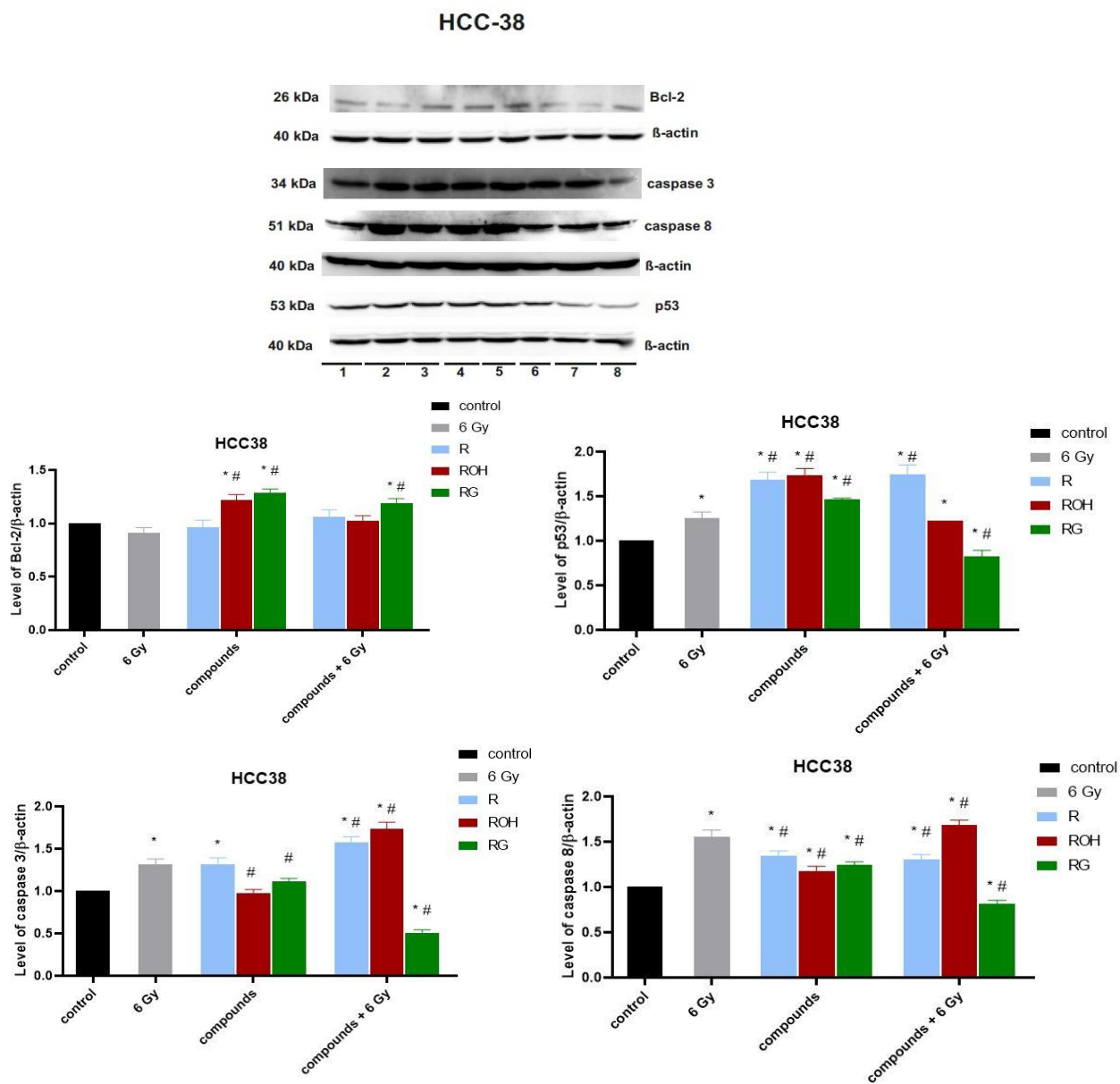
W dalszych badaniach oceniono poziom ekspresji kaspazy 3 i kaspazy 8 zarówno na poziomie białka jak i na poziomie mRNA. Zaobserwowano istotny wzrost ekspresji mRNA kaspazy 3 i kaspazy 8 w komórkach poddanych działaniu promieniowania, a także w komórkach traktowanych samym resweratrolem bądź piceatannolem lub w połączeniu z IR. Poziomy mRNA w znaczącej większości skorelowane są z poziomami białek ocenionymi metodą Western Blot. Wyjątek stanowią komórki traktowane piceidem w połączeniu z IR, gdzie poziom mRNA dla kaspazy 3 jest zbliżony do poziomu obserwowanego w kontroli, podczas gdy poziom białka jest o około połowę niższy niż w kontroli. W pracy oceniono także poziom białka p53, które kontroluje wiele procesów komórkowych, w tym uczestniczy w indukcji apoptozy. Najwyższy jego wzrost obserwowano w komórkach traktowanych resweratrolem lub piceatannolem oraz w komórkach traktowanych resweratrolem w kombinacji z promieniowaniem jonizującym. Prezentowane rezultaty są zgodne z badaniami wielu autorów, którzy potwierdzają, że resweratrol i piceatannol mogą indukować proces apoptozy zależny od białka p53 w różnych komórkach nowotworowych (Farrand i in., 2013; Hsieh i in., 2011; Huang i in., 1999; Komorowska i in., 2022; She i in., 2001).



**Rys. 13.** Wynik analizy aktywności genów apoptotycznych (Bcl-2, kaspazy 3, kaspazy 8, p53) oznaczony metodą RT-PCR po traktowaniu komórek linii HCC38 związkami stilbenowymi (resweratrol, piceatanol, piceid) oraz po zastosowaniu promieniowania i kombinacji promieniowania z badanymi związkami. Zastosowana dawka promieniowania 6Gy. Istotności statystyczne w porównaniu do kontroli przedstawiono w postaci \* $p < 0,05$ . Istotności statystyczne w porównaniu do zastosowanej dawki promieniowania przedstawiono w postaci # $p < 0,05$ . Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń.

Podsumowując tę część badań można stwierdzić, że w komórkach traktowanych resweratrolem, piceatannolem również w kombinacji z promieniowaniem jonizującym indukcja apoptozy zachodzi na drodze szlaku zewnętrznego (aktywacja kaspazy 8), oraz szlaku wewnętrznego, w którym pośredniczą mitochondria (aktywacja kaspazy 3, aktywacja

ekspresji *Bax*) (Ola i in., 2011). Najskuteczniej proces programowanej śmierci komórki aktywowany był przez resweratrol i piceatannol w kombinacji z promieniowaniem jonizującym.



**Rys. 14.** Wynik analizy poziomu białek apoptotycznych oznaczony metodą Western Blot po traktowaniu komórek linii HCC38 związkami stilbenowymi (resweratrol, piceatannol, piceid) oraz po zastosowaniu promieniowania i kombinacji promieniowania z badanymi związkami. Zastosowana dawka promieniowania 6 Gy. Istotności statystyczne w porównaniu do kontroli przedstawiono w postaci \* $p < 0,05$ . Istotności statystyczne w porównaniu do zastosowanej dawki promieniowania przedstawiono w postaci # $p < 0,05$ . Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń.



Podczas radioterapii w wyniku radiolizy wody w komórce generowane są reaktywne formy tlenu takie jak: rodniki hydroksylowe ( $\cdot\text{OH}$ ), anionorodniki nadadtlenkowy ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) i nadtlenek wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Ponadto promieniowanie jonizujące może stymulować także endogenną produkcję RFT w mitochondriach (Kim i in., 2015; Leach i in., 2001). Zwykle jednak komórki nowotworowe charakteryzują się zwiększoną aktywnością enzymów antyoksydacyjnych, którą nabywają w procesie adaptacji na zwiększony stres oksydacyjny (Jiang i in., 2018). Dlatego w dalszej części pracy metodą Western Blot zbadano jak związki stilbenowe stosowane same, bądź w kombinacji z promieniowaniem jonizującym wpływają na poziom enzymów antyoksydacyjnych, takich jak: katalaza, dysmutazy nadadtlenkowe i peroksydazy glutationowe. Ponadto oceniono także całkowitą ich aktywność enzymatyczną.

Pierwszym badanym w pracy enzymem była katalaza. O tym, jak istotna jest jej rola w komórkach poddawanych działaniu promieniowania jonizującego świadczą wyniki uzyskane przez Zhao i wsp. Autorzy w badaniach na komórkach wywodzących się z różnych linii nowotworowych (linie komórkowe HepG2, HeLa, A549) wykazali, że aktywność katalazy, a nie jak sądzono poziom zredukowanego glutationu, odgrywa kluczową rolę w oporności komórek na działanie RFT (Zhao i in., 2019). W prezentowanej pracy, we wszystkich testowanych układach, tj. komórkach poddanych działaniu promieniowania jonizującego, komórkach traktowanych samymi związkami oraz komórkach traktowanych związkami, a następnie naświetlanych, zaobserwowano wzrost poziomu katalazy. Najwyższy poziom enzymów w porównaniu do kontroli obserwowano w komórkach traktowanych resweratolem (ok. 7-krotny wzrost) lub piceatannolem (ok. 8-krotny wzrost) w połączeniu z IR, natomiast najniższy wzrost zaobserwowano w komórkach traktowanych piceidem, a następnie poddawanych działaniu promieniowania jonizującego (ok. 2-krotny wzrost). Podobną tendencję zmian odnotowano w przypadku aktywności enzymatycznej katalazy. Uzyskane rezultaty dotyczące resweratrolu są zgodne z badaniami innych autorów (Khan i in., 2013). Skuteczne usuwanie nadadtlenku wodoru w komórkach nowotworowych poddanych działaniu IR chroni je przed indukcją procesów apoptotycznych, gdyż  $\text{H}_2\text{O}_2$  jest nie tylko „reaktywną formą tlenu” inicjującą oksydacyjne uszkodzenia, ale jest także bezpośrednim i silnym induktorem procesu apoptozy (Giorgio i in., 2007; Kowaltowski i in., 2001).

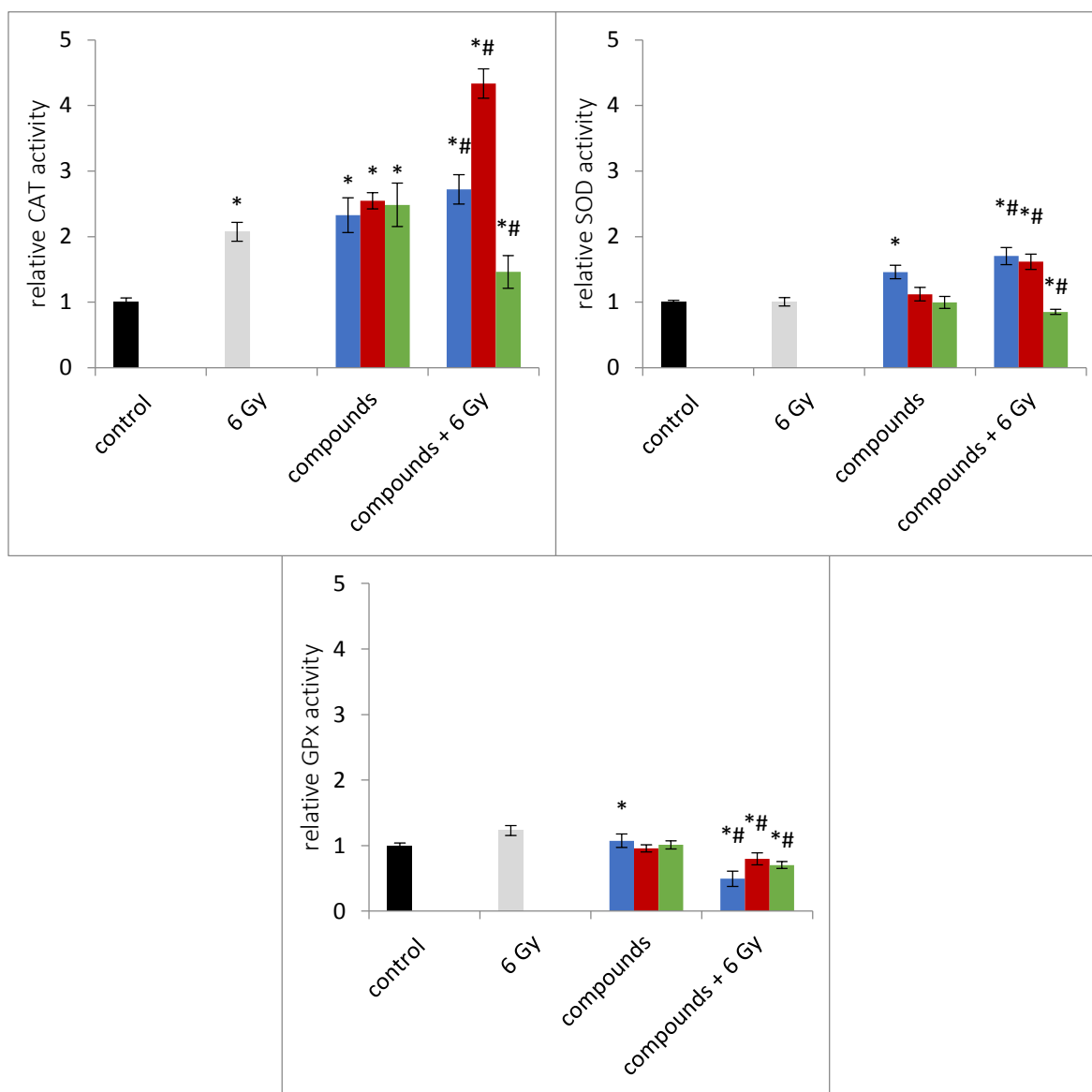
Kolejnymi enzymami, których poziom sprawdzono metodą Western Blot były dysmutazy nadadtlenkowe: cytoplazmatyczna (SOD1) i mitochondrialna (SOD2). Poziom SOD1 spada (HCC38+R/ROH, HCC38+RG+IR) bądź pozostaje na poziomie kontroli (HCC38+IR, HCC38+RG, HCC38+R+IR) w większości badanych układów. Znaczący wzrost obserwowano jedynie w komórkach traktowanych piceatannolem w połączeniu z promieniowaniem jonizującym. Dysmutaza nadadtlenkowa występująca w cytoplazmie jest główną izoformą odpowiedzialną za utrzymanie niskiego poziomu anionorodnika nadadtlenkowego w komórce (Xu i in., 2022), dlatego brak istotnego wzrostu poziomu tego enzymu w napromieniowanych komórkach nowotworowych jest bardzo korzystny z punktu widzenia uwrażliwienia komórek na radioterapię.

W przypadku SOD2, wzrost poziomu izoenzymu odnotowano w komórkach traktowanych resweratrolem lub piceatannolem, również w kombinacji z promieniowaniem jonizującym. Ponadto działanie resweratrolu było znacznie silniejsze niż działanie piceatannolu. Porównując poziom omawianego izoenzymu w komórkach poddanych działaniu samych pochodnych, z poziomem odnotowanym w komórkach traktowanych związkami łącznie z promieniowaniem jonizującym można wnioskować, że samo promieniowanie nie indukuje wzrostu ekspresji SOD2. Podobne działanie resweratrolu tzn. indukowanie zarówno wzrostu ekspresji jak i aktywności SOD2, obserwowano w innych komórkach nowotworowych takich jak: PC-3, HepG2 i MCF-7 (Khan i in., 2013).

Rola mitochondrialnej dysmutazy nadadtlenkowej w komórkach jest znacznie większa niż tylko usuwanie anionorodnika nadadtlenkowego. Wykazano, że geny *SOD2* posiadają działanie supresorowe. Ich aktywacja przyczynia się m.in. do zmniejszenia zdolności przerzutowania komórek nowotworowych, wydłużenia czasu podziału komórkowego oraz hamowania powstawania guza (Janicka i in., 2013). Dane literaturowe wskazują także, że indukcja ekspresji SOD2 prowadzi do silnego hamowania proliferacji różnych typów komórek, w tym komórek glejaka, raka trzustki i piersi (Weydert i in., 2006). W innych badaniach porównano poziom ekspresji SOD2 w komórkach nowotworowych piersi linii MDA-MB-435 i UACC-893 oraz w nienowotworowych komórkach nabłonka gruczołu piersiowego MCF-10A (Hecht i in., 2016). W przypadku tych pierwszych wykazano 2–3 krotnie niższą ekspresję w porównaniu do komórek linii nienowotworowych. Niższa aktywność SOD2 może skutkować nadmiernym uszkodzeniem mitochondrialnego DNA na skutek ekspozycji na zwiększonym poziomie RFT, co w konsekwencji prowadzi do progresji i przerzutów raka piersi (Hecht i in., 2016; Weydert i in., 2006).

W pracy oznaczono także całkowitą aktywność enzymatyczną dysmutaz ponadtlenukowych. Zwiększoną aktywność zaobserwowano w komórkach traktowanych samym resweratolem oraz w komórkach preinkubowanych z resweratolem lub piceatannolem w połączeniu z promieniowaniem jonizującym. Najmniejsza aktywność obserwowana była w komórkach traktowanych piceidem w połączeniu z IR.

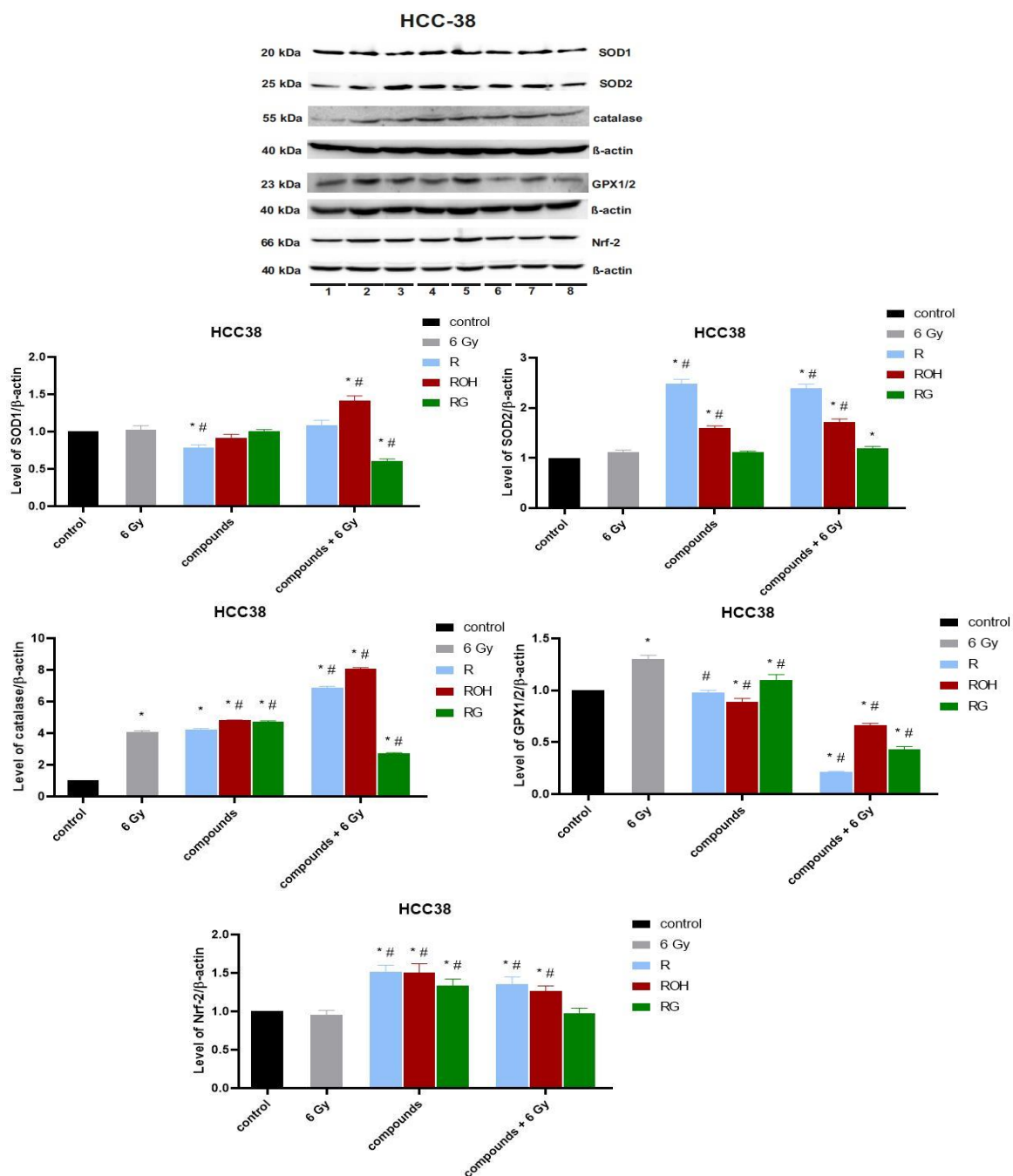
Ostatnim enzymem oznaczanym w pracy była peroksydaza glutationowa. Sprawdzone poziomy ekspresji izoenzymów 1/2. Ponadto oceniono całkowitą aktywność enzymatyczną w lizatach komórkowych. Uzyskane wyniki wskazują, że samo napromieniowanie komórek HCC38 skutkowało zarówno zwiększoną ekspresją GPX1/2 jak i zwiększoną aktywnością enzymu. Przeciwny efekt obserwowano w komórkach preinkubowanych ze związkami, a następnie napromieniowanych. W tych układach obserwowano znaczny spadek poziomu enzymów oraz spadek ich aktywności, a największą skuteczność w tym procesie wykazywał resweratrol. Spadek poziomu GPX1/2 podczas radioterapii może skutkować pożądanym wzrostem akumulacji RFT. Vibet i współpracownicy sugerują, że hamowanie aktywności GPx1 może być głównym mechanizmem uczulenia guza na antracykliny. W rzeczywistości regresja guza po chemioterapii koreluje z niską aktywnością GPx1 (Vibet i in., 2008), a wzrostem poziomu GPX1 prowadzi do radiooporności komórek macierzystych glejaka (Yang i in., 2015).



**Rys. 15.** Analiza wpływu resweratrolu (R), piceatannolu (ROH), piceidu (RG), promieniowania jonizującego i ich kombinacji na aktywność katalazy (CAT) dysmutazy (SOD) oraz peroksydazy (GPx) komórek HCC38. Aktywność enzymów mierzono po inkubacji komórek przez 24 godzin. Komórki traktowano pochodnymi stilbenu w stężeniach 50  $\mu\text{M}$ . Istotności statystyczne w porównaniu do kontroli przedstawiono w postaci  $*p < 0,05$ . Istotności statystyczne w porównaniu do zastosowanej dawki promieniowania przedstawiono w postaci  $\#p < 0,05$ .

Oprócz enzymów antyoksydacyjnych w tej części pracy sprawdzono także poziom białka Nrf2, które jest kluczowym czynnikiem aktywującym mechanizm

antyoksydacyjnej odpowiedzi obronnej komórki. W odpowiedzi na stres oksydacyjny około 200 genów cytoprotekcyjnych jest regulowanych przez to białko (Pouremamali i in., 2022). Badania innych autorów dowiodły, że zablokowanie aktywności Nrf2 czyni komórki nowotworowe podatnymi na apoptozę i zwiększa skuteczność radioterapii/chemioterapii (Matsuoka i in., 2022; McDonald i in., 2010; Pouremamali i in., 2022). W prezentowanych badaniach zaobserwowano, że promieniowanie jonizujące nie wpływało na poziom ekspresji Nrf2, podczas gdy same pochodne stilbenu zwiększyły ekspresję średnio około 1,5 razy w komórkach HCC38. Zastosowanie resweratrolu lub piceatannolu w połączeniu z promieniowaniem jonizującym również skutkowało wzrostem czynnika NRF2 jednak w nieco mniejszym stopniu w porównaniu do działania samych związków.

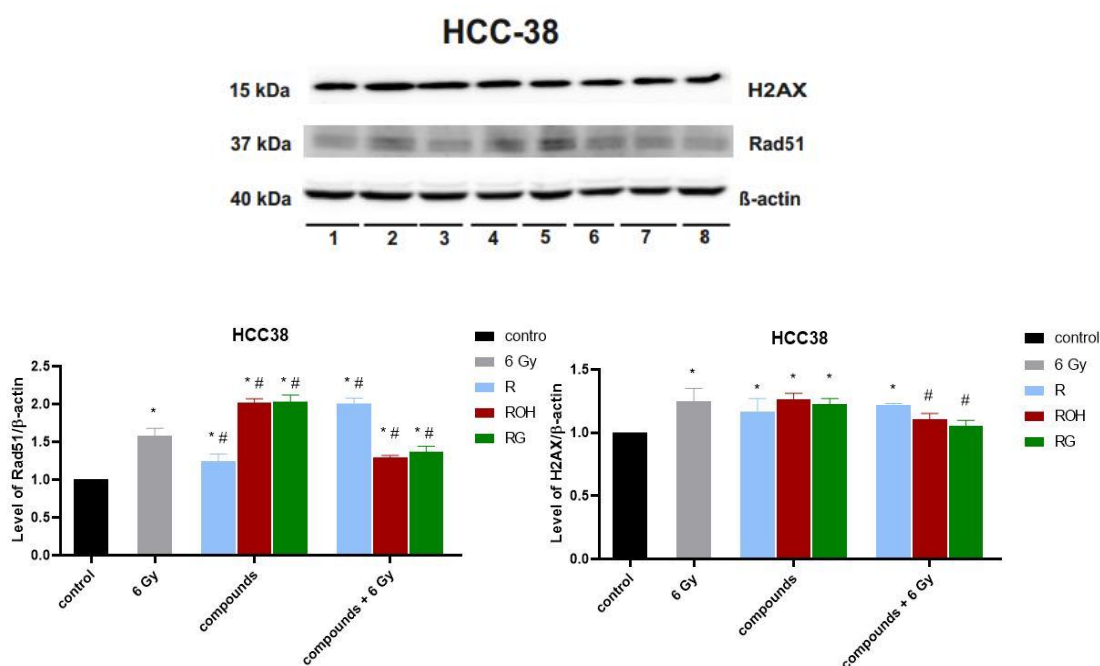


**Rys.16.** Wynik analizy poziomu enzymów antyoksydacyjnych (SOD1, SOD2, Gpx1/2, katalazy) oraz poziomu białka Nrf2 oznaczony metodą Western Blot po traktowaniu komórek linii HCC38 związkami stilbenowymi (resweratrol, piceatanol, piceid) oraz po zastosowaniu promieniowania i kombinacji promieniowania z badanymi związkami. Zastosowana dawka promieniowania 6 Gy. Istotności statystyczne w porównaniu do kontroli przedstawiono w postaci \* $p < 0,05$ . Istotności statystyczne w porównaniu do zastosowanej dawki promieniowania przedstawiono w postaci # $p < 0,05$ . Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń.

Ostatnim etapem pracy było sprawdzenie poziomu ekspresji dwóch białek: Rad51 oraz histonu H2AX związanych z indukcją napraw uszkodzonego DNA. RAD51 jest rekombinazą, która pośredniczy w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA przez rekombinację homologiczną (HR) (Liao i in., 2022). Wykazano, że w lekoopornych komórkach nowotworowych podwyższony poziom HR, koreluje ze wzrostem ekspresji Rad51 (Leon- Galicia i in., 2018; Liao i in., 2022; Z. Wang i in., 2001). Ponadto obniżenie ekspresji rekombinazy przez niektóre leki przeciwnowotworowe przywraca radiowrażliwość i chemiowrażliwość komórek nowotworowych, co powiązано z upośledzeniem naprawy HR (Choudhury i in., 2009; Leon- Galicia i in., 2018; Liao i in., 2022; Tsai i in., 2010).

W niniejszych badaniach, we wszystkich stosowanych kombinacjach wykazano wzrost poziomów Rad51. W komórkach HCC38 traktowanych samym resweratrolom wzrost poziomu białka był stosunkowo niewielki i wynosił około 20%. Znacząco zwiększając się o ok. 80%, gdy komórki dodatkowo traktowano promieniowaniem. Odwrotne tendencje zaobserwowano w komórkach traktowanych piceatannolem i piceidem, tj. same związki istotnie zwiększały ekspresję białka, podczas gdy w połączeniu z promieniowaniem poziom Rad51 znacząco spadał. W literaturze tematu nie ma wystarczająco dużo danych dotyczących działania pochodnych stilbenowych w dyskutowanych procesach. Jedyne wyniki, do których możemy się odnieść, dotyczą działania resweratrolu stosowanego w połączeniu z cisplatyną (Leon- Galicia i in., 2018) oraz oksyresweratrolu (Radapong i in., 2021). W przypadku resweratrolu zastosowanego w stężeniu 100  $\mu$ M, również w połączeniu z cisplatyną, zaobserwowano spadek poziomu Rad51 w komórkach MCF7 (Leon- Galicia i in., 2018). Podobnie w badaniach, w których stosowano oksyresweratrol, odnotowano istotny spadek poziomu Rad51 także w komórkach MCF-7.

Drugim białkiem odpowiedzialnym za naprawy uszkodzeń DNA badanym w pracy był histon H2AX. Katsuta i in. dowiedli, że poziom ekspresji H2AX jest równie dobrym parametrem świadczącym o indukcji procesu naprawy DNA, agresywności nowotworu, oceny rokowania chorych na nowotwory piersi, jak najczęściej prezentowany w badaniach poziom fosforylacji histonu ( $\gamma$ -H2AX) (Katsuta i in., 2022). Wysoka ekspresja H2AX jest związana z krótszym przeżyciem pacjentów onkologicznych (Y. Liu i in., 2022). W niniejszej pracy we wszystkich badanych układach obserwowano wzrost ekspresji H2AX. Charakter obserwowanych zmian był podobny jak w przypadku białka Rad51, ale poziom ekspresji H2AX był znacznie niższy.



**Rys. 17.** Wynik analizy poziomu białek związanych z naprawą i uszkodzeniami DNA (Rad51, H2AX) oznaczony metodą Western Blot po traktowaniu komórek linii HCC38 związkami stilbenowymi (resweratrol, piceatanol, piceid) oraz po zastosowaniu promieniowania i kombinacji promieniowania z badanymi związkami. Zastosowana dawka promieniowania 6 Gy. Istotności statystyczne w porównaniu do kontroli przedstawiono w postaci \* $p < 0,05$ . Istotności statystyczne w porównaniu do zastosowanej dawki promieniowania przedstawiono w postaci # $p < 0,05$ . Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń.



## 9. PODSUMOWANIE

Wykorzystanie związków roślinnych do zwiększania wrażliwości komórek nowotworowych na promieniowanie jonizujące jest jednym z kierunków badań mających na celu zwiększenie skuteczności radioterapii. Wiele danych literaturowych potwierdza, że jednym z takich związków naturalnych jest resweratrol. Szczegółową analizę danych literaturowych na ten temat zawarto w pracy przeglądowej wchodzącej w skład niniejszej pracy doktorskiej (Komorowska i in., 2022). Głównym problemem związanym z zastosowaniem resweratrolu jako czynnika radioczułającego jest jego niska biodostępność i szybki metabolizm. Dlatego podejmuje się badania innych związków strukturalnie podobnych do resweratrolu, które charakteryzują się większą biodostępnością i lepszymi parametrami farmakokinetycznymi.

W pracy porównano radioczułe właściwości resweratrolu i jego dwóch pochodnych: piceatannolu i piceidu. Wybór monohydroksylowanej i glikozylowanej pochodnej resweratrolu podyktowany był większą ich biodostępnością w porównaniu z resweratrolem (Ávila-Gálvez i in., 2021; González-Sarrías i in., 2010). Ponadto wynikał z braku danych literaturowych dotyczących ich zastosowania, w kombinacji z promieniowaniem jonizującym, na komórki nowotworowe.

Część eksperymentalną wykonano na komórkach wywodzących się z dwóch linii wyprowadzonych z nowotworów piersi. Wybrane komórki, MCF-7 oraz HCC38, różnią się obecnością receptorów hormonalnych: estrogenowego (ER) i progesteronowego (PR) oraz występowaniem receptora HER2 na powierzchni komórki. Komórki MCF-7 posiadają oba receptory hormonalne natomiast nie posiadają receptora HER2. Z kolei komórki HCC38 nie posiadają żadnego z wyżej wymienionych receptorów, dlatego są potrójnie negatywne. Wybór linii komórkowych dokonano po analizie danych statystycznych, z których wynika, że najczęstszym typem występującym u chorych jest rak hormonozależny HER2-ujemny (ok. 70% zdiagnozowanych przypadków), a najbardziej agresywny i trudniejszy w leczeniu jest potrójnie negatywny rak piersi (około 10-20% przypadków).

W pierwszej części pracy przeprowadzono wstępne oznaczenia, które pozwoliły wybrać stężenia badanych związków do dalszych badań. W tym celu zastosowano test MTT. Na podstawie uzyskanych wyników ustalono, że badane związki wykazują skuteczniejsze

działanie cytotoksyczne na komórki MCF7-7 niż na komórki HCC38. W związku z tym do większości badań dotyczących komórek linii MCF-7 stosowano resweratrol i jego analogi w stężeniu 25  $\mu\text{M}$ , natomiast w badaniach z komórkami HCC38 użyto stężenie dwukrotnie wyższe tj. 50  $\mu\text{M}$ . Dodatkowo wykazano, że dla obu linii najbardziej cytotoksyczny jest resweratrol, następnie piceatannol, a najmniej piceid.

W pracy przeprowadzono również oznaczenie cytotoksycznego działania wybranych związków w kombinacji z promieniowaniem jonizującym z zastosowaniem testu MTT. Jednak jak opisano we wcześniejszej dyskusji, metody z użyciem barwnika tetrazolowego nie powinno się stosować do badań, w których wykorzystuje się promieniowanie jonizujące (Rai i in., 2018). W związku z tym aby wiarygodnie ocenić efekty działania pochodnych stilbenu w kombinacji z promieniowaniem jonizującym metodą cytometryczną, przy zastosowaniu barwienia jodkiem propidyny (PI) i aneksyną V sprzężoną z izotiocyjanianem fluoresceiny oszacowano odsetek komórek żywych, apoptotycznych oraz nekrotycznych. W przypadku obu badanych linii komórkowych najwyższy poziom apoptozy obserwowano w układzie gdzie, komórki preinkubowano z resweratrolem, a następnie poddawano napromieniowaniu. W komórkach HCC38 równie wysoki poziom apoptozy odnotowano w analogicznym układzie zawierającym piceatannol. Zastosowanie w pracy techniki RT-PCR oraz immunodetekcji białek metodą Western blot pozwoliło wnioskować, że apoptoza w obu rodzajach komórek (MCF-7 i HCC38) indukowana jest zarówno z udziałem szlaku wewnętrznego jak i zewnętrznego. Istnieją jednak różnice w molekularnym mechanizmie przebiegu procesu. W komórkach HCC38 indukcja apoptozy zachodzi z udziałem białka p53, a w procesie uczestniczy kaspaza 3 i 8. Dodatkowo o aktywacji szlaku wewnętrznego świadczy wzrost stosunku poziomów ekspresji genów proapoptotycznego białka Bax, do antyapoptotycznego białka Bcl-2 (Bax/Bcl-2). Proces apoptozy w komórkach MCF-7 zachodzi bez udziału białka p53 oraz pod nieobecność w komórkach kaspazy 3 (Essmann i in., 2004). Aktywowany jest receptorowy (zewnętrzny) szlak apoptotyczny (wzrost poziomu kaspazy 8). Obserwowano również wzrost stosunku poziomów ekspresji genów Bax/Bcl-2. Jednak wskazanie dokładniejszej ścieżki na której zachodzi apoptoza w komórkach MCF-7 wymaga dalszej, dokładnej analizy. Głębszą dyskusję na ten temat zawarto w pracy oryginalnej wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.

Mechanizm działania radioterapii polega na wytwarzaniu nadmiernych ilości reaktywnych form tlenu, które uszkadzając komórki nowotworowe przyczyniają się do ich eliminacji. Jednak komórki nowotworowe mogą posiadać lub nabyć, w procesie adaptacji

na stres oksydacyjny, zwiększoną odporność na działanie RFT m.in. na skutek wzmożonej ekspresji enzymów antyoksydacyjnych. Stąd w pracy sprawdzono poziom ekspresji podstawowych enzymów antyoksydacyjnych oraz oceniono ich aktywność enzymatyczną w komórkach HCC38 oraz MCF-7 poddanych działaniu promieniowania jonizującego, wybranych pochodnych stilbenu oraz obu czynników zastosowanych równocześnie.

Przeprowadzone badania wykazały, że stosowane w pracy komórki, istotnie różnią się odpowiedzią antyoksydacyjną na działanie stosowanych czynników. Poziom ekspresji katalazy w obu rodzajach komórek wzrasta we wszystkich badanych układach za wyjątkiem komórek MCF-7, które preinkubowano z piceidem, a następnie napromieniowywano. Jednak poziom enzymu w HCC38 jest dużo wyższy niż w MCF-7. Dodatkowo obserwowano odwrotną tendencję w komórkach MCF-7 traktowanych pochodnymi stilbenu w kombinacji z IR, poziom katalazy spada w porównaniu do komórek poddanych działaniu samego promieniowania podczas gdy w komórkach HCC38 preinkubowanych z resweratrolom lub piceatannolem, a następnie naświetlanych poziom katalazy znacząco rośnie. Można zatem wnioskować, że w komórkach MCF-7 pochodne stilbenowe poprzez obniżenie ekspresji katalazy zwiększają skuteczność działania promieniowania jonizującego.

Nie we wszystkich badanych układach aktywność enzymatyczna katalazy koreluje z jej poziomem oszacowanym metodą Western Blot. Jednak zastosowana metoda pomiaru aktywności jest mało specyficzna i na uzyskany wynik mogły także mieć wpływ inne enzymy np. GPx.

Istotne różnice między komórkami można wskazać także w ekspresji dysmutazy ponadtlenkowej: SOD1 i SOD2. Poziom SOD1 w komórkach MCF-7 wzrasta we wszystkich badanych układach, podczas gdy poziom SOD2 w większości układów pozostaje niezmienny. Wzrasta jedynie o ok. 20% w komórkach traktowanych jednocześnie piceidem i promieniowaniem jonizującym. Odwrotnie w komórkach HCC38, poziom SOD1 w większości układów jest niższy bądź zbliżony do wartości kontrolnych. Wzrasta o ok. 30% tylko w komórkach traktowanych piceatannolem w kombinacji z promieniowaniem jonizującym. Inaczej niż w MCF-7, wzrost ekspresji SOD2 w komórkach HCC38 stymuluje zarówno resweratrol jak i piceatannol.

Całkowita aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w lizatach uzyskanych z komórek MCF-7 preinkubowanych z polifenolami, a następnie napromieniowanych jest znacząco

niższa, szczególnie w przypadku resweratrolu, w porównaniu do komórek traktowanych samym promieniowaniem. Oznacza to że badane związki obniżają skuteczność usuwania anionorodników ponadtlenkowych generowanych radiacyjnie. Inaczej w komórkach HCC38, w tym przypadku resweratrol i piceatannol zwiększają skuteczność usuwania  $O_2^{\cdot-}$ .

Ostatnim enzymem, badanym w pracy były peroksydazy glutationowe (GPx). W pracy oznaczono całkowitą aktywność peroksydazową w komórkach oraz sumarycznie, metodą Western Blot, oszacowano poziom izoenzymów GPx1/2. W komórkach HCC38 wszystkie wybrane związki zastosowane razem z promieniowaniem jonizującym znacząco obniżały ekspresję GPx1/2. Wiązało się to również ze spadkiem aktywności enzymatycznej w tych komórkach. Nie wykazano natomiast obecności izoenzymów GPx1 i GPx2 w komórkach MCF-7, a zmierzona aktywność peroksydazowa w tych komórkach prawdopodobnie wynikała z aktywności pozostałych izoenzymów. Szczególnie wysoką aktywność obserwowano w komórkach traktowanych piceatannolem, a następnie naświetlanych.

Antyoksydacyjną odpowiedź komórek nowotworowych na działanie pochodnych stilbenu w połączeniu z promieniowaniem jonizującym oceniono także na podstawie zmian poziomu ekspresji czynnika transkrypcyjnego Nrf2, który jest kluczowy w aktywacji m.in. wielu enzymów antyoksydacyjnych (Pouremamali i in., 2022). Wykazano iż w komórkach MCF-7 jego poziom nie zmienia się w żadnym z badanych układów, natomiast w komórkach HCC38 jego wzrost stymulują stosowane w pracy polifenole. Uzyskane rezultaty pozwalają stwierdzić, że resweratrol i jego pochodne skuteczniej aktywują antyoksydacyjną odpowiedź w komórkach HCC38 niż w komórkach MCF-7.

Ostatnim zagadnieniem analizowanym w pracy była ocena skuteczności naprawy DNA w komórkach obu linii poddanych napromieniowaniu w obecności i pod nieobecność polifenoli. W tym celu sprawdzono poziom białka Rad51 i histonu H2AX, których wzrost, zgodnie z danymi literaturowymi, świadczy o aktywacji procesów naprawy uszkodzonego DNA (Katsuta i in., 2022; Liao i in., 2022).

W komórkach HCC38 wykazano istotny statystycznie wzrost poziom ekspresji obu białek w większości badanych układów. Przeciwnie, w komórkach MCF-7 w większości przypadków poziom zarówno Rad51 jak i H2AX jest porównywalny do wartości kontrolnych bądź niższy. Można zatem wnioskować, że naprawy radiacyjnie uszkodzonego DNA zachodzą skuteczniej w komórkach HCC38 niż w MCF-7.

Uzyskane w pracy rezultaty pozwalają stwierdzić, że komórki linii MCF-7 są bardziej wrażliwe na radiacyjne uszkodzenia indukowane pochodnymi stilbenu, w szczególności resweratolem, w porównaniu do komórek linii HCC38. Na podstawie danych literaturowych można tłumaczyć to silniejszym biologicznym działaniem resweratrolu poprzez wiązanie się z receptorami estrogenowymi występującymi na komórkach MCF-7, w porównaniu do komórek HCC38, które pozbawione są tychże receptorów (Hu i in., 2020).

W pracy doktorskiej wykazano, że największy radiouczulający potencjał w odniesieniu do komórek obu linii posiada resweratrol. Nieco niższą skuteczność wykazuje piceatannol, natomiast najmniejszą aktywnością biologiczną charakteryzuje się piceid.

Spośród badanych pochodnych stilbenowych resweratrol charakteryzuje się najsłabszą biodostępnością w organizmie człowieka, jednak wykazuje najsilniejsze radiouczulające działanie na komórki raka piersi. W związku z tym należy kontynuować badania, min. z wykorzystaniem nanotechnologii, które pozwoliłyby dostarczać resweratrol w większych stężeniach do komórek.

## 10. WNIOSKI

1. Spośród badanych pochodnych stilbenowych w połączeniu z promieniowaniem jonizującym najskuteczniej działa resweratrol, nieco mniejszą aktywność biologiczną wykazuje piceatannol, natomiast najmniejszą skutecznością charakteryzuje się piceid.
2. Resweratrol i piceatannol aktywują proces apoptozy zarówno z udziałem szlaku wewnętrznego jak i zewnętrznego.
3. Aktywacja apoptozy w komórkach MCF-7 jest niezależna od białka p53.
4. Większa wrażliwość komórek MCF-7 w porównaniu do komórek HCC38 na działanie promieniowania jonizującego w obecności resweratrolu związana jest ze słabszą antyoksydacyjną odpowiedzią komórek oraz obniżoną intensywnością naprawy uszkodzonego DNA.
5. Naprawy radiacyjnie uszkodzonego DNA zachodzą skuteczniej w komórkach HCC38 niż w MCF-7

## 11.LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

- Adams, G. E. (1973). Chemical radiosensitization of hypoxic cells. *British Medical Bulletin*, 29(1), 48–53. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a070956>
- Aebi, H. (1984). Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 105(C), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Ahmad, A. (2019). Breast Cancer Statistics: Recent Trends. W A. Ahmad (Red.), *Advances in Experimental Medicine and Biology* (T. 1152). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5647-6>
- Ávila-Gálvez, M. Á., González-Sarriás, A., Martínez-Díaz, F., Abellán, B., Martínez-Torrano, A. J., Fernández-López, A. J., Giménez-Bastida, J. A., & Espín, J. C. (2021). Disposition of Dietary Polyphenols in Breast Cancer Patients' Tumors, and Their Associated Anticancer Activity: The Particular Case of Curcumin. *Molecular Nutrition and Food Research*, 65(12), 1–13. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202100163>
- Baek, S. H., Ko, J. H., Lee, H., Jung, J., Kong, M., Lee, J. W., Lee, J., Chinnathambi, A., Zayed, M., Alharbi, S. A., Lee, S. G., Shim, B. S., Sethi, G., Kim, S. H., Yang, W. M., Um, J. Y., & Ahn, K. S. (2016). Resveratrol inhibits STAT3 signaling pathway through the induction of SOCS-1: Role in apoptosis induction and radiosensitization in head and neck tumor cells. *Phytomedicine*, 23(5), 566–577. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.02.011>
- Banik, K., Ranaware, A. M., Harsha, C., Nitesh, T., Girisa, S., Deshpande, V., Fan, L., Nalawade, S. P., Sethi, G., & Kunnumakkara, A. B. (2020). Piceatannol: A natural stilbene for the prevention and treatment of cancer. *Pharmacological Research*, 153(December 2019), 104635. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104635>
- Bargieł, A. (2020). *Opieka farmaceutyczna nad pacjentkami z rakiem piersi*.
- Braunstein, S., Badura, M. L., Xi, Q., Formenti, S. C., & Schneider, R. J. (2009). Regulation of Protein Synthesis by Ionizing Radiation. *Molecular and Cellular Biology*, 29(21), 5645–5656. <https://doi.org/10.1128/mcb.00711-09>
- Buttgereit, F., & Brandt, M. D. (1995). A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. W *Biochem. J* (T. 312, Numer 1, s. 163–167). <https://doi.org/10.1042/bj3120163>
- Calvaruso, M., Pucci, G., Musso, R., Bravatà, V., Cammarata, F. P., Russo, G., Forte, G. I., & Minafra, L. (2019). Nutraceutical compounds as sensitizers for cancer treatment in radiation therapy. W *International Journal of Molecular Sciences* (T. 20, Numer 21). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20215267>
- Camont, L., Cottart, C. H., Rhayem, Y., Nivet-Antoine, V., Djelidi, R., Collin, F., Beaudoux, J. L., & Bonnefont-Rousselot, D. (2009). Simple spectrophotometric assessment of the

- trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. *Analytica Chimica Acta*, 634(1), 121–128. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2008.12.003>
- Chen, Z., Farag, M. A., Zhong, Z., Zhang, C., Yang, Y., Wang, S., & Wang, Y. (2021). Multifaceted role of phyto-derived polyphenols in nanodrug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 176, 113870. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2021.113870>
- Choudhury, A., Zhao, H., Jalali, F., Al Rashid, S., Ran, J., Supiot, S., Kiltie, A. E., & Bristow, R. G. (2009). Targeting homologous recombination using imatinib results in enhanced tumor cell chemosensitivity and radiosensitivity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(1), 203–213. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0959>
- Ciechanowska, K., Krajewska, K., & Antczak-Komoterska, A. (2018). Nowotwór piersi - problemy i jakość życia kobiet po mastektomii. *Innowacje w Pielęgniarstwie*, 3(4), 91–99. <https://doi.org/10.21784/iwp.2018.024>
- da Costa Araldi, I. C., Bordin, F. P. R., Cadoná, F. C., Barbisan, F., Azzolin, V. F., Teixeira, C. F., Baumhardt, T., da Cruz, I. B. M., Duarte, M. M. M. F., & Bauermann, L. de F. (2018). The in vitro radiosensitizer potential of resveratrol on MCF-7 breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, 282(December 2017), 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.01.013>
- Essmann, F., Engels, I. H., Totzke, G., Schulze-Osthoff, K., & Jänicke, R. U. (2004). Apoptosis resistance of MCF-7 breast carcinoma cells to ionizing radiation is independent of p53 and cell cycle control but caused by the lack of caspase-3 and a caffeine-inhibitable event. *Cancer Research*, 64(19), 7065–7072. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1082>
- Fang, Y., Herrick, E. J., & Nicholl, M. B. (2012). A possible role for perforin and granzyme B in resveratrol-enhanced radiosensitivity of prostate cancer. *Journal of Andrology*, 33(4), 752–760. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.015164>
- Farrand, L., Byun, S., Kim, J. Y., Im-Aram, A., Lee, J., Lim, S., Lee, K. W., Suh, J. Y., Lee, H. J., & Tsang, B. K. (2013). Piceatannol enhances cisplatin sensitivity in ovarian cancer via modulation of p53, X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), and mitochondrial fission. *Journal of Biological Chemistry*, 288(33), 23740–23750. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.487686>
- Fowler, J. F., Adams, G. E., & Denekamp, J. (1976). Radiosensitizers of hypoxic cells in solid tumours. *Cancer Treatment Reviews*, 3(4), 227–256. [https://doi.org/10.1016/S0305-7372\(76\)80012-6](https://doi.org/10.1016/S0305-7372(76)80012-6)
- Gerszon, J., Rodacka, A., & Puchała, M. (2014). Antioxidant properties of resveratrol and its protective effects in neurodegenerative diseases. *Advances in Cell Biology*, 2014, 97–117. <https://doi.org/10.2478/acb-2014-0006>
- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., & Pelicci, P. G. (2007). Hydrogen peroxide: A metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 722–728. <https://doi.org/10.1038/nrm2240>



- Gong, L., Zhang, Y., Liu, C., Zhang, M., & Han, S. (2021). Application of radiosensitizers in cancer radiotherapy. W *International Journal of Nanomedicine* (T. 16, s. 1083–1102). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S290438>
- González-Sarrías, A., Giménez-Bastida, J. A., García-Conesa, M. T., Gómez-Sánchez, M. B., García-Talavera, N. V., Gil-Izquierdo, A., Sánchez-Álvarez, C., Fontana-Compiano, L. O., Morga-Egea, J. P., Pastor-Quirante, F. A., Martínez-Díaz, F., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2010). Occurrence of urolithins, gut microbiota ellagic acid metabolites and proliferation markers expression response in the human prostate gland upon consumption of walnuts and pomegranate juice. *Molecular Nutrition and Food Research*, *54*(3), 311–322. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900152>
- Hecht, F., Pessoa, C. F., Gentile, L. B., Rosenthal, D., Carvalho, D. P., & Fortunato, R. S. (2016). The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *Tumor Biology*, *37*(4), 4281–4291. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4873-9>
- Hsieh, T. C., Wong, C., John Bennett, D., & Wu, J. M. (2011). Regulation of p53 and cell proliferation by resveratrol and its derivatives in breast cancer cells: An in silico and biochemical approach targeting integrin  $\alpha\beta 3$ . *International Journal of Cancer*, *129*(11), 2732–2743. <https://doi.org/10.1002/ijc.25930>
- Hu, W., Dai, D. K., Zheng, B. Z., Duan, R., Dong, T. T., Qin, Q., & Tsim, K. W. (2020). Piceatannol, a Natural Analog of Resveratrol, Exerts Anti-angiogenic Efficiencies by Blockage of Vascular Endothelial Growth Factor Binding to Its Receptor. *Molecular Nutrition and Food Research*, *25*(3769), 1–19.
- Huang, C., Ma, W. Y., Goranson, A., & Dong, Z. (1999). Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway. *Carcinogenesis*, *20*(2), 237–242. <https://doi.org/10.1093/carcin/20.2.237>
- Hurko, Ž., Owłasiuk, A., & Malesińska, M. (2020). Opieka nad pacjentką z rakiem piersi. *Holistyczny wymiar współczesnej medycyny*, *6*, 286–308. <https://ppm.umb.edu.pl>
- Janicka, A., Szymańska-Pasternak, J., & Bober, J. (2013). [Polymorphisms in the oxidative stress-related genes and cancer risk]. *Annales Academiae Medicae Stetinensis*, *59*(2), 18–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25026746>
- Jiang, H., Wang, H., & De Ridder, M. (2018). Targeting antioxidant enzymes as a radiosensitizing strategy. *Cancer Letters*, *438*(June), 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.09.004>
- Kabakov, A. E., & Yakimova, A. O. (2021). Hypoxia-induced cancer cell responses driving radioresistance of hypoxic tumors: Approaches to targeting and radiosensitizing. *Cancers*, *13*(5), 1–52. <https://doi.org/10.3390/cancers13051102>
- Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-Szatan, K., Miotła, P., & Starosławska, E. (2015). Breast cancer risk factors. W *Przegląd Menopauzalny* (T. 14, Numer 3, s. 196–202). Termedia Publishing House Ltd. <https://doi.org/10.5114/pm.2015.54346>
- Katsuta, E., Dessai, A. S., Ebos, J. M. L., Yan, L., Ouchi, T., & Takabe, K. (2022). H2AX mRNA expression reflects DNA repair, cell proliferation, metastasis, and worse survival in breast cancer. *Am J Cancer Res*, *12*(2), 793–804.

- Khan, A., Chen, H., Wan, X., Tania, M., Xu, A., & Chen, F. (2013). Regulatory Effects of Resveratrol on Antioxidant Enzymes: a Mechanism of Growth Inhibition and Apoptosis Induction in Cancer Cells. *Molecules and cells*, 219–225. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-2259-z>
- Kim, W., Youn, H., Kang, C., & Youn, B. (2015). Inflammation-induced radioresistance is mediated by ROS-dependent inactivation of protein phosphatase 1 in non-small cell lung cancer cells. *Apoptosis*, 20(9), 1242–1252. <https://doi.org/10.1007/s10495-015-1141-1>
- Komorowska, D., Gajewska, A., Hikiş, P., Bartosz, G., & Rodacka, A. (2021). Comparison of the effects of resveratrol and its derivatives on the radiation response of MCF-7 breast cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17). <https://doi.org/10.3390/ijms22179511>
- Komorowska, D., Radzik, T., Kalenik, S., & Rodacka, A. (2022). Natural Radiosensitizers in Radiotherapy: Cancer Treatment by Combining Ionizing Radiation with Resveratrol. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18). <https://doi.org/10.3390/ijms231810627>
- Kowaltowski, A. J., Castilho, R. F., & Vercesi, A. E. (2001). Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Letters*, 495(1–2), 12–15. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02316-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02316-X)
- Kulak, M. V., Cyr, A. R., Woodfield, G. W., Bogachek, M., Spanheimer, P. M., Li, T., Price, D. H., Domann, F. E., & Weigel, R. J. (2013). Transcriptional regulation of the GPX1 gene by TFAP2C and aberrant CpG methylation in human breast cancer. *Oncogene*, 32(34), 4043–4051. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.400>
- Leach, J; Tuyle, P; Schmidt-Ullrich, R; Mikkelsen, R. (2001). Ionizing radiation- induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen / nitrogen. *Cancer Research*, 61(10), 11358802.
- Leon-Galicia, I., Diaz-Chavez, J., Albino-Sanchez, M. E., Garcia-Villa, E., Bermudez-Cruz, R., Garcia-Mena, J., Herrera, L. A., GARCÍA-CARRANCA, A., & Gariglio, P. (2018). Resveratrol decreases Rad51 expression and sensitizes cisplatin-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Oncology Reports*, 39(6), 3025–3033. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6336>
- Liao, C., Talluri, S., Zhao, J., Mu, S., Kumar, S., Shi, J., Buon, L., Munshi, N. C., & Shamma, M. A. (2022). RAD51 Is Implicated in DNA Damage, Chemoresistance and Immune Dysregulation in Solid Tumors. *Cancers*, 14(22). <https://doi.org/10.3390/cancers14225697>
- Liu, Y., Li, H., Wilson, C. N., Bai, H. J., Boufraqueh, M., & Weyemi, U. (2022). Histone H2AX promotes metastatic progression by preserving glycolysis via hexokinase-2. *Scientific Reports*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07675-6>
- Liu, Y. P., Zheng, C. C., Huang, Y. N., He, M. L., Xu, W. W., & Li, B. (2021). Molecular mechanisms of chemo- and radiotherapy resistance and the potential implications for cancer treatment. *MedComm*, 2(3), 315–340. <https://doi.org/10.1002/mco2.55>

- Lonati, L., Barbieri, S., Guardamagna, I., Ottolenghi, A., & Baiocco, G. (2021). Radiation-induced cell cycle perturbations: a computational tool validated with flow-cytometry data. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79934-3>
- Lü, X., De La Peña, L., Barker, C., Camphausen, K., & Tofilon, P. J. (2006). Radiation-induced changes in gene expression involve recruitment of existing messenger RNAs to and away from polysomes. *Cancer Research*, *66*(2), 1052–1061. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3459>
- Matsuoka, Y., Yoshida, R., Kawahara, K., Sakata, J., Arita, H., Nkashima, H., Takahashi, N., Hirayama, M., Nagata, M., Hirosue, A., Kuwahara, Y., Fukumoto, M., Toya, R., Murakami, R., & Nakayama, H. (2022). The antioxidative stress regulator Nrf2 potentiates radioresistance of oral squamous cell carcinoma accompanied with metabolic modulation. *Laboratory Investigation*, *102*(8), 896–907. <https://doi.org/10.1038/s41374-022-00776-w>
- McDonald, T; Kim, K; Norris, A; Vlashi, E; Phillips, T; Lagadec, C; Donna, L; Ratikan, J; Szelag, H; Hlatky, L; and McBride, W. (2010). Ionizing radiation activates the Nrf2 antioxidant response. *Cancer Research*, *70*(21), 8886–8895. <https://doi.org/10.1088/1751-8113/44/8/085201>
- Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, *247*(10), 3170–3175. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)45228-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)45228-9)
- Ola, M. S., Nawaz, M., & Ahsan, H. (2011). Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *351*(1–2), 41–58. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0709-x>
- Olivares-Urbano, M. A., Griñán-Lisón, C., Marchal, J. A., & Núñez, M. I. (2020). CSC Radioresistance: A Therapeutic Challenge to Improve Radiotherapy Effectiveness in Cancer. *Cells*, *9*(7). <https://doi.org/10.3390/cells9071651>
- Pouremamali, F., Pouremamali, A., Dadashpour, M., Soozangar, N., & Jeddi, F. (2022). An update of Nrf2 activators and inhibitors in cancer prevention/promotion. *Cell Communication and Signaling*, *20*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00906-3>
- Radapong, S., Chan, K., Sarker, S. D., & Ritchie, K. J. (2021). Oxyresveratrol Modulates Genes Associated with Apoptosis, Cell Cycle Control and DNA Repair in MCF-7 Cells. *Frontiers in Pharmacology*, *12*(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.694562>
- Rai, Y., Pathak, R., Kumari, N., Sah, D. K., Pandey, S., Kalra, N., Soni, R., Dwarakanath, B. S., & Bhatt, A. N. (2018). Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19930-w>
- Ren, B., Kwah, M. X. Y., Liu, C., Ma, Z., Shanmugam, M. K., Ding, L., Xiang, X., Ho, P. C. L., Wang, L., Ong, P. S., & Goh, B. C. (2021). Resveratrol for cancer therapy: Challenges and future perspectives. *Cancer Letters*, *515*, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.05.001>

- Rhayem, Y., Théron, P., Camont, L., Couturier, M., Beaudoux, J. L., Legrand, A., Jore, D., Gardés-Albert, M., & Bonnefont-Rousselot, D. (2008). Chain-breaking activity of resveratrol and piceatannol in a linoleate micellar model. *Chemistry and Physics of Lipids*, 155(1), 48–56. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMPHYSLIP.2008.06.001>
- RICE-EVANS, C. A; DIPLOCK, A. T; SYMONS, M. C. R. et al. (1991). Techniques in free radical research. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, 22, 1–278.
- Shah, S. C., Kayamba, V., Peek, R. M., & Heimbürger, D. (2019). Cancer control in low- And middle-income countries: Is it time to consider screening? *Journal of Global Oncology*, 2019(5). <https://doi.org/10.1200/JGO.18.00200>
- She, Q. B., Bode, A. M., Ma, W. Y., Chen, N. Y., & Dong, Z. (2001). Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Research*, 61(4), 1604–1610.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(1), 5–29. <https://doi.org/10.3322/caac.21254>
- Sinha, T. (2018). Tumors: Benign and Malignant. *Cancer therapy & Oncology International Journal*, 10(3). <https://doi.org/10.19080/ctoj.2018.10.555790>
- Strumiłło, J., Gerszon, J., & Rodacka, A. (2015). Charakterystyka związków fenolowych pochodzenia naturalnego ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w prewencji chorób neurodegeneracyjnych. *Bory Tucholskie i inne obszary leśne : ochrona i monitoring, Duthey 2013*, 231–245.
- Su, D., Cheng, Y., Liu, M., Liu, D., Cui, H., Zhang, B., Zhou, S., Yang, T., & Mei, Q. (2013). Comparison of Piceid and Resveratrol in Antioxidation and Antiproliferation Activities In Vitro. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054505>
- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P. P., & Zhu, H. P. (2017). Risk factors and preventions of breast cancer. *W International Journal of Biological Sciences* (T. 13, Numer 11, s. 1387–1397). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>
- Takaoka, M. (1940). Of the Phenolic Substances of White Hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). *Journal of the Faculty of Science*, 3, 1–16. <https://scirp.org/reference/referencespapers.aspx?referenceid=1883528>
- Tan, Y., Wei, X., Zhang, W., Wang, X., Wang, K., Du, B., & Xiao, J. (2017). Resveratrol enhances the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells by downregulating E2F1. *Oncology Reports*, 37(3), 1833–1841. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5413>
- Tang, K. S. (2020). Protective Effects of Polydatin Against Dementia-Related Disorders. *Current Neuropharmacology*, 19(2), 127–135. <https://doi.org/10.2174/1570159x18666200611144825>
- Tao, Z. Q., Shi, A., Lu, C., Song, T., Zhang, Z., & Zhao, J. (2015). Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 72(2), 333–338. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0459-6>

- Tsai, M. S., Kuo, Y. H., Chiu, Y. F., Su, Y. C., & Lin, Y. W. (2010). Down-regulation of Rad51 expression overcomes drug resistance to gemcitabine in human non-small-cell lung cancer cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *335*(3), 830–840. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.173146>
- Ullah, M. F. (2019). Breast Cancer: Current Perspectives on the Disease Status. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 51–64. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6>
- Vesely, O., Baldovska, S., & Kolesarova, A. (2021). Enhancing bioavailability of nutraceutically used resveratrol and other stilbenoids. *Nutrients*, *13*(9), 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu13093095>
- Vibet, S., Goupille, C., Bougnoux, P., Steghens, J. P., Goré, J., & Mahéo, K. (2008). Sensitization by docosahexaenoic acid (DHA) of breast cancer cells to anthracyclines through loss of glutathione peroxidase (GPx1) response. *Free Radical Biology and Medicine*, *44*(7), 1483–1491. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.009>
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *321*(3), 288–300. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>
- Wang, X., Ma, S., Meng, N., Yao, N., Zhang, K., Li, Q., Zhang, Y., Xing, Q., Han, K., Song, J., Yang, B., & Guan, F. (2016). Resveratrol exerts dosage-dependent effects on the self-renewal and neural differentiation of hUC-MSCs. *Molecules and Cells*, *39*(5), 418–425. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2345>
- Wang, Z., Chen, Z., Xu, Z., Bello, V., Mohr, G., Aloyz, R., & Panasci, L. C. (2001). In Vitro Evidence for Homologous Recombinational Repair in Resistance to Melphalan. *Reports*, *93*(19), 1473–1478.
- Weydert, C. J., Waugh, T. A., Ritchie, J. M., Iyer, K. S., Smith, J. L., Li, L., Spitz, D. R., & Oberley, L. W. (2006). Overexpression of manganese or copper-zinc superoxide dismutase inhibits breast cancer growth. *Free Radical Biology and Medicine*, *41*(2), 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.03.015>
- Xiong, W., Yin, A., Mao, X., Zhang, W., Huang, H., & Zhang, X. (2016). Resveratrol suppresses human glioblastoma cell migration and invasion via activation of RhoA/Rock signaling pathway. *Oncology Letters*, *11*(1), 484–490. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3888>
- Xu, J., Su, X., Burley, S. K., & Zheng, X. F. S. (2022). Nuclear SOD1 in Growth Control, Oxidative Stress Response, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Cancer. *Antioxidants*, *11*(2). <https://doi.org/10.3390/antiox11020427>
- Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., Dedhar, S., Derynck, R., Ford, H. L., Fuxe, J., García de Herreros, A., Goodall, G. J., Hadjantonakis, A. K., Huang, R. J. Y., Kalcheim, C., ... Sheng, G. (2020). Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(6), 341–352. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9>

- Yang, W., Shen, Y., Wei, J., & Liu, F. (2015). MicroRNA-153/Nrf-2/GPx1 pathway regulates radiosensitivity and stemness of glioma stem cells via reactive oxygen species. *Oncotarget*, 6(26), 22006–22027. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4292>
- Zhao, M. X., Wen, J. L., Wang, L., Wang, X. P., & Chen, T. S. (2019). Intracellular catalase activity instead of glutathione level dominates the resistance of cells to reactive oxygen species. *Cell Stress and Chaperones*, 24(3), 609–619. <https://doi.org/10.1007/s12192-019-00993-1>

## **12. PRACE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**



Review

# Natural Radiosensitizers in Radiotherapy: Cancer Treatment by Combining Ionizing Radiation with Resveratrol

Dominika Komorowska <sup>1</sup>, Tomasz Radzik <sup>2</sup>, Sebastian Kalenik <sup>1</sup> and Aleksandra Rodacka <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Molecular Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 141/143 Pomorska St., 90-236 Lodz, Poland

<sup>2</sup> MARINEX International, 4 Placowa St., 93-446 Lodz, Poland

\* Correspondence: [aleksandra.rodacka@biol.uni.lodz.pl](mailto:aleksandra.rodacka@biol.uni.lodz.pl); Fax: +48-426354473

**Abstract:** Conventional cancer treatment is mainly based on the surgical removal of the tumor followed by radiotherapy and/or chemotherapy. When surgical removal is not possible, radiotherapy and, less often, chemotherapy is the only way to treat patients. However, despite significant progress in understanding the molecular mechanisms of carcinogenesis and developments in modern radiotherapy techniques, radiotherapy (alone or in combination) does not always guarantee treatment success. One of the main causes is the radioresistance of cancer cells. Increasing the radiosensitivity of cancer cells improves the processes leading to their elimination during radiotherapy and prolonging the survival of cancer patients. In order to enhance the effect of radiotherapy in the treatment of radioresistant neoplasms, radiosensitizers are used. In clinical practice, synthetic radiosensitizers are commonly applied, but scientists have recently focused on using natural products (phytocompounds) as adjuvants in radiotherapy. In this review article, we only discuss naturally occurring radiosensitizers currently in clinical trials (paclitaxel, curcumin, genistein, and papaverine) and those whose radiation sensitizing effects, such as resveratrol, have been repeatedly confirmed by many independent studies.

**Keywords:** radiotherapy; radiosensitizer; ionizing radiation; free radicals; DNA damage; resveratrol; paclitaxel; curcumin; genistein; papaverine



**Citation:** Komorowska, D.; Radzik, T.; Kalenik, S.; Rodacka, A. Natural Radiosensitizers in Radiotherapy: Cancer Treatment by Combining Ionizing Radiation with Resveratrol. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10627. <https://doi.org/10.3390/ijms231810627>

Academic Editors: Yi-Jang Lee and Yu-Chan Chang

Received: 4 August 2022

Accepted: 9 September 2022

Published: 13 September 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The increase in life expectancy, development of industry, environmental pollution, and growing obesity rates contribute to increased incidences of cancer. In more developed countries, cancer incidence is higher than in less developed countries; however, due to less diagnosis and treatment, less developed countries lead in terms of mortality [1]. Conventional cancer treatment is mainly based on surgical removal of the tumor followed by radiotherapy (RT) and/or chemotherapy. When surgical removal of the tumor is not possible, radiotherapy, and less often chemotherapy, is the only way to treat patients. Although radiotherapy and chemotherapy have the same goals, there are key differences between the two types of therapy. The major difference is the way they are delivered. During chemotherapy, drugs are taken by mouth or injection and usually expose the whole body to cancer-fighting drugs, radiotherapy is usually a local treatment. This means that RT is usually targeted and only affects the part of the body that needs treatment. Radiotherapy is scheduled to damage cancer cells with as little damage as possible to nearby healthy cells. Chemotherapy and radiotherapy are sometimes used together to treat certain types of cancer. This treatment is called combination therapy and may be recommended if cancer cells cannot be surgically removed, are likely to spread to other areas of the body, or if the cancer is not responding to one particular type of treatment. However, despite significant progress in understanding the molecular mechanisms of carcinogenesis and the development of modern radiotherapy techniques, radiotherapy (alone or in combination)



does not always guarantee treatment success. One of the main causes is the radioresistance of cancer cells.

One of the processes responsible for the radioresistance of cancer cells is the effectiveness of DNA damage repair after exposure to radiation. According to the basic assumption of radiobiology, cells with a strong ability to activate DNA repair processes are more resistant to radiation compared to cells with a weaker repair capacity. The degree of radiation-induced DNA damage activates various signaling pathways that promote the apoptosis or survival of cancer cells. Studies have shown that the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, NF- $\kappa$ B pathway, Akt/cyclin D1/CDK4 survival signaling pathway, and autophagy are associated with radiological resistance in cancer [2].

Another process that influences the radioresistance of neoplastic cells is the activation of cell checkpoint pathways. Cells are often blocked in the G1/S or G2/M phase, which allows time for DNA repair. Following radiation exposure, cell cycle arrest mainly occurs in the G2/M phase, which may be followed by G1-phase arrest. It is known that cells in the S phase show generally greater radioresistance than cells in G1 and G2, and cells in M are very radiosensitive. Quiescent cells in a G0 state are also radioresistant [3]. One of the hallmarks of cancer cells is the activation of the epithelial-mesenchymal transition process (EMT) by which epithelial cells transform into mesenchymal cells and acquire migratory and invasive abilities. EMT is associated with enhancement resistance to radiotherapy and poor prognosis in multiple types of malignant tumors [4]. For many types of cancer, the main factor related to radioresistance is the presence of cancer stem cells (CSC) inside tumors, which are responsible for metastases, relapses, RT failure, and poor prognosis in cancer patients [5]. Changes in the tumor microenvironment may also influence the development of radioresistance cancer cells. Many studies have shown that hypoxic environments promote the transformation of tumor cell metabolism from oxidative metabolism to anaerobic glycolysis, which induces the development of radioresistance in tumor cells [6,7]. The role of hypoxia in enhancing radioresistance has been fully described by Kabakov and Yakimov [8]. The authors conclude that chronic or prolonged hypoxia is a complex process that includes alterations in gene expression, signaling pathways, epigenetic regulation, the work of chaperones, autophagy, secretory activity, and other stress-sensitive mechanisms of the involved cancer cells. Many of those alterations are cancer cell-adapting mechanisms that contribute to the enhanced radioresistance of hypoxic tumors [8].

As described above, the radioresistance of cancer cells is a complex process. Understanding these mechanisms is essential to identify novel therapeutic targets and signaling pathways whose inhibition/activation will increase radiosensitivity and improve cancer treatment. Some researchers believe that the sensitivity of the cancer cell itself is a major factor in determining the tumor's response to radiation [9].

In order to increase the effect of radiotherapy in treating radioresistant neoplasms, radiosensitizers are used. In clinical practice, synthetic radiosensitizers are commonly applied, but scientists have recently focused on using natural products (phytocompounds) as adjuvants in radiotherapy [10–15]. The mechanisms of the radiosensitizer's action are described in a separate chapter. The enormous potential of substances found in plants has been known for centuries [16,17]. It is estimated that 60–80% of antibiotics and cancer drugs derive directly from naturally occurring species [18,19]. Substances with potential medicinal use are still waiting to be discovered in hundreds of thousands of plants, fungi, and animals [20]. Owing to scientific research, some compounds of natural origin used in treatments may apply to new therapies [21]. One of many examples is papaverine, which until now has been used as a smooth muscle relaxant and is currently being investigated as a radiosensitizer in treating non-small cell lung cancer (NSCLC) or lung metastases [13]. Several compounds with plant origins are currently included in clinical trials as radiosensitizers (Table 1). In addition to the aforementioned papaverine, there is also curcumin, paclitaxel, and genistein. Resveratrol (RSV) is another compound that may improve the treatment of many cancer types by enhancing radiotherapy. Despite numerous *in vitro*

studies, as well as several *in vivo* studies confirming the radiosensitizing properties of resveratrol, there are still no clinical studies in this aspect.

**Table 1.** Registered Current Clinical Trials of small plant-derived molecules radiosensitizers (<https://Clinicaltrials.gov/>, accessed on 4 August 2022).

Identifier	Natural Compound	Tumor Type	No. of Patients	Phase of Clinical Trials	Drug Used in Combination with Radiotherapy
NCT03824327	Papaverine	Non-Small Cell Lung Cancer or Lung Metastases	24	Phase I	Papaverine
NCT05136846	Papaverine and Paclitaxel	Locally Advanced Non-Small Cell Lung Cancer	28	Phase I	Carboplatin + Paclitaxel + Durvalumab and Papaverine
NCT02459457	Paclitaxel	Local Advanced Esophageal Cancer	321	Phase III	Group 1: Paclitaxel + Cisplatin Group 2: Paclitaxel + Fluorouracil Group 3: Paclitaxel + Carboplatin
NCT01591135	Paclitaxel	Locally Advanced Esophageal Carcinoma	436	Phase III	Group 1: Paclitaxel + 5-fluorouracil Group 2: Cisplatin + 5-fluorouracil
NCT02280252	Paclitaxel	Breast Cancer	69	Phase II	Paclitaxel
NCT00238420	Paclitaxel	Bladder Cancer	70	Phase I/II	Paclitaxel + Trastuzumab
NCT00231868	Paclitaxel	Uterine Cancer	81	Phase II	Carboplatin + Paclitaxel
NCT00003591	Paclitaxel	Pancreatic Cancer	122	Phase II	Paclitaxel
NCT02724618	Curcumin	Prostate Cancer	64	Phase II	Nanocurcumin
NCT01917890	Curcumin	Prostate Cancer	40	Completed	Curcumin
NCT00745134	Curcumin	Rectal Cancer	45	Phase II	Capecitabine + Curcumin
NCT04294836	Curcumin	Cervical Cancer	240	Phase II	Cisplatin + Curcumin
NCT02075112	Genistein	Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck	24	Phase I	Soy isoflavone + Cisplatin
NCT00769990	Genistein	Bone Metastases	0	Phase I/II	Genistein

The purpose of this review is to present clinical trials using compounds of plant origin as a radiosensitizer. In addition, we review the literature on the radiosensitizing effects of resveratrol for many types of cancer cells. In addition, we reviewed data from clinical trials assessing the effects of resveratrol in the treatment of cancer and selected age-related diseases.

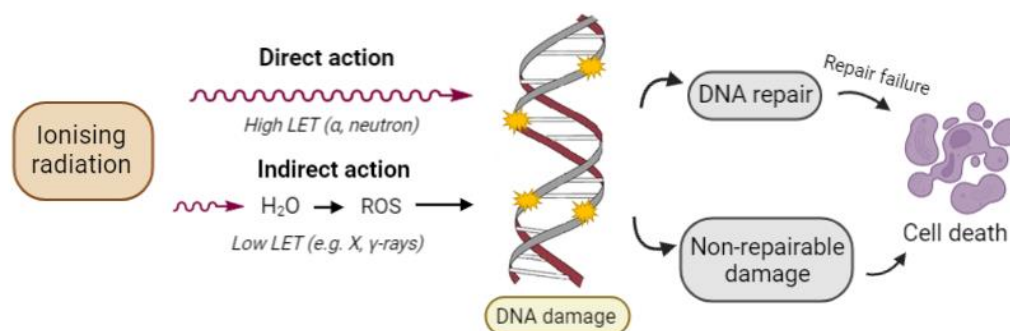
## 2. Radiotherapy

Cancer continues to be one of the greatest challenges for healthcare. According to a report prepared by the International Agency for Research on Cancer (IARC), the number of deaths is expected to exceed 13 million by 2030, and confirmed cases would oscillate around 22 million patients. In order to reduce the number of deaths due to cancer, various methods of treatment have been developed, including radiotherapy, chemotherapy, surgery, and immunotherapy [10]. Nevertheless, radiotherapy is still one of the most prevalent cancer treatment methods worldwide. Approximately 60% of patients receive curative radiotherapy in the USA, despite advances in other treatments in the 127 years since its invention [22]. This finding shows that RT has proved to be an invaluable method in oncological treatment.

RT is expected to eliminate a specific tumor and directly hit cancer cells with an emitted ionizing radiation (IR). The latter process damages the cell nucleus, leading to the death of cancer cells and thus eliminating the tumor. Compared to conventional pharmacological treatment, where administered cytostatics have a detrimental effect on healthy tissues throughout the body, modern/state-of-the-art radiotherapy focuses on directing a high-energy beam of photons to a specific location to kill cancer cells, leading to a reduced

tumor mass and thus minimizing the dose and toxicity to neighboring normal tissue [12]. It should also be emphasized that radiotherapy combined with surgery or chemotherapy significantly increases the effectiveness of oncological treatment.

Ionizing radiation may act directly or indirectly on cancer cell death mechanisms depending on where the IR energy is absorbed (Figure 1). When energy is deposited in a macromolecule associated with observable biological effects such as DNA and proteins, it is called a direct effect of radiation. It is the dominant process in the interaction of high linear energy transfer (LET) particles with biological materials. Alternatively, energy may be absorbed in an organism's water because water molecules are the predominant molecule in living organisms (about 80% of the mass of a living cell is water). Practically a major proportion of radiation energy is absorbed by cellular water. Several complex chemical transformations occur in water under the influence of ionizing radiation. This process is called water radiolysis. About two-thirds of the biological damage by low LET radiation or sparse IR such as X-rays or electrons is due to indirect action. Evidence indicates that the biological effects of radiotherapy mainly derive from damage to DNA, a critical target of ionizing radiation in the human body. Cancer cells whose DNA is irreparably damaged stop dividing or die. When damaged cells die, they are broken down and eliminated by the body's natural processes [23].



**Figure 1.** Direct and indirect action of ionizing radiation. In direct action—radiation directly interacts with DNA, causing DNA damage. In indirect action—radiation interacts with other molecules in cells, especially water molecules, producing reactive oxygen species (ROS), which induces DNA damage. DNA damage leads to cell death if not properly repaired.

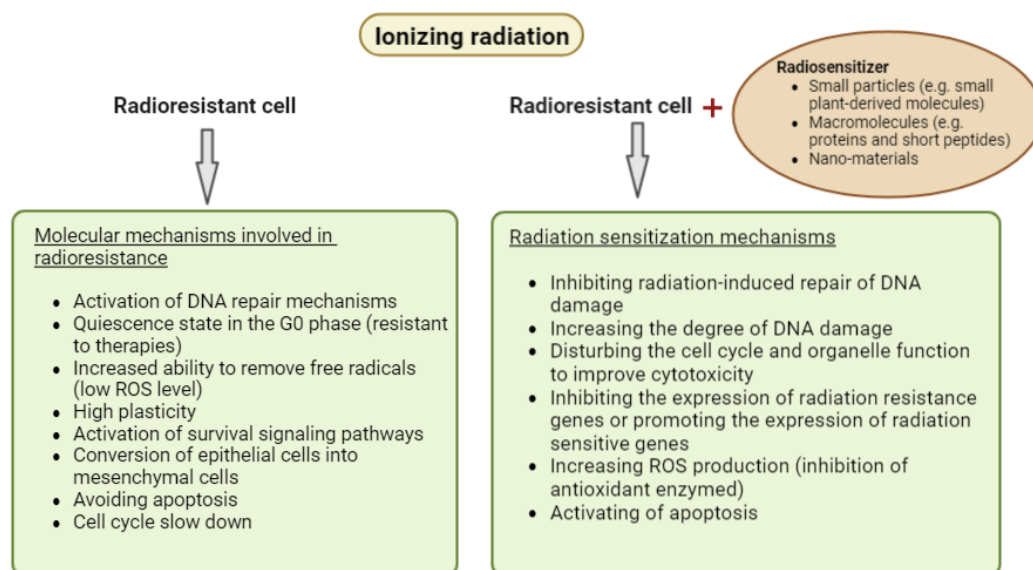
Unfortunately, despite innovative solutions in radiotherapy, which improve the therapeutic effect in patients, there are still complications that hinder oncological treatment, such as cancer stem cells (CSC), tumor heterogeneity, tumor recurrence, low cell radiosensitivity, or damage due to IR of healthy tissues [10]. Tumor heterogeneity influences the response variability of the tumor subpopulation to radiation, which reduces the effectiveness of the therapy. The main factor responsible for the radioresistance of neoplastic cells is neoplastic stem cells. RT resistance is associated with radiotherapy treatment failure, metastases, and relapses [5]. Today, treatment plans remain the same for each class of cancer. The molecular profile characteristic of each type of cancer is not considered, which would otherwise help increase the treatment's effectiveness [12].

Clinical studies show that approximately 70% of patients require radiotherapy in oncological therapy. Moreover, in some cases, only radiation therapy remains the only form of treatment. There is a great need for research and development of various methods to improve the radiation sensitivity used in radiotherapy. Currently, research is being conducted on radiation-sensitizing compounds that can increase the sensitivity of cancerous tissue to radiation while reducing toxicity for healthy tissues. This development could improve the effectiveness of radiotherapy and extend the life of cancer patients [10].

### 3. Radiosensitizers

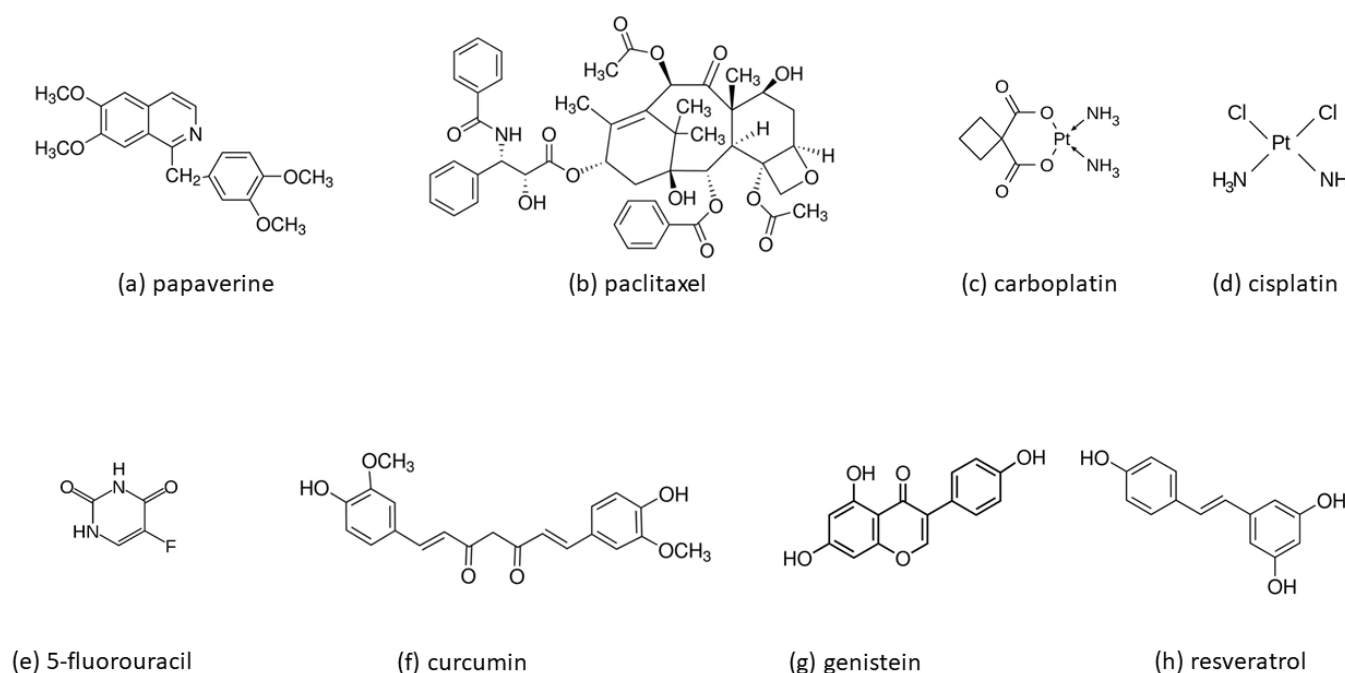
Radiosensitizers are chemical compounds designed to increase the sensitivity of tumors to ionizing radiation and promote tumor inactivation more than using only one

of the factors. The postulated mechanisms of action for radiosensitizers have changed along with the development of research and continuous technological innovations that allow the introduction of new materials and drugs to enhance the effects of radiotherapy [10,24,25]. The main mechanisms of action for these compounds are now assumed to be: (I) Inhibiting radiation-induced repair of DNA damage, increasing the degree of DNA damage; (II) disturbing the cell cycle and organelle function to improve cytotoxicity; and (III) inhibiting the expression of radiation resistance genes, or promoting the expression of radiation-sensitive genes (Figure 2) [10]. Recent research has divided radiosensitizers into three categories based on their structures: small particles (oxygen and oxygen mimetics, small plant-derived molecules, hypoxia-specific cytotoxins), macromolecules (proteins and short peptides, miRNAs, siRNAs, oligonucleotides), and nano-materials (metallic and nonmetallic nano-materials) [10]. The effective action of radiosensitizers has so far been well confirmed in animal models. Many studies have shown that the increase of radiosensitivity of cancer cells under the influence of, inter alia, plant compounds, and hypoxia inhibitors, improves the effectiveness of radiotherapy and prolongs the life span of animals [26–33]. Unfortunately, there are still no results of clinical trials that would allow the clinical use of some radiosensitizers.



**Figure 2.** Molecular mechanisms involved in cancer cells’ radioresistance and the mechanism of radiosensitizer action.

In recent years, more researchers have reported that small plant-derived molecules, often called “active compounds from Chinese herbs”, may enhance the sensitivity of cancer cells to radiotherapy [34]. In this review article, we only discuss some of the naturally occurring radiosensitizers currently in clinical trials (paclitaxel, curcumin, genistein, papaverine) (Table 1) and resveratrol, the sensitizing effect of which has been repeatedly confirmed in many independent studies. The molecular structures of all compounds discussed in this paper are shown in Figure 3.



**Figure 3.** Molecular structures of small plant-derived molecules radiosensitizers discussed in this review: (a) papaverine, (b) paclitaxel, (c) carboplatin, (d) cisplatin, (e) 5-fluorouracil, (f) curcumin, (g) genistein and (h) resveratrol.

**Papaverine** is an FDA-approved opium non-narcotic alkaloid used as a smooth muscle relaxant for treating vasospasm and erectile dysfunction. Its vascular activity is due to its role as a phosphodiesterase 10A inhibitor [35]. Benej et al. found that papaverine is a dual-activity drug that reversibly inhibits mitochondrial complex I [13]. In vivo, papaverine increases model tumor oxygenation at FDA-approved doses within 30 min. A single dose of the drug prior to radiotherapy alleviates hypoxia and significantly enhances the RT response. Most importantly, papaverine only requires a single dose 45 min prior to irradiation for radiosensitization. The drug is rapidly eliminated, so dosing can be repeated daily during hypofractionated radiotherapy [36]. Papaverine, as a radiosensitizer, combined with Stereotactic Body Radiotherapy (SBRT), is being evaluated in a Phase I clinical trial (NCT03824327) for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) or lung metastases. Another clinical study (NCT05136846) in which papaverine in combination with radiotherapy, chemotherapy, and immunotherapy is used in patients with unresectable locally advanced NSCLC was started in late 2021. In both cases, these are new studies, hence the lack of results.

**Paclitaxel** is an organic chemical compound belonging to the group of taxanes. For the first time, it was isolated from the bark of short-leaved yew (*Taxus brevifolia*). Paclitaxel is a cancer medicine used in chemotherapy. For treatment, it was introduced in 1992 as a preparation called Taxol [37]. Paclitaxel leads to the inhibition of cell division. It can bind to proteins involved in the formation of microtubules, favoring their formation, and then stabilizes them so that the breakdown of microtubules is inhibited. The action blocks the mitosis process in the G2/M phase and stops the proliferation of cancer cells, sensitizing them to the effects of ionizing radiation [38]. Paclitaxel and its modifications, e.g., nab-paclitaxel (albumin-bound paclitaxel), are widely used clinically for the treatment of many types of cancer. Many clinical trials concern the use of these compounds with other chemotherapeutic agents (e.g., carboplatin, cisplatin, gemcitabine), radiotherapy, immunotherapy (e.g., trastuzumab, pertuzumab), or a combination of several therapies as reported on ClinicalTrials.gov. Currently, about 200 clinical trials are registered in which paclitaxel is used in combination with radiotherapy (in many cases additionally with immunotherapy and with other drugs used in chemotherapy). In this review, we only



cite a few examples of studies where paclitaxel was used only with radiotherapy (e.g., NCT02280252), with radiotherapy and immunotherapy (NCT00238420), as well as with radiotherapy and other chemotherapeutic agents (e.g., NCT01591135).

One of the clinical trials in which paclitaxel is used concomitantly with radiotherapy includes patients with locally advanced breast cancer (NCT02280252), as well as patients with stage II and III breast cancer (NCT00006256). These studies are currently in Phase II and the results have not been published so far.

Other clinical studies on paclitaxel have included a three-arm randomized Phase III trial (NCT02459457) conducted on a group of people with inoperable advanced esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), in which the effects of three paclitaxel combinations were compared: paclitaxel—cisplatin, paclitaxel—carboplatin and paclitaxel—5-fluorouracil with radiotherapy and a study of paclitaxel with 5-fluorouracil in locally treating advanced esophageal cancer (NCT01591135) in Phase III. In the first of these studies (NCT02459457), none of the combinations of paclitaxel, i.e., with fluorouracil, cisplatin, or carboplatin, showed a significantly better overall survival in ESCC patients. In addition, studies have shown higher rates of hematological and gastrointestinal toxicity in the cisplatin group compared to the fluorouracil or carboplatin group [39]. The second clinical trial (NCT01591135) assessed the efficacy and safety of the paclitaxel plus fluorouracil regimen compared to the cisplatin plus fluorouracil regimen in combination with radiotherapy. The results obtained indicate that the paclitaxel plus fluorouracil regimen did not significantly extend the overall survival compared to the standard cisplatin plus fluorouracil regimen [40]. Other clinical trials with paclitaxel and carboplatin in combination with radiotherapy were performed in patients with serous papillary uterine carcinoma (an aggressive variant of endometrial cancer) (NCT00231868). Research has shown that radiotherapy “sandwiched” between paclitaxel/carboplatin chemotherapy is highly effective in women with completely resected papillary uterine cancer [41]. The research is currently in Phase II, as reported on ClinicalTrials.gov.

Paclitaxel in combination with radiotherapy and the monoclonal antibody (trastuzumab) has also been used in patients who underwent surgery for bladder cancer (NCT00238420). Clinical trials will evaluate whether administering paclitaxel together with radiation therapy and trastuzumab can kill more cancer cells. The studies are in phase I/II.

Radiotherapy and paclitaxel were also used in treating patients with nonmetastatic, unresectable pancreatic cancer (NCT00003591) [42]. The obtained data form the basis of new clinical trials that investigate paclitaxel and radiation in combination with a second radiosensitizer, gemcitabine (e.g., NCT02481635).

**Curcumin** is a natural polyphenolic compound that derives from the turmeric rhizome, also known as turmeric, which belongs to the ginger family. Initially, this plant was cultivated in Asia. Due to its wide range of biological activity, anti-inflammatory, and antioxidant properties, curcumin has been used as a natural medicine in traditional Chinese medicine for centuries. It can inhibit the transcription factor NF $\kappa$ B, which plays an important role in tumor formation and the resistance of tumor cells to IR [43]. Chendil et al. showed that the survival of PC-3 prostate adenoma cells treated simultaneously with ionizing radiation and curcumin decreased threefold, and the mechanism was related to NF $\kappa$ B [44]. Sandur et al. also demonstrated similar curcumin effects and radiation on HT29 and HCT116 human colon cancer cells. In addition to increased cell sensitivity to radiation due to the inhibition of the NF $\kappa$ B factor, NF $\kappa$ B-dependent antipoptotic (IAP2, Bcl-2, Bcl-XL), proliferative (cyclin D1), inflammatory (COX-2), and angiogenic (VEGF) genes target the expression of NF $\kappa$ B target genes [45]. Qian et al. examined the U87 human glioma cell line and proved that cell viability reduces due to curcumin and radiation. The cell cycle is stopped in the G2/M phase, causing this reduction. Moreover, the regulators of tumor progression: JNK and ERK map kinases, are inhibited [46]. In their studies on the normal MCF10A breast epithelial line and the MCF7 and MDA-MB-231, Minafra et al. treated breast tumor lines by combining radiation and curcumin. Their results showed that

curcumin protects against IR in normal cells and reduces the survival rate of cancer cells that affect stimulation autophagy [47].

Many studies confirming the radiosensitizing properties of curcumin contributed to the fact that its activity has been assessed in clinical trials, including prostate cancer treatment [48]. Prostate cancer is the second most common cancer among the male population worldwide. Radiotherapy along with surgery is the basic method of treating patients with this type of cancer. Unfortunately, prostate cancer cells are only modestly responsive or even unresponsive to the cytotoxic effects of radiotherapy. The effect of curcumin as a potential radiosensitizer has been tested in patients with prostate cancer in clinical trials NCT01917890. It was shown that curcumin intake significantly increased total antioxidant capacity, with a reduction in SOD activity. Prostate-specific antigen (PSA) level was lowered in both the groups (curcumin or placebo group), but there was no significant difference in treatment outcomes between the groups [49].

A factor that has still limited the clinical value of curcumin is its low bioavailability. However, modern strategies have been developed that aim to increase the bioavailability of curcumin (e.g., nanocurcumin, liposomal form) [48]. The effect of nanocurcumin as a potential radiosensitizer has also been tested in patients with prostate cancer (NCT02724618). This was the first clinical experience of the use of nanocurcumin in prostate cancer patients. Saadipoor et al. showed that this randomized, controlled study did not demonstrate the efficacy of nanocurcumin for concurrent therapy in prostate cancer patients undergoing radiotherapy [50].

Curcumin has also been used in clinical trials before surgery in treating patients with rectal cancer (NCT00745134). The purpose of these tests is to find out whether giving chemotherapy (capecitabine) with radiation before surgery can shrink the tumor and reduce the amount of normal tissue that needs to be removed. The study will also evaluate whether chemotherapy and radiation therapy are more effective with or without curcumin when given before surgery in patients with rectal cancer. The research is in phase II. The estimated date of completion of the study is March 2023.

Another clinical trial (NCT04294836) with curcumin is treating patients with advanced cervical cancer. In studies, curcumin is administered orally and chemotherapy (cisplatin) plus simultaneous radiotherapy (teletherapy + high- or low-frequency brachytherapy) is used. This research is currently in phase II. The estimated date of completion of the study is December 2023.

**Genistein** is a natural compound from the group of isoflavones, first isolated from the gorse. Genistein has anti-angiogenic and anti-tumor effects. In an in vitro study, Shi combined genistein treatment with irradiation of cervical cancer cells (Hela). His studies showed increased cell sensitivity to radiation by lowering survivin, which inhibited caspase 9, leading to apoptosis blockade [51]. Liu et al. conducted research on MCF7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. The cells were treated with genistein and ionizing radiation. Scientists have shown an increase in DNA damage, cell cycle arrest (G2/M), and the enhancement of radiosensitivity through the apoptotic pathway [52]. The combined effects of ionizing radiation and genistein on A549 non-small cell lung cancer cells were investigated by Liu et al. Scientists have shown that combination therapy has led to an increase in the level of apoptosis and A549 cells' increased sensitivity to radiation [53]. Genistein has been used in clinical trials in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck patients to sensitize cancer cells and decrease side effects caused by radiotherapy and cisplatin (NCT02075112). Clinical research is in Phase I and there is no data on the results obtained. The effect of genistein as a potential radiosensitizer has also been tested in patients with bone metastases (NCT00769990). These studies are currently in Phase I or II and there is also a lack of research results.

#### 4. Resveratrol

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene, Figure 3h) is the best known and best-characterized derivative of stilbene due to its diverse potent biological activities and medicinal proper-

ties. Several excellent review articles provide a wealth of knowledge on the antioxidant, anti-inflammatory, cardioprotective, neuroprotective, and antitumor actions of resveratrol [54–58]. It is present in several dietary sources, including grapes (*Vitis vinifera*), soybeans, blueberries, pomegranates, and peanuts. Despite the significant biological potential of resveratrol, its use in medical therapies is still limited due to its low bioavailability. When ingested orally, stilbene derivatives are highly absorbed by the gastrointestinal tract, quickly and extensively metabolized in the liver, and then excreted through urine. Only a minor fraction of the absorbed compound will eventually reach the internal organs. Therefore, RSV's low bioavailability must be overcome to be considered a therapeutic agent for enhancing the effects of radiotherapy. In this aspect, there is high hope for nanotechnology-based carriers. Nanoparticles have improved RSV solubility, stability, pharmacokinetics, and biodistribution in cancer tissues [59–62].

#### 4.1. Resveratrol in Longevity and Cancer Therapy in Animal Model Studies

The health-promoting properties of resveratrol contributed to its recognition as a potential longevity drug. One of the main factors accelerating the aging process is excessive oxidative stress. Resveratrol improves the cells' ability to maintain the ROS antioxidant balance. First, it has ROS scavenging properties [63]. Second, resveratrol enhances/maintains a high level of GSH and the activity of glutathione peroxidase (GPx), GSH transferase, superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) [64,65]. The increased antioxidant enzyme activity may be stimulated by the influence of resveratrol on nuclear factor-erythroid-2 related factor 2 (Nrf2) [66]. The anti-aging effect of resveratrol is also related to its ability to improve mitochondrial function [67]. Wang and colleagues showed that RSV promoted mitochondrial function, up-regulating AMPK/SIRT1/Pgc1 $\alpha$ , and down-regulated Akt/mTOR pathway activity in the zebrafish model [68]. Growing evidence confirms that low-grade chronic inflammation plays an important role in the progression of aging and age-related diseases [69]. Resveratrol also has a beneficial effect on these processes [54,55]. Based on mouse models studies, it was found that RSV promotes an increased activity of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and SIRT1, which results in the reduction of inflammatory markers such as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) [70,71]. Health and longevity are related to the effective maintenance of physiological, biochemical, and immune functions. To do this, the body creates new cells to replace old or damaged cells (e.g., cancer cells). Apoptosis is involved in this process. However, if apoptosis is dysregulated, age-related pathologies are likely to emerge. For example, excessive apoptosis of neurons promoted the development of neurodegenerative diseases [72,73]. Studies have shown that resveratrol treatment improved cognitive dysfunction by reducing neuronal apoptosis [74–76]. Molecular analysis showed that resveratrol increased the expression of SIRT1 and Bcl2, and decreased the expression of RhoA and cleaved caspase-3 [74,75].

Resveratrol, in addition to its well-documented properties in the prevention of age-related diseases and aging, has been extensively studied in terms of radiotherapy. However, in this case, resveratrol has a double face. On one hand, it can increase the radioresistance of cells, which is very beneficial in protecting healthy tissues during radiotherapy. On the other hand, many studies show that it can increase the sensitivity of cancer cells to radiation (literature review in a separate chapter below). The effectiveness of resveratrol in both processes depends on many factors, such as dose, tumor pattern, and animal species, as well as on other variables such as the sex and strain of the animals, method, and time of administration. A detailed review of the literature and a discussion of the topic can be found in several works [77–81].

Due to its strong anti-inflammatory and antioxidant properties, resveratrol is an effective radioprotector. The studies carried out so far allow us to identify pathways, the activation/inhibition of which increases the resistance of cells to IR. In vivo experiments showed that the radioprotective effects of resveratrol were associated with the amelioration of DNA damage [82,83]. A few studies indicated that it was a consequence of an increase



in SIRT1 expression [84–86]. SIRT1 by stimulating p53 activity, overexpression of SOD2, and glutathione peroxidase 1 (GPX1) led to a reduction of apoptosis and amelioration of DNA damage [84,85]. The radioprotective effect of resveratrol was also confirmed by Said et al. [87] and Radwan et al. [88]. In this case, the action of resveratrol was associated with a reduction in the contents of inflammatory cytokines; TNF- $\alpha$ , nuclear factor-kappa (NF- $\kappa$ B), and interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Western blotting analysis revealed that resveratrol down-regulated the proteins expression of phosphoinositide 3-kinases (PI3K), protein kinase B (Akt) as well as the mammalian target of rapamycin (mTOR) [88].

In addition to the radioprotective effect of resveratrol, a synergistic effect in combination with ionizing radiation has been observed in many studies. The radiosensitizing effects of resveratrol are well documented in *in vitro* studies as discussed in detail in a separate section of this review. However, in just a few *in vivo* studies, the authors have confirmed that resveratrol can enhance radiotherapy. In one study, the radiosensitizing mechanism of resveratrol's action is associated with increased autophagy and apoptosis [89]. Mikami et al. also showed that resveratrol can increase the efficacy of irradiation through the regenerating gene (REG) III expression pathway [90]. In other studies, the authors suggest that resveratrol in combination with ionizing radiation delayed repair of radiation-induced DNA double-strand break (DSB) and prolonged G2/M arrest, which induced apoptosis [91].

#### 4.2. Clinical Trials of Resveratrol in the Treatment of Cancer and Selected Age-Related Diseases

Extensive research on resveratrol began when Renaud and de Logeril described an epidemiological study of the association between coronary heart disease and high red wine consumption in France. This phenomenon has been called the French Paradox [92]. A significant number of studies, including *in vitro* and preclinical studies, have shown that resveratrol is potent against chronic inflammatory diseases such as cancer and age-related diseases [93–96].

The effects of resveratrol in treating patients with various types of cancer (multiple myeloma, breast cancer, follicular lymphoma, and neuroendocrine tumors) have been investigated in several clinical trials. However, the majority of clinical trials are focused on evaluating the effects of resveratrol in colorectal cancer development. This is due to direct contact and prolonged exposure to colonic tissue. Moreover, the intestinal epithelium seems to be better adapted to the absorption of active molecules compared to other tissues. The oldest clinical study registered in the Clinic.trials.gov database dates back to 2005 (NCT00256334). The aim of the study was to determine the effect of freeze-dried grape powder (GP) on the Wnt signaling pathway in patients with colorectal cancer. Studies have shown that low doses of resveratrol in combination with other bioactive ingredients decreased the expression of the *Wnt* gene within the normal mucosa, but had no effect on the cancerous mucosa. This indicates that GP may play a beneficial role in the prevention of colon cancer, and not in the treatment of diagnosed colon cancer [97]. Other studies focusing on the same type of cancer, were carried out by Patel et al. [98]. They showed that administering resveratrol to patients with histologically confirmed colorectal cancer for 8 days at a dose of 0.5 or 1 g per day reduced the proliferation of cancer cells by 5%. The results suggest that a daily oral dose of 0.5 or 1.0 g of resveratrol is sufficient to induce anti-carcinogenic effects. The low systemic availability of resveratrol due to its rapid and intensive metabolism significantly limits its usefulness in the treatment of neoplasms located in organs distant from the absorption site. Howells and colleagues used micronized resveratrol (SRT501) in patients with colorectal cancer and liver metastases scheduled for hepatectomy (NCT00920803). They found that SRT501 was better tolerated by patients (3.6 times higher level compared to non-micronized resveratrol) and all side effects were considered mild compared to non-micronized resveratrol. A significant increase in the marker of apoptosis (cleaved caspase-3) was observed in tumor tissue compared to the tissue from patients receiving a placebo [99]. The results of clinical trials conducted in colorectal cancer patients indicate that resveratrol exhibits some pharmacological activity,

it is unclear whether this effect is significant enough to be a useful therapeutic agent in the treatment of this type of cancer. SRT501 alone or in combination with bortezomib has been used in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma (NCT00920556). In this study, researchers noted adverse events such as nausea, diarrhea, vomiting, fatigue, anemia, infections, and most specifically renal failure. The main finding of the study was unexpected renal toxicity that led to the early termination of the study [100]. Despite the very promising in vitro studies described by Bhardwaj et al., [101], in which the combination of resveratrol and bortezomib achieved synergistic cytotoxicity in multiple myeloma cells, clinical studies do not support such an effect in humans.

Kjaer and colleagues conducted a randomized placebo-controlled clinical study using two doses of resveratrol (150 mg or 1000 mg resveratrol daily) for 4 months in 66 middle-aged men suffering from metabolic syndrome. The highest dose of resveratrol significantly lowered the serum levels of the androgen precursors androstenedione, dehydroepiandrosterone, and dehydroepiandrosterone sulfate. However, the prostate size and circulating levels of PSA, testosterone, free testosterone, and dihydrotestosterone were unchanged [102]. The authors do not support the use of resveratrol in the treatment of benign prostatic hyperplasia. In subsequent clinical trials the efficacy of a commercial preparation of powdered skin from muscadine grapes (containing ellagic acid, quercetin, and resveratrol) in patients with nonmetastatic biochemically recurrent prostate cancer has been evaluated (NCT01317199). In the first phase of the research, it was shown that the preparation, even at a high dose, 4000 mg/day, was safe for patients [103]. Then Paller and colleagues conducted a randomized, multicentre, placebo-controlled phase II clinical study [104]. A study carried out on 125 patients provided evidence that the polyphenol-rich muscadine grape skin extract did not benefit the overall prostate cancer patient population. Based on these studies, it seems unlikely that resveratrol will be an effective treatment for prostate cancer, but more clinical trials need to be conducted to confirm this.

Alternatively, in the case of breast cancer, one clinical trial has indicated that resveratrol may be a promising therapeutic agent for such diseases [105]. The results showed that total trans-resveratrol and glucuronide metabolite serum levels increased over time. In addition, the authors demonstrated the dose-dependent effects of resveratrol on methylation of *RASSF-1 $\alpha$* , a gene associated with breast cancer. *RASSF-1 $\alpha$*  methylation decreased with increasing levels of trans-resveratrol and resveratrol-glucuronide in the circulation, and with decreasing breast-specific prostaglandin (PG)E<sub>2</sub> expression in the breast. These results suggest that resveratrol may influence the epigenetics of the genes associated with breast cancer, which should be confirmed in future clinical trials. Other studies focusing on the same type of cancer are still ongoing with no results so far. One of the trials (NCT04266353) investigates the inhibitory effect of resveratrol on insulin-like growth factor II (IGF-II) expression in African American women with breast cancer. The purpose of the second study (NCT05306002) is to assess whether DNA damage in patients with breast and ovarian cancer syndrome decreases with dietary components, including resveratrol. Based on the presented clinical trials, it is difficult to definitively conclude about the therapeutic effectiveness of resveratrol, taking into account the small number of clinical trials conducted.

Numerous in vitro and in vivo studies have confirmed the beneficial effects of resveratrol in age-related diseases, e.g., such as neurodegenerative disease, diabetes, and atherosclerosis. The ClinicalTrials.gov database has registered 5 clinical studies on the effects of resveratrol on Alzheimer's disease (AD), of which the results of 2 tests have been published (NCT00678431, NCT01504854). Both studies showed that RSV is safe and well tolerated in patients with mild to moderate AD [106–108]. Resveratrol and its major metabolites penetrated the blood-brain barrier and affected the cerebrospinal fluid. Compared with placebo-treated patients, patients treated with resveratrol had a slower decrease in beta-amyloid 42 (A $\beta$ 42) and A $\beta$ 40 in the cerebrospinal fluid, indicating less accumulation of A $\beta$  in the brain. It was also observed that the levels of tau and phospho-tau in the cerebrospinal fluid remained unchanged. The authors concluded that targeting the molecular pathways of aging could lead to new therapies that will delay or prevent aging-related diseases,

including AD. Both clinical studies presented results consistent with those obtained in *in vitro* and *in vivo* studies and provided evidence that resveratrol may be a safe and effective treatment for AD [109].

Diabetes mellitus (DM) is another common, chronic, and serious disease in which resveratrol may be effective. In clinical trials, Brasnyo et al. investigated whether resveratrol improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). The levels of glucose-dependent insulinotropic polypeptides (GIP) and glucagon-like peptide 1 (GLP-1) (hormones affecting postprandial hyperglycemia) and the ratio of phosphorylated protein kinase B (pAkt) to protein kinase B (Akt) were also tested. In diabetic patients, resveratrol did not alter GLP-1 or GIP levels, but significantly reduced insulin resistance and blood glucose levels, and delayed postprandial glucose peaks. The authors suggested that resveratrol improved insulin sensitivity in humans by reducing oxidative stress which leads to more efficient insulin signaling through the Akt pathway [110]. Similarly, promising results in clinical trials (CTRI/2011/05/001731) were obtained by Bhat et al. [111]. A study revealed that daily resveratrol treatment for 3 months decreased glycated hemoglobin (HbA1c) levels, systolic blood pressure, total cholesterol, and total protein, improving glycemic control. The authors concluded that oral supplementation of resveratrol could be a potential adjuvant for the treatment of diabetes [111]. Thazath et al. drew the opposite conclusions about the use of resveratrol to improve glycemic control [ACTRN12613000717752]. The authors found that in T2DM patients, resveratrol had no effect on GLP-1 secretion, glycemic control, gastric emptying, body weight, or energy intake [112]. Subsequent clinical trials (NCT02565979, NCT02129595) by Lig and colleagues also found that resveratrol supplementation did not increase insulin sensitivity [113,114].

Resveratrol is one of the most active polyphenols that stimulate SIRT-1 activity [115]. The activity of this protein is decreased in T2DM [116]. The clinical trials (NCT02244879) evaluated whether an increase in SIRT-1 expression/activation affected the acetylation of histone 3 at the 56th lysine residue (H3K56ac) in T2DM patients who were receiving either resveratrol or placebo for 6 months. Unexpectedly, it was found that not all patients receiving resveratrol displayed increased SIRT-1 expression/activation. Nevertheless, the increase in SIRT-1 expression was associated with significant H3K56ac content reduction and increased serum antioxidant activity in diabetes patients [117]. The same clinical studies demonstrated that 6-month supplementations with 500 or 40 mg/day of resveratrol increased pentraxin 3 (anti-inflammatory protein produced in response to inflammation [118]) level and total antioxidant status in type 2 diabetic patients [119]. Increased expression of SIRT1 and AMPK in skeletal muscle was confirmed in other clinical trials in diabetic patients supplemented with resveratrol (NCT01677611). These results indicated that resveratrol may have beneficial exercise-mimetic effects in type 2 diabetes patients [120]. Analysis of data from registered controlled trials by Fraiz et al. showed that RSV supplementation can stimulate SIRT-1 in humans and thus contribute to the treatment of overweight and its comorbidities. However, more research is needed as this effect has not been really confirmed [121].

A critical review of clinical trials evaluating the efficacy and safety of resveratrol preparations for adults with type 2 diabetes was conducted by a team of scientists from the University of Manitoba [122]. The authors conclude that the current studies are insufficient to assess the safety and efficacy of resveratrol supplementation in the treatment of adults with type 2 diabetes. The limited available studies do not provide sufficient evidence to support any beneficial or unfavorable effect of four to five weeks of resveratrol at a dose of 10 mg to 1000 mg in adults with type 2 diabetes [121].

Atherosclerosis is considered the major cause of cardiovascular diseases (CVD). It is characterized by the deposition of extracellular lipids, the proliferation and migration of local smooth muscle cells, and chronic inflammation. It leads to luminal narrowing and/or thrombus formation, resulting in clinical events such as coronary artery disease, peripheral arterial disease, or stroke [123,124]. Contrary to the promising results of animal studies, clinical trials evaluating the effect of resveratrol on the plasma lipid profile in humans have

not been conclusive. For example, in clinical trials conducted in healthy obese men and healthy adult smokers treated for 30 days with resveratrol 150 mg/day and 500 mg/day, respectively, significant reductions in plasma triglycerides were found [125,126]. Another study in patients with type 2 diabetes revealed that supplementation of resveratrol for 3 months significantly improves total cholesterol. No significant changes in body weight and high-density lipoprotein and low-density lipoprotein cholesterol were observed [111]. Tome-Carneiro and colleagues showed that in statin-treated patients with high CVD risk, a daily intake of 350 mg of resveratrol-enriched grape extract containing 8 mg of resveratrol resulted in a 20% reduction in oxidized LDL cholesterol and a 4.5% reduction in LDL cholesterol [127]. However, many clinical studies have not confirmed the effect of resveratrol on the lipid profile in non-obese women with normal glucose tolerance [128], clinical trials NCT00823381), obese men (NCT01150955) [129], mildly hypertensive adults, overweight/obese adults [130] and in patients with the metabolic syndrome [131]. Similar conclusions from systematic review and meta-analysis on randomized clinical trials were made by Haghghatdoost and Hariri [132]. The results indicated that resveratrol supplementation did not change circulating low-density lipoprotein, total cholesterol, and high-density lipoprotein, while triacylglycerol showed significant increases after taking resveratrol supplements. The authors conclude that resveratrol does not change lipid profile concentration [132].

A clinical trial has also been conducted on the effects of resveratrol on the primary prevention of atherosclerosis (NCT01244360). The clinical trial focused primarily on endothelial responses and plasma biomarkers in healthy subjects. Changes in the expression of genes associated with inflammation and atherosclerosis were assessed, including interleukins (IL), interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$ , a vascular cell adhesion molecule (VCAM), and an intercellular adhesion molecule (ICAM). Treatment with resveratrol has been shown to reduce the expression of intercellular adhesion molecules (ICAM), vascular cell adhesion molecules (VCAM), and interleukin-8 molecules that contribute to the development of atherosclerosis by promoting lipid deposition and exacerbating inflammation [133]. Overall, more clinical data is needed to fully understand the therapeutic potential of resveratrol. Until then, resveratrol will continue to be promising, but not yet proven.

#### 4.3. Resveratrol as a Radiosensitizer

In light of mechanisms favoring and limiting the effectiveness of radiotherapy, resveratrol action may appear contrary to the desired properties of substances by increasing the sensitivity of cells to ionizing radiation. However, the effect of resveratrol on cells follows the classic concept of hormesis, i.e., the theory that the dose of a given factor determines whether it will have a beneficial or harmful effect on the organism. All the aforementioned effects related to resveratrol consumption through food products mainly result from its consumption in relatively small amounts. With an appropriately high dose, resveratrol can act in a manner opposite to the standard antioxidant effects of polyphenols. This is especially important in the context of sensitization of neoplastic cells to ionizing radiation, which, depending on the type of neoplasm, exhibit a number of mechanisms that make them more resistant to radiation.

One such mechanism is the increased expression of STAT (signal-transducer-and-activator-of-transcription) transcription factors, which are overexpressed in the head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). This condition promotes the growth and survival of cancer cells. The phosphorylated form of STAT3 reduced the level of the p53 tumor suppressor, increased the activity of anti-apoptotic proteins, and increased the tumor's resistance to chemotherapeutic agents and ionizing radiation. These processes are triggered by the stimulation of vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinases-2 and -9 (MMP-2 and MMP-9), and inhibitors of apoptosis protein-1 (IAP-1) [134,135]. In FaDu cells, resveratrol could significantly lower the level of STAT3 phosphorylation by activating the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1), an inhibitor of STAT3. As a result, cell proliferation was inhibited, apoptosis induced, and the use of 100  $\mu$ M



resveratrol increased cell sensitivity to radiation at a dose of 10 Gy [136]. Yang et al. [137] had similar observations on radioresistant glioblastoma multiforme tumor-initiating cells (GBM-TIC). In their study, cells were irradiated with doses of radiation at varying intensities, which increased STAT3 phosphorylation, and GBM-CD133<sup>+</sup>TIC cells were characterized by high tumorigenic capacity and radiochemical resistance. The use of 100  $\mu$ M resveratrol increased the cell sensitivity to radiation and induced apoptosis by inhibiting STAT3 signaling. Apart from the induction of apoptosis, resveratrol may also induce cell cycle inhibition, autophagy and reduce the response of cells to DNA damage, leading to further radiosensitization [90,138].

The group of neoplasms in which radiotherapy is the first-line treatment strategy is prostate neoplasms. Despite this, prostate cancers (PC) become resistant to this type of treatment. Among the factors influencing the emergence of tumors, radiation resistance is the inhibition of DOC-2/DAB2 (DAB2IP) protein activity. This protein participates in regulating cell proliferation, cell survival, and apoptosis by inactivating the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. During the study on the human DAB2IP-deficient prostate cancer cells resistant to IR (LAPC4-KD and PC3-KD cell lines), irradiation with X-rays in doses of 2–6 Gy was used after prior incubation of cells with 25 or 500  $\mu$ g/mL of resveratrol. Resveratrol could enhance the effect of irradiation by inhibiting cell proliferation, inducing apoptosis, arresting the cell cycle, and delaying and slowing down cellular responses to radiation-induced DNA damage [91].

Another mechanism that sensitizes prostate cancer cells to ionizing radiation is the activity of the perforin and granzyme B proteins, which are an important element of the killer properties of lymphocytes and NK cells. Fang et al. showed that resveratrol up-regulated the perforin and granzyme B expression in prostate cancer cells (line PC-3 and DU145). Ionizing radiation alone up-regulated the expression of granzyme B, but not that of perforin. The combined IR and resveratrol treatment of PC-3 and DU145 cells increased the expression of both perforin and granzyme B. A significant reduction was observed in survival and a remarkable increase in apoptosis [139]. The same authors in subsequent studies confirmed that RSV synergizes with IR to inhibit the proliferation of a PC cell line by promoting apoptosis and senescence. The antiproliferative effect of RSV/IR correlated with increased expression of antiproliferative molecules p15, p21, and mutant p53 and decreased expression of cyclin B, cyclin D, and cell division protein kinase 2 (cdk2). Increases in apoptosis correlated with the increased expression of pro-apoptotic molecules such as the Fas receptor and TRAIL receptor 1 (TRAILR1). Similar to apoptosis, cellular senescence has been shown to function as a potent mechanism to inhibit tumor cell proliferation and survival; phosphorylation of histone H2A.X has been suggested as a marker for cell senescence. Fang et al. showed that RSV/IR promoted senescence as evidenced by the increased expression of H2A.X [140].

Rashid et al. also confirmed resveratrol's high efficiency in sensitizing prostate cancer cells to ionizing radiation [141]. The authors showed that resveratrol concentrations similar to those achieved in human serum (2.5 and 5  $\mu$ M) enhanced the cytotoxicity of a conventional radiation therapy fraction (2 Gy) in PC cells without additional toxicity to normal epithelial cells. They performed studies proposing resveratrol's model of action and ionizing radiation in regulating the cell cycle and survival in PC cells. Accordingly, RSV enhances the effects of IR on kinase AMPK activation, leading to an early cell cycle arrest, and inhibits Akt kinase to reduce gene expression, proliferation, and enhance radiation cytotoxicity [141].

The synergistic effect of resveratrol and radiation on inhibiting the cell survival of radioresistant PC cells (exactly DU145 cells) was confirmed in another study. Scarlatti et al. showed that resveratrol potentiates ionizing radiation-induced ceramide accumulation by promoting its de novo biosynthesis [142]. Ceramide accumulation is an important pro-apoptotic signal enabled by the activation of sphingomyelinases as a response to various stress factors (i.e., tumor necrosis factor). Ceramide activates a serine-threonine protein phosphatase, and in cells, it regulates protein phosphorylation as well as multiple

downstream targets (such as interleukin converting enzyme (ICE)-like proteases, stress-activated protein kinases, and the retinoblastoma gene product) that mediate its distinct cellular effects [143].

Melanomas are the most aggressive skin cancer type, which is also characterized by high resistance to chemotherapeutic agents. Radiotherapy is used as an adjuvant treatment after surgery and alongside chemotherapy, mainly to control metastasis. The 50  $\mu\text{M}$  resveratrol concentration combined with a 5 Gy radiation dose resulted in the reduced survival of SW1 and WM35 melanoma cells [144]. Studies on cultured mouse melanoma B16F10 and mouse colon carcinoma CT26 cells showed that resveratrol led to the radiosensitization of cancer cells by increasing apoptotic cell death and loss of mitochondrial membrane potential, presumably through enhanced ROS generation [145].

The use of resveratrol in the amount of 20  $\mu\text{M}$  also enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer cells at radiation doses from 0 to 8 Gy. This synergistic strategy induced radiosensitization through apoptosis-independent molecular pathways and increased the production of reactive oxygen species and DNA double-strand breaks, thus leading to accelerated cell aging and death [146]. Another study on A549 lung cancer cells proved that resveratrol could potentiate the effects of cell irradiation by limiting the cancer cell's ability to regulate intracellular calcium concentration through the store-operated calcium entry (SOCE) mechanism. This result was achieved by reducing the expression of the key elements for this mechanism, i.e., the matrix stromal interaction molecule (STIM1) and a calcium release-activated calcium channel protein (Orai1) responsible for detecting the decrease in the concentration of calcium ions in the endoplasmic reticulum and triggering the influx of calcium ions from the extracellular space. This process can lead to the autophagy of cells [147]. This mechanism has also been identified earlier in prostate, colorectal, and melanoma cancer cells [148,149].

Another mechanism that may be influenced by resveratrol is the sirtuin 1 protein (SIRT1). This protein can silence genes related to aging processes, and under normal conditions, it protects healthy cells against ionizing radiation. SIRT1 is apparently bifunctional in tumors and has both suppressor and oncogenic functions. There are reports that SIRT1 stimulation can induce cell proliferation, angiogenesis, and cancer cell resistance to treatment. However, these effects may differ in different types of neoplastic cells [150]. It has also been suggested that stimulating SIRT1 by resveratrol may regulate the amount of cyclin D1, leading to the inhibition of tumor cell proliferation and survival [151]. Research into this aspect of the response to resveratrol is fairly limited, and its combination with ionizing radiation has different ramifications for different cell types. An analysis of resveratrol and IR effects on A549 and H460 lung cancer cells showed that SIRT1 expression was negatively correlated with radiosensitivity in lung cancer cell lines. Radiation sensitivity was significantly reduced when SIRT1 was activated by resveratrol. The SIRT1 action was mainly related to the regulation of DNA damage repair and apoptosis processes (SIRT1/NF- $\kappa$ B/Smac pathway) [152]. Based on published findings, the SIRT1/NF- $\kappa$ B/Smac pathway may be a new potential target pathway in therapy for non-small cell lung carcinoma. Resveratrol combined with ionizing radiation appears to have the opposite effect, i.e., reducing the radiosensitivity of lung cancer cells.

Radiotherapy is a treatment method commonly used to treat glioblastoma. Standard treatment strategies include surgery followed by adjuvant radiochemotherapy. In this respect, resveratrol as a factor sensitizing cancer cells to radiation doses may increase the effectiveness of treatment [139,140]. Resveratrol was tested on SU-2 cells exposed to X-ray radiation in single doses from 0 to 6 Gy. The initial application of 75  $\mu\text{M}$  resveratrol reduced the proliferation of cancer cells compared with radiation-only cells. There was also an increase in the microtubule-associated protein light chain 3 expression, which plays a key role in cell autophagy, and a reduction in the amount of anti-apoptotic protein Bcl-2 [90]. The BAX/Bcl-2 ratio was also reduced in the pituitary cancer model for GH3 and TtT/GF cells. Irradiation of cells after applying 10  $\mu\text{M}$  resveratrol induced cell death, whereas the irradiation itself only limited their growth [153]. In another glioblastoma

model, the inhibitory effect of resveratrol on the HIF-1 $\alpha$  protein was observed on U87 MG cells. HIF proteins are elements of the cell's response to the state of hypoxia. Their activation is associated with reducing apoptosis, cell differentiation, activation of DNA repair mechanisms, and stimulation of the formation of new blood vessels. All these effects are associated with tumor resistance to treatment, and the state of tissue hypoxia alone is a poor prognosis for the further course of the disease [154–157]. Hypoxic neoplastic cells also become resistant to ionizing radiation [158,159]. The use of resveratrol at a concentration of 20  $\mu$ M before the combined action of 1  $\mu$ M iododeoxyuridine (a substance that causes cell sensitization to radiation) and irradiation with a dose of 2 Gy reduced the ability of cells to form colonies. It increased the degree of DNA damage compared with cells treated only with iododeoxyuridine [160].

Radioresistance is also a hallmark of nasopharyngeal carcinomas (NPCs). Tumors belonging to this group are more common in the Asian continent and are often diagnosed in the advanced and metastatic stages. In order to overcome the radiation resistance of human CNE-1 cells, they were incubated with resveratrol at concentrations ranging from 25 to 150  $\mu$ M prior to irradiation with X-rays (0–6 Gy). Resveratrol increased the cells' sensitivity to radiation but decreased their viability and ability to form dose-dependent colonies. In this case, RSV's radiosensitizing activity was based on the phosphorylated form of AKT inhibitors by reducing the level of transcription factor E2F1. Moreover, administering resveratrol in the NPC tumor xenograft models at 50 mg/kg/day and 4 Gy/day irradiation doses for the next 3 days significantly reduced the tumor volume and weight of treated mice compared with those exposed to radiation only or who were administered resveratrol alone [161].

The ability to sensitize cells to ionizing radiation was also studied in a breast cancer cell model. In the MCF-7 cell line, the combined action of resveratrol at various concentrations (0, 10, 30, 100  $\mu$ M) combined with radiation at doses of 1, 2, and 3 Gy, induced cytotoxic effects, limited cell proliferation, and inhibited the cell cycle. Interestingly, the best results were achieved using 30  $\mu$ M resveratrol combined with 3 Gy of radiation [162]. In subsequent studies conducted on the same cell model (MCF-7), it was shown that out of the selected stilbene derivatives (resveratrol, piceid, and piceatannol), resveratrol increased the effect of IR the strongest. Our results showed that RSV combined with IR led to a decrease in the activity of antioxidant enzymes, resulting in the accumulation of the formed ROS. RSV combined with IR reduced the activity of antioxidant enzymes, resulting in the accumulation of nascent ROS. The effects of resveratrol and IR also enhanced the expression of apoptotic genes, such as Bax, p53, and caspase 8, leading to apoptosis [163]. Amini et al. showed a similar sensitizing effect of resveratrol combined with radiotherapy in MCF-7 cells [164].

## 5. Summary

In vitro and in vivo data indicate that plant compounds can be effective in increasing the radiation sensitivity of cancer cells. Nevertheless, clinical applications of natural products in radiotherapy are scarce, which may be related to their low bioavailability in the human body. A growing body of research gives hope that the bioavailability and efficacy of radiosensitization can be significantly increased by using new drug delivery systems. However, only the well-documented biological activity of compounds is the basis for further research into methods to optimize bioavailability in humans.

This review presents clinical trials of natural radiosensitizers and discusses their mechanisms of action. If the clinical trials have been completed, the article also discusses their results. In addition, the review summarizes the huge number of preclinical studies investigating the radiosensitizing effects of resveratrol.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.R. and D.K.; writing—original draft preparation, D.K., T.R., S.K. and A.R.; writing—review and editing, A.R.; visualization, D.K. and S.K.; supervision, A.R.; project administration, A.R.; funding acquisition, D.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was financially supported by the Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, (grant no. B191100002154.02).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Shah, S.C.; Kayamba, V.; Peek, M.R., Jr.; Heimbürger, D. Cancer Control in Low- and Middle-Income Countries: Is It Time to Consider Screening? *J. Glob. Oncol.* **2019**, *5*, 1–8. [[CrossRef](#)]
2. Liu, Y.; Zheng, C.; Huang, Y.; He, M.; Xu, W.W.; Li, B. Molecular mechanisms of chemo- and radiotherapy resistance and the potential implications for cancer treatment. *MedComm* **2021**, *2*, 315–340. [[CrossRef](#)]
3. Lonati, L.; Barbieri, S.; Guardamagna, I.; Ottolenghi, A.; Baiocco, G. Radiation-induced cell cycle perturbations: A computational tool validated with flow-cytometry data. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 925. [[CrossRef](#)]
4. Yang, J.; Antin, P.; Berx, G.; Blanpain, C.; Brabletz, T.; Bronner, M.; Campbell, K.; Cano, A.; Casanova, J.; Christofori, G.; et al. Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 341–352. Correction in *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**, *22*, 834. [[CrossRef](#)]
5. Olivares-Urbano, M.A.; Griñán-Lisón, C.; Marchal, J.A.; Núñez, M.I. CSC Radioresistance: A Therapeutic Challenge to Improve Radiotherapy Effectiveness in Cancer. *Cells* **2020**, *9*, 1651. [[CrossRef](#)]
6. Harada, H. Hypoxia-inducible factor 1–mediated characteristic features of cancer cells for tumor radioresistance. *J. Radiat. Res.* **2016**, *57*, i99–i105. [[CrossRef](#)]
7. Tang, L.; Wei, F.; Wu, Y.; He, Y.; Shi, L.; Xiong, F.; Gong, Z.; Guo, C.; Li, X.; Deng, H.; et al. Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, *37*, 87. [[CrossRef](#)]
8. Kabakov, A.E.; Yakimova, A.O. Hypoxia-Induced Cancer Cell Responses Driving Radioresistance of Hypoxic Tumors: Approaches to Targeting and Radiosensitizing. *Cancers* **2021**, *13*, 1102. [[CrossRef](#)]
9. Gerweck, L.E.; Vijayappa, S.; Kurimasa, A.; Ogawa, K.; Chen, D.J. Tumor Cell Radiosensitivity Is a Major Determinant of Tumor Response to Radiation. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 8352–8355. [[CrossRef](#)]
10. Gong, L.; Zhang, Y.; Liu, C.; Zhang, M.; Han, S. Application of Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy. *Int. J. Nanomed.* **2021**, *16*, 1083–1102.
11. Tiwari, P.; Mishra, K.P. Flavonoids sensitize tumor cells to radiation: Molecular mechanisms and relevance to cancer radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* **2020**, *96*, 360–369. [[CrossRef](#)]
12. Calvaruso, M.; Pucci, G.; Musso, R.; Bravatà, V.; Cammarata, F.P.; Russo, G.; Forte, G.I.; Minafra, L. Nutraceutical Compounds as Sensitizers for Cancer Treatment in Radiation Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5267. [[CrossRef](#)]
13. Benej, M.; Hong, X.; Vibhute, S.; Scott, S.; Wu, J.; Graves, E.; Le, Q.-T.; Koong, A.C.; Giaccia, A.J.; Yu, B.; et al. Papaverine and its derivatives radiosensitize solid tumors by inhibiting mitochondrial metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 10756–10761. [[CrossRef](#)]
14. Alfonzetti, T.; Yasmin-Karim, S.; Ngwa, W.; Avery, S. Phytoradiotherapy: An Integrative Approach to Cancer Treatment by Combining Radiotherapy With Phytomedicines. *Front. Oncol.* **2021**, *10*, 624663. [[CrossRef](#)]
15. Yi, J.; Zhu, J.; Zhao, C.; Kang, Q.; Zhang, X.; Suo, K.; Cao, N.; Hao, L.; Lu, J. Potential of natural products as radioprotectors and radiosensitizers: Opportunities and challenges. *Food Funct.* **2021**, *12*, 5204–5218. [[CrossRef](#)]
16. Dias, D.A.; Urban, S.; Roessner, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites* **2012**, *2*, 303–336. [[CrossRef](#)]
17. Alves, R.R.N.; Rosa, I.M.L. Biodiversity, traditional medicine and public health: Where do they meet? *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **2007**, *3*, 14. [[CrossRef](#)]
18. Rayan, A.; Raiyn, J.; Falah, M. Nature is the best source of anticancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0187925. [[CrossRef](#)]
19. Priya, S.; Satheeshkumar, P.K. Natural Products from Plants. In *Functional and Preservative Properties of Phytochemicals*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020; pp. 145–163.
20. Calixto, J.B. The role of natural products in modern drug discovery. *An. Acad. Bras. Ciênc.* **2019**, *91* (Suppl. S3). [[CrossRef](#)]
21. Yuan, H.; Ma, Q.; Ye, L.; Piao, G. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules* **2016**, *21*, 559. [[CrossRef](#)]
22. Schaeue, D.; McBride, W.H. Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2015**, *12*, 527–540. [[CrossRef](#)]
23. Baskar, R.; Lee, K.A.; Yeo, R.; Yeoh, K.-W. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *Int. J. Med. Sci.* **2012**, *9*, 193–199. [[CrossRef](#)]
24. Adams, G.E. CHEMICAL RADIOSENSITIZATION OF HYPOXIC CELLS. *Br. Med. Bull.* **1973**, *29*, 48–53. [[CrossRef](#)]



25. Fowler, J.F.; Adams, G.E.; Denekamp, J. Radiosensitizers of hypoxic cells in solid tumours. *Cancer Treat. Rev.* **1976**, *3*, 227–256. [[CrossRef](#)]
26. Karar, J.; Maity, A. Modulating the tumor microenvironment to increase radiation responsiveness. *Cancer Biol. Ther.* **2009**, *8*, 1994–2001. [[CrossRef](#)]
27. Williams, K.J.; Telfer, B.A.; Shannon, A.M.; Babur, M.; Stratford, I.J.; Wedge, S.R. Combining radiotherapy with AZD2171, a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor signaling: Pathophysiologic effects and therapeutic benefit. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 599–606. [[CrossRef](#)]
28. Schwartz, D.L.; Powis, G.; Thitai-Kumar, A.; He, Y.; Bankson, J.; Williams, R.; Lemos, R.; Oh, J.; Volgin, A.; Soghomonyan, S.; et al. The selective hypoxia inducible factor-1 inhibitor PX-478 provides in vivo radiosensitization through tumor stromal effects. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 947–958. [[CrossRef](#)]
29. Mu, F.; Liu, T.; Zheng, H.; Xie, X.; Lei, T.; He, X.; Du, S.; Tong, R.; Wang, Y. Mangiferin induces radiosensitization in glioblastoma cells by inhibiting nonhomologous end joining. *Oncol. Rep.* **2018**, *40*, 3663–3673. [[CrossRef](#)]
30. Wen, C.; Zhou, Y.; Zhou, C.; Zhang, Y.; Hu, X.; Li, J.; Yin, H. Enhanced Radiosensitization Effect of Curcumin Delivered by PVP-PCL Nanoparticle in Lung Cancer. *J. Nanomater.* **2017**, *2017*, 9625909. [[CrossRef](#)]
31. Prabakaran, P.J.; Javaid, A.M.; Swick, A.D.; Werner, L.R.; Nickel, K.P.; Sampene, E.; Hu, R.; Ong, I.M.; Bruce, J.Y.; Hartig, G.K.; et al. Radiosensitization of Adenoid Cystic Carcinoma with MDM2 Inhibition. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 6044–6053. [[CrossRef](#)]
32. Wang, W.-H.; Shen, C.-Y.; Chien, Y.-C.; Chang, W.-S.; Tsai, C.-W.; Lin, Y.-H.; Hwang, J.-J. Validation of Enhancing Effects of Curcumin on Radiotherapy with F98/FGT Glioblastoma-Bearing Rat Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4385. [[CrossRef](#)]
33. Mekkawy, M.H.; Fahmy, H.A.; Nada, A.S.; Ali, O.S. Radiosensitizing Effect of Bromelain Using Tumor Mice Model via Ki-67 and PARP-1 Inhibition. *Integr. Cancer Ther.* **2021**, *20*, 1–12. [[CrossRef](#)]
34. Jia, L.; Ma, S.; Hou, X.; Wang, X.; Qased, A.B.L.; Sun, X.; Liang, N.; Li, H.; Yi, H.; Kong, D.; et al. The Synergistic Effects of Traditional Chinese Herbs and Radiotherapy for Cancer Treatment (Review). *Oncol. Lett.* **2013**, *5*, 1439–1447.
35. Chappie, T.A.; Humphrey, J.M.; Allen, M.P.; Estep, K.G.; Fox, C.B.; Lebel, L.A.; Liras, S.; Marr, E.S.; Menniti, F.S.; Pandit, J.; et al. Discovery of a Series of 6,7-Dimethoxy-4-pyrrolidylquinazoline PDE10A Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 182–185. [[CrossRef](#)]
36. Gomes, D.A.; Joubert, A.M.; Visagie, M.H. In Vitro Effects of Papaverine on Cell Proliferation, Reactive Oxygen Species, and Cell Cycle Progression in Cancer Cells. *Molecules* **2021**, *26*, 6388. [[CrossRef](#)]
37. Ashrafzadeh, M.; Zarrabi, A.; Hashemi, F.; Moghadam, E.R.; Hashemi, F.; Entezari, M.; Hushmandi, K.; Mohammadinejad, R.; Najafi, M. Curcumin in cancer therapy: A novel adjunct for combination chemotherapy with paclitaxel and alleviation of its adverse effects. *Life Sci.* **2020**, *256*, 117984. [[CrossRef](#)]
38. Mukhtar, E.; Adhami, V.M.; Mukhtar, H. Targeting Microtubules by Natural Agents for Cancer Therapy. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13*, 275–284. [[CrossRef](#)]
39. Ai, D.; Ye, J.; Wei, S.; Li, Y.; Luo, H.; Cao, J.; Zhu, Z.; Zhao, W.; Lin, Q.; Yang, H.; et al. Comparison of 3 Paclitaxel-Based Chemoradiotherapy Regimens for Patients With Locally Advanced Esophageal Squamous Cell Cancer: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw. Open* **2022**, *5*, e220120. [[CrossRef](#)]
40. Chen, Y.; Ye, J.; Zhu, Z.; Zhao, W.; Zhou, J.; Wu, C.; Tang, H.; Fan, M.; Li, L.; Lin, Q.; et al. Comparing Paclitaxel Plus Fluorouracil Versus Cisplatin Plus Fluorouracil in Chemoradiotherapy for Locally Advanced Esophageal Squamous Cell Cancer: A Randomized, Multicenter, Phase III Clinical Trial. *J. Clin. Oncol.* **2019**, *37*, 1695–1703. [[CrossRef](#)]
41. Einstein, M.H.; Frimer, M.; Kuo, D.Y.-S.; Reimers, L.L.; Mehta, K.; Mutyala, S.; Huang, G.S.; Hou, J.Y.; Goldberg, G.L. Phase II trial of adjuvant pelvic radiation “sandwiched” between combination paclitaxel and carboplatin in women with uterine papillary serous carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **2012**, *124*, 21–25. [[CrossRef](#)]
42. Rich, T.; Harris, J.; Abrams, R.; Erickson, B.; Doherty, M.; Paradelo, J.; Small, W.; Safran, H.; Wanebo, H.J. Phase II Study of External Irradiation and Weekly Paclitaxel for Nonmetastatic, Unresectable Pancreatic Cancer: RTOG-98-12. *Am. J. Clin. Oncol. Cancer Clin. Trials* **2004**, *27*, 51–56. [[CrossRef](#)]
43. Giordano, A.; Tommonaro, G. Curcumin and Cancer. *Nutrients* **2019**, *11*, 2376. [[CrossRef](#)]
44. Chendil, D.; Ranga, R.S.; Meigooni, D.; Sathishkumar, S.; Ahmed, M.M. Curcumin confers radiosensitizing effect in prostate cancer cell line PC-3. *Oncogene* **2004**, *23*, 1599–1607. [[CrossRef](#)]
45. Sandur, S.K.; Deorukhkar, A.; Pandey, M.K.; Pabón, A.M.; Shentu, S.; Guha, S.; Aggarwal, B.B.; Krishnan, S. Curcumin Modulates the Radiosensitivity of Colorectal Cancer Cells by Suppressing Constitutive and Inducible NF- $\kappa$ B Activity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2009**, *75*, 534–542. [[CrossRef](#)]
46. Boqiang, C.; Ma, J.; Guo, X.; Sun, J.; Yu, Y.; Cao, B.; Zhang, L.; Ding, X.; Huang, J.; Shao, J. Curcumin Enhances the Radiosensitivity of U87 Cells by Inducing DUSP-2 Up-Regulation. *Cell. Physiol. Biochem.* **2015**, *35*, 1381–1393. [[CrossRef](#)]
47. Minafra, L.; Porcino, N.; Bravatà, V.; Gaglio, D.; Bonanomi, M.; Amore, E.; Cammarata, F.P.; Russo, G.; Militello, C.; Savoca, G.; et al. Radiosensitizing effect of curcumin-loaded lipid nanoparticles in breast cancer cells. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 11134. [[CrossRef](#)]
48. Termini, D.; Hartogh, D.J.D.; Jaglanian, A.; Tsiani, E. Curcumin against Prostate Cancer: Current Evidence. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1536. [[CrossRef](#)]
49. Hejazi, J.; Rastmanesh, R.; Taleban, F.-A.; Molana, S.-H.; Hejazi, E.; Ehtejab, G.; Hara, N. Effect of Curcumin Supplementation During Radiotherapy on Oxidative Status of Patients with Prostate Cancer: A Double Blinded, Randomized, Placebo-Controlled Study. *Nutr. Cancer* **2016**, *68*, 77–85. [[CrossRef](#)]

50. Saadipoor, A.; Razzaghdoust, A.; Simforoosh, N.; Mahdavi, A.; Bakhshandeh, M.; Moghadam, M.; Abdollahi, H.; Mofid, B. Randomized, double-blind, placebo-controlled phase II trial of nanocurcumin in prostate cancer patients undergoing radiotherapy. *Phytotherapy Res.* **2019**, *33*, 370–378. [[CrossRef](#)]
51. Shi, Y. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Mol. Cell* **2002**, *9*, 459–470. [[CrossRef](#)]
52. Liu, X.; Sun, C.; Jin, X.; Li, P.; Ye, F.; Zhao, T.; Gong, L.; Li, Q. Genistein Enhances the Radiosensitivity of Breast Cancer Cells via G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Molecules* **2013**, *18*, 13200–13217. [[CrossRef](#)]
53. Liu, X.; Sun, C.; Liu, B.; Jin, X.; Li, P.; Zheng, X.; Zhao, T.; Li, F.; Li, Q. Genistein Mediates the Selective Radiosensitizing Effect in NSCLC A549 Cells via Inhibiting Methylation of the Keap1 Gene Promoter Region. *Oncotarget* **2016**, *7*, 27267.
54. Berretta, M.; Bignucolo, A.; Di Francia, R.; Comello, F.; Facchini, G.; Ceccarelli, M.; Iaffaioli, R.V.; Quagliariello, V.; Maurea, N. Resveratrol in Cancer Patients: From Bench to Bedside. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2945. [[CrossRef](#)]
55. Ko, J.-H.; Sethi, G.; Um, J.-Y.; Shanmugam, M.K.; Arfuso, F.; Kumar, A.P.; Bishayee, A.; Ahn, K.S. The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2589. [[CrossRef](#)]
56. Ren, B.; Kwah, M.X.-Y.; Liu, C.; Ma, Z.; Shanmugam, M.K.; Ding, L.; Xiang, X.; Ho, P.C.-L.; Wang, L.; Ong, P.S.; et al. Resveratrol for cancer therapy: Challenges and future perspectives. *Cancer Lett.* **2021**, *515*, 63–72. [[CrossRef](#)]
57. Sinha, D.; Sarkar, N.; Biswas, J.; Bishayee, A. Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms. *Semin. Cancer Biol.* **2016**, *40–41*, 209–232. [[CrossRef](#)]
58. Gerszon, J.; Rodacka, A.; Puchała, M. Antioxidant Properties of Resveratrol and its Protective Effects in Neurodegenerative Diseases. *Adv. Cell Biol.* **2014**, *2014*, 97–117. [[CrossRef](#)]
59. Tsai, M.-J.; Lu, I.-J.; Fu, Y.-S.; Fang, Y.-P.; Huang, Y.-B.; Wu, P.-C. Nanocarriers enhance the transdermal bioavailability of resveratrol: In-vitro and in-vivo study. *Colloid. Surf. B Biointerface.* **2016**, *148*, 650–656. [[CrossRef](#)]
60. Gambini, J.; Inglés, M.; Olaso, G.; Lopez-Grueso, R.; Bonet-Costa, V.; Gimeno-Mallench, L.; Mas-Bargues, C.; Abdelaziz, K.M.; Gomez-Cabrera, M.C.; Vina, J.; et al. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, *2015*, 837042. [[CrossRef](#)]
61. Santos, A.C.; Pereira, I.; Magalhães, M.; Pereira-Silva, M.; Caldas, M.; Ferreira, L.; Figueiras, A.; Ribeiro, A.J.; Veiga, F. Targeting Cancer Via Resveratrol-Loaded Nanoparticles Administration: Focusing on In Vivo Evidence. *AAPS J.* **2019**, *21*, 57. [[CrossRef](#)]
62. Chimento, A.; De Amicis, F.; Sirianni, R.; Sinicropi, M.S.; Puoci, F.; Casaburi, I.; Saturnino, C.; Pezzi, V. Progress to Improve Oral Bioavailability and Beneficial Effects of Resveratrol. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1381. [[CrossRef](#)]
63. Wong, Y.T.; Gruber, J.; Jenner, A.M.; Ng, M.P.-E.; Ruan, R.; Tay, F.E.H. Elevation of oxidative-damage biomarkers during aging in F2 hybrid mice: Protection by chronic oral intake of resveratrol. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *46*, 799–809. [[CrossRef](#)]
64. Tung, B.T.; Rodríguez-Bies, E.; Ballesteros-Simarro, M.; Motilva, V.; Navas, P.; López-Lluch, G. Modulation of Endogenous Antioxidant Activity by Resveratrol and Exercise in Mouse Liver is Age Dependent. *J. Gerontol.-Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2013**, *69*, 398–409. [[CrossRef](#)]
65. Ryan, M.J.; Jackson, J.R.; Hao, Y.; Williamson, C.L.; Dabkowski, E.R.; Hollander, J.M.; Alway, S.E. Suppression of Oxidative Stress by Resveratrol After Isometric Contractions in Gastrocnemius Muscles of Aged Mice. *J. Gerontol.-Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2010**, *65*, 815–831. [[CrossRef](#)]
66. Csiszar, A.; Sosnowska, D.; Wang, M.; Lakatta, E.; Sonntag, W.; Ungvari, Z. Age-Associated Proinflammatory Secretory Phenotype in Vascular Smooth Muscle Cells From the Non-human Primate *Macaca mulatta*: Reversal by Resveratrol Treatment. *J. Gerontol.-Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2012**, *67*, 811–820. [[CrossRef](#)]
67. Lagouge, M.; Argmann, C.; Gerhart-Hines, Z.; Meziane, H.; Lerin, C.; Daussin, F.; Messadeq, N.; Milne, J.; Lambert, P.; Elliott, P.; et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell* **2006**, *127*, 1109–1122. [[CrossRef](#)]
68. Wang, N.; Luo, Z.; Jin, M.; Sheng, W.; Wang, H.-T.; Long, X.; Wu, Y.; Hu, P.; Xu, H.; Zhang, X. Exploration of age-related mitochondrial dysfunction and the anti-aging effects of resveratrol in zebrafish retina. *Aging* **2019**, *11*, 3117–3137. [[CrossRef](#)]
69. Ferrucci, L.; Fabbri, E. Inflammageing: Chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat. Rev. Cardiol.* **2018**, *15*, 505–522. [[CrossRef](#)]
70. Abraham, J.; Johnson, R. Consuming a Diet Supplemented with Resveratrol Reduced Infection-Related Neuroinflammation and Deficits in Working Memory in Aged Mice. *Rejuvenation Res.* **2009**, *12*, 445–453. [[CrossRef](#)]
71. Jeong, S.I.; Shin, J.A.; Cho, S.; Kim, H.W.; Lee, J.Y.; Kang, J.L.; Park, E.-M. Resveratrol attenuates peripheral and brain inflammation and reduces ischemic brain injury in aged female mice. *Neurobiol. Aging* **2016**, *44*, 74–84. [[CrossRef](#)]
72. Argüelles, S.; Guerrero-Castilla, A.; Cano, M.; Muñoz, M.F.; Ayala, A. Advantages and disadvantages of apoptosis in the aging process. *Ann. New York Acad. Sci.* **2019**, *1443*, 20–33. [[CrossRef](#)]
73. Tower, J. Programmed cell death in aging. *Ageing Res. Rev.* **2015**, *23*, 90–100. [[CrossRef](#)]
74. Zhou, Q.; Deng, Y.; Hu, X.; Xu, Y. Resveratrol ameliorates neuronal apoptosis and cognitive impairment by activating the SIRT1/RhoA pathway in rats after anesthesia with sevoflurane. *Bosn. J. Basic Med Sci.* **2022**, *22*, 110–117. [[CrossRef](#)]
75. Xiong, W.X.; Chai, Z.T.; Wang, B.; Zhou, G.X.; Cang, J.; Xue, Z.G.; Ge, S.J. Resveratrol Alleviates Learning and Memory Impairment in Aged Rats after General Anesthesia with Sevoflurane and Nitrous Oxide via SIRT1-P53 Signaling Pathway. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **2016**, *9*, 21118–21130.
76. Ginés, C.; Cuesta, S.; Kireev, R.; García, C.; Rancan, L.; Paredes, S.D.; Vara, E.; Tresguerres, J.A. Protective effect of resveratrol against inflammation, oxidative stress and apoptosis in pancreas of aged SAMP8 mice. *Exp. Gerontol.* **2017**, *90*, 61–70. [[CrossRef](#)]

77. de la Lastra, C.A.; Villegas, I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: Mechanisms and clinical implications. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1156–1160.
78. Gadacha, W.; Ben-Attia, M.; Bonnefont-Rousselot, D.; Aouani, E.; Ghanem-Boughanmi, N.; Touitou, Y. Resveratrol opposite effects on rat tissue lipoperoxidation: Pro-oxidant during day-time and antioxidant at night. *Redox Rep.* **2009**, *14*, 154–158. [[CrossRef](#)]
79. Shaito, A.; Posadino, A.M.; Younes, N.; Hasan, H.; Halabi, S.; Alhababi, D.; Al-Mohannadi, A.; Abdel-Rahman, W.M.; Eid, A.H.; Nasrallah, G.K.; et al. Potential Adverse Effects of Resveratrol: A Literature Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2084. [[CrossRef](#)]
80. Hipólito-Luengo, S.; Alcaide, A.; Ramos, M.; Cercas, E.; Vallejo, S.; Romero, A.; Talero, E.; Sánchez-Ferrer, C.F.; Motilva, V.; Peiró, C. Dual Effects of Resveratrol on Cell Death and Proliferation of Colon Cancer Cells. *Nutr. Cancer* **2017**, *69*, 1019–1027. [[CrossRef](#)]
81. Salehi, B.; Mishra, A.P.; Nigam, M.; Sener, B.; Kilic, M.; Sharifi-Rad, M.; Fokou, P.V.T.; Martins, N.; Sharifi-Rad, J. Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits. *Biomedicines* **2018**, *6*, 91. [[CrossRef](#)]
82. Koohian, F.; Shanei, A.; Shahbazi-Gahreuei, D.; Hejazi, S.H.; Moradi, M.-T. The Radioprotective Effect of Resveratrol Against Genotoxicity Induced by  $\gamma$ -Irradiation in Mice Blood Lymphocytes. *Dose-Response* **2017**, *15*, 1–6. [[CrossRef](#)]
83. Carsten, R.E.; Bachand, A.M.; Bailey, S.M.; Ullrich, R.L. Resveratrol Reduces Radiation-Induced Chromosome Aberration Frequencies in Mouse Bone Marrow Cells. *Radiat. Res.* **2008**, *169*, 633–638. [[CrossRef](#)]
84. Zhang, H.; Yan, H.; Zhou, X.; Wang, H.; Yang, Y.; Zhang, J.; Wang, H. The protective effects of Resveratrol against radiation-induced intestinal injury. *BMC Complement. Altern. Med.* **2017**, *17*, 410. [[CrossRef](#)]
85. Zhang, H.; Zhai, Z.; Wang, Y.; Zhang, J.; Wu, H.; Wang, Y.; Li, C.; Li, D.; Lu, L.; Wang, X.; et al. Resveratrol ameliorates ionizing irradiation-induced long-term hematopoietic stem cell injury in mice. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *54*, 40–50. [[CrossRef](#)]
86. Li, J.; Feng, L.; Xing, Y.; Wang, Y.; Du, L.; Xu, C.; Cao, J.; Wang, Q.; Fan, S.; Liu, Q.; et al. Radioprotective and Antioxidant Effect of Resveratrol in Hippocampus by Activating Sirt1. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 5928–5939. [[CrossRef](#)]
87. Said, R.S.; El-Demerdash, E.; Nada, A.S.; Kamal, M. Resveratrol inhibits inflammatory signaling implicated in ionizing radiation-induced premature ovarian failure through antagonistic crosstalk between silencing information regulator 1 (SIRT1) and poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1). *Biochem. Pharmacol.* **2016**, *103*, 140–150. [[CrossRef](#)]
88. Radwan, R.R.; Karam, H.M. Resveratrol attenuates intestinal injury in irradiated rats via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Environ. Toxicol.* **2020**, *35*, 223–230. [[CrossRef](#)]
89. Wang, L.; Long, L.; Wang, W.; Liang, Z. Resveratrol, a potential radiation sensitizer for glioma stem cells both in vitro and in vivo. *J. Pharmacol. Sci.* **2015**, *129*, 216–225. [[CrossRef](#)]
90. Mikami, S.; Ota, I.; Masui, T.; Uchiyama, T.; Okamoto, H.; Kimura, T.; Takasawa, S.; Kitahara, T. Resveratrol-induced REG III expression enhances chemo- and radiosensitivity in head and neck cancer in xenograft mice. *Oncol. Rep.* **2019**, *42*, 436–442. [[CrossRef](#)]
91. Chen, Y.-A.; Lien, H.-M.; Kao, M.-C.; Lo, U.-G.; Lin, L.-C.; Lin, C.-J.; Chang, S.-J.; Chen, C.-C.; Hsieh, J.-T.; Lin, H.; et al. Sensitization of Radioresistant Prostate Cancer Cells by Resveratrol Isolated from *Arachis hypogaea* Stems. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0169204. [[CrossRef](#)]
92. Renaud, S.; de Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **1992**, *339*, 1523–1526. [[CrossRef](#)]
93. Koushki, M.; Amiri-Dashatan, N.; Ahmadi, N.; Abbaszadeh, H.A.; Rezaei-Tavirani, M. Resveratrol: A miraculous natural compound for diseases treatment. *Food Sci. Nutr.* **2018**, *6*, 2473–2490. [[CrossRef](#)]
94. Zhou, D.-D.; Luo, M.; Huang, S.-Y.; Saimaiti, A.; Shang, A.; Gan, R.-Y.; Li, H.-B. Effects and Mechanisms of Resveratrol on Aging and Age-Related Diseases. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2021**, *2021*, 9932218. [[CrossRef](#)]
95. Singh, C.K.; Ndiaye, M.A.; Ahmad, N. Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Basis Dis.* **2015**, *1852*, 1178–1185. [[CrossRef](#)]
96. Li, Z.; Zhang, Z.; Ren, Y.; Wang, Y.; Fang, J.; Yue, H.; Ma, S.; Guan, F. Aging and age-related diseases: From mechanisms to therapeutic strategies. *Biogerontology* **2021**, *22*, 165–187. [[CrossRef](#)]
97. Nguyen, A.; Martinez, M.; Stamos, M.J.; Moyer, M.P.; Planutis, K.; Hope, C.; Holcombe, R.F. Results of a Phase I Pilot Clinical Trial Examining the Effect of Plant-Derived Resveratrol and Grape Powder on Wnt Pathway Target Gene Expression in Colonic Mucosa and Colon Cancer. *Cancer Manag. Res.* **2009**, *1*, 25.
98. Patel, K.R.; Brown, V.A.; Jones, D.J.; Britton, R.G.; Hemingway, D.; Miller, A.S.; West, K.P.; Booth, T.D.; Perloff, M.; Crowell, J.A.; et al. Clinical Pharmacology of Resveratrol and Its Metabolites in Colorectal Cancer Patients. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 7392–7399. [[CrossRef](#)]
99. Howells, L.M.; Berry, D.P.; Elliott, P.J.; Jacobson, E.W.; Hoffmann, E.; Hegarty, B.; Brown, K.; Steward, W.P.; Gescher, A.J. Phase I Randomized, Double-Blind Pilot Study of Micronized Resveratrol (SRT501) in Patients with Hepatic Metastases—Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics. *Cancer Prev. Res.* **2011**, *4*, 1419–1425. [[CrossRef](#)]
100. Popat, R.; Plesner, T.; Davies, F.; Cook, G.; Cook, M.; Elliott, P.; Jacobson, E.; Gumbleton, T.; Oakervee, H.; Cavenagh, J. A phase 2 study of SRT501 (resveratrol) with bortezomib for patients with relapsed and or refractory multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **2013**, *160*, 714–717. [[CrossRef](#)]
101. Bhardwaj, A.; Sethi, G.; Vadhan-Raj, S. Erratum: Resveratrol Inhibits Proliferation, Induces Apoptosis, and Overcomes Chemoresistance through down-Regulation of STAT3 and Nuclear Factor-KB-Regulated Antiapoptotic and Cell Survival Gene Products in Human Multiple Myeloma Cells (Blood (2007) 109). *Blood* **2013**, *122*, 1325–1326. [[CrossRef](#)]



102. Kjaer, T.N.; Ornstrup, M.J.; Poulsen, M.M.; Jorgensen, J.O.L.; Hougaard, D.M.; Cohen, A.S.; Neghabat, S.; Richelsen, B.; Pedersen, S.B.; Richelsen, B.; et al. Resveratrol reduces the levels of circulating androgen precursors but has no effect on, testosterone, dihydrotestosterone, PSA levels or prostate volume. A 4-month randomised trial in middle-aged men. *Prostate* **2015**, *75*, 1255–1263. [[CrossRef](#)]
103. Paller, C.J.; Rudek, M.A.; Zhou, X.C.; Wagner, W.D.; Hudson, T.S.; Anders, N.; Hammers, H.J.; Dowling, D.; King, S.; Antonarakis, E.S.; et al. A phase I study of muscadine grape skin extract in men with biochemically recurrent prostate cancer: Safety, tolerability, and dose determination. *Prostate* **2015**, *75*, 1518–1525. [[CrossRef](#)]
104. Paller, C.J.; Zhou, X.C.; Heath, E.I.; Taplin, M.-E.; Mayer, T.; Stein, M.N.; Bubley, G.J.; Pili, R.; Hudson, T.; Kakarla, R.; et al. Muscadine Grape Skin Extract (MPX) in Men with Biochemically Recurrent Prostate Cancer: A Randomized, Multicenter, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 306–315. [[CrossRef](#)]
105. Zhu, W.; Qin, W.; Zhang, K.; Rottinghaus, G.E.; Chen, Y.-C.; Kliethermes, B.; Sauter, E.R. *Trans*-Resveratrol Alters Mammary Promoter Hypermethylation in Women at Increased Risk for Breast Cancer NIH Public Access. *Nutr. Cancer* **2012**, *64*, 393–400. [[CrossRef](#)]
106. Zhu, C.W.; Grossman, H.; Neugroschl, J.; Parker, S.; Burden, A.; Luo, X.; Sano, M. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol with glucose and malate (RGM) to slow the progression of Alzheimer’s disease: A pilot study. *Alzheimer’s Dementia: Transl. Res. Clin. Interv.* **2018**, *4*, 609–616. [[CrossRef](#)]
107. Moussa, C.; Hebron, M.; Huang, X.; Ahn, J.; Rissman, R.A.; Aisen, P.S.; Turner, R.S. Resveratrol regulates neuro-inflammation and induces adaptive immunity in Alzheimer’s disease. *J. Neuroinflamm.* **2017**, *14*, 1. [[CrossRef](#)]
108. Turner, R.S.; Thomas, R.G.; Craft, S.; van Dyck, C.H.; Mintzer, J.; Reynolds, B.A.; Brewer, J.B.; Rissman, R.A.; Raman, R.; Aisen, P.S. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Resveratrol for Alzheimer Disease. *Neurology* **2015**, *85*, 1383–1391.
109. Berman, A.Y.; Motechin, R.A.; Wiesenfeld, M.Y.; Holz, M.K. The therapeutic potential of resveratrol: A review of clinical trials. *NPJ Precis. Oncol.* **2017**, *1*, 35. [[CrossRef](#)]
110. Brasnyó, P.; Molnar, G.A.; Mohás, M.; Markó, L.; Laczy, B.; Cseh, J.; Mikolás, E.; Szijártó, I.A.; Mérei, A.; Halmai, R.; et al. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br. J. Nutr.* **2011**, *106*, 383–389. [[CrossRef](#)]
111. Bhatt, J.K.; Thomas, S.; Nanjan, M.J. Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *Nutr. Res.* **2012**, *32*, 537–541. [[CrossRef](#)]
112. Thazhath, S.S.; Wu, T.; Bound, M.J.; Checklin, H.L.; Standfield, S.; Jones, K.; Horowitz, M.; Rayner, C.K. Administration of resveratrol for 5 wk has no effect on glucagon-like peptide 1 secretion, gastric emptying, or glycemic control in type 2 diabetes: A randomized controlled trial 1,2. *Am. J. Clin. Nutr.* **2016**, *103*, 66–70. [[CrossRef](#)]
113. De Ligt, M.; Bergman, M.; Fuentes, R.M.; Essers, H.; Moonen-Kornips, E.; Havekes, B.; Schrauwen-Hinderling, V.B.; Schrauwen, P. No effect of resveratrol supplementation after 6 months on insulin sensitivity in overweight adults: A randomized trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2020**, *112*, 1029–1038. [[CrossRef](#)]
114. de Ligt, M.; Bruls, Y.; Hansen, J.; Habets, M.-F.; Havekes, B.; Nascimento, E.; Moonen-Kornips, E.; Schaart, G.; Schrauwen-Hinderling, V.B.; van Lichtenbelt, W.M.; et al. Resveratrol improves ex vivo mitochondrial function but does not affect insulin sensitivity or brown adipose tissue in first degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Mol. Metab.* **2018**, *12*, 39–47. [[CrossRef](#)]
115. Rayalam, S.; Della-Fera, M.A.; Baile, C.A. Synergism between resveratrol and other phytochemicals: Implications for obesity and osteoporosis. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55*, 1177–1185. [[CrossRef](#)]
116. Milne, J.C.; Lambert, P.D.; Schenk, S.; Carney, D.P.; Smith, J.J.; Gagne, D.J.; Jin, L.; Boss, O.; Perni, R.B.; Vu, C.B.; et al. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* **2007**, *450*, 712–716. [[CrossRef](#)]
117. Bo, S.; Togliatto, G.; Gambino, R.; Ponzio, V.; Lombardo, G.; Rosato, R.; Cassader, M.; Brizzi, M.F. Impact of sirtuin-1 expression on H3K56 acetylation and oxidative stress: A double-blind randomized controlled trial with resveratrol supplementation. *Geol. Rundsch.* **2018**, *55*, 331–340. [[CrossRef](#)]
118. Barazzoni, R.; Palmisano, S.; Cappellari, G.G.; Giuricin, M.; Moretti, E.; Vinci, P.; Semolic, A.; Guarnieri, G.; Zanetti, M.; de Manzini, N. Gastric bypass-induced weight loss alters obesity-associated patterns of plasma pentraxin-3 and systemic inflammatory markers. *Surg. Obes. Relat. Dis.* **2016**, *12*, 23–32. [[CrossRef](#)]
119. Bo, S.; Ponzio, V.; Evangelista, A.; Ciccone, G.; Goitre, I.; Saba, F.; Procopio, M.; Cassader, M.; Gambino, R. Effects of 6 months of resveratrol versus placebo on pentraxin 3 in patients with type 2 diabetes mellitus: A double-blind randomized controlled trial. *Geol. Rundsch.* **2017**, *54*, 499–507. [[CrossRef](#)]
120. Goh, K.P.; Lee, H.Y.; Lau, D.P.; Supaat, W.; Chan, Y.H.; Koh, A.F.Y. Effects of Resveratrol in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus on Skeletal Muscle SIRT1 Expression and Energy Expenditure. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **2014**, *24*, 2–13. [[CrossRef](#)]
121. Fraiz, G.M.; da Conceição, A.R.; Vilela, D.L.D.S.; Rocha, D.M.U.P.; Bressan, J.; Hermsdorff, H.H.M. Can resveratrol modulate sirtuins in obesity and related diseases? A systematic review of randomized controlled trials. *Eur. J. Nutr.* **2021**, *60*, 2961–2977. [[CrossRef](#)]
122. Jeyaraman, M.M.; Al-Yousif, N.S.H.; Mann, A.S.; Dolinsky, V.W.; Rabbani, R.; Zarychanski, R.; Abou-Setta, A.M. Resveratrol for adults with type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2020**, *2020*, CD011919. [[CrossRef](#)]
123. Zordoky, B.N.M.; Robertson, I.M.; Dyck, J.R.B. Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA—Mol. Basis Dis.* **2014**, *1852*, 1155–1177. [[CrossRef](#)]
124. Christopher Glass, A.K.; Witztum, J.L. Atherosclerosis: The Road Ahead Review. *Cell* **2001**, *104*, 503–516.

125. Bo, S.; Ciccone, G.; Castiglione, A.; Gambino, R.; De Michieli, F.; Villosio, P.; Durazzo, M.; Cavallo-Perin, P.; Cassader, M. Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Resveratrol in Healthy Smokers A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Cross-Over Trial. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 1323–1331. [[CrossRef](#)]
126. Timmers, S.; Konings, E.; Bilet, L.; Houtkooper, R.H.; van de Weijer, T.; Goossens, G.H.; Hoeks, J.; van der Krieken, S.; Ryu, D.; Kersten, S.; et al. Calorie Restriction-like Effects of 30 Days of Resveratrol Supplementation on Energy Metabolism and Metabolic Profile in Obese Humans. *Cell Metab.* **2011**, *14*, 612–622. [[CrossRef](#)]
127. Tomé-Carneiro, J.; González, M.; Larrosa, M.; García-Almagro, F.J.; Avilés-Plaza, F.; Parra, S.; Yáñez-Gascón, M.J.; Ruiz-Ros, J.A.; Conesa, M.T.G.; Tomas-Barberan, F.; et al. Consumption of a grape extract supplement containing resveratrol decreases oxidized LDL and ApoB in patients undergoing primary prevention of cardiovascular disease: A triple-blind, 6-month follow-up, placebo-controlled, randomized trial. *Mol. Nutr. Food Res.* **2012**, *56*, 810–821. [[CrossRef](#)]
128. Yoshino, J.; Conte, C.; Fontana, L.; Mittendorfer, B.; Imai, S.-I.; Schechtman, K.B.; Gu, C.; Kunz, I.; Fanelli, F.R.; Patterson, B.W.; et al. Resveratrol Supplementation Does Not Improve Metabolic Function in Nonobese Women with Normal Glucose Tolerance. *Cell Metab.* **2012**, *16*, 658–664. [[CrossRef](#)]
129. Poulsen, M.M.; Vestergaard, P.F.; Clasen, B.F.; Radko, Y.; Christensen, L.P.; Stødkilde-Jørgensen, H.; Møller, N.; Jessen, N.; Pedersen, S.B.; Jørgensen, J.O.L. High-Dose Resveratrol Supplementation in Obese Men: An Investigator-Initiated, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial of Substrate Metabolism, Insulin Sensitivity, and Body Composition. *Diabetes* **2013**, *62*, 1186–1195. [[CrossRef](#)]
130. Wong, R.H.; Berry, N.M.; Coates, A.M.; Buckley, J.D.; Bryan, J.; Kunz, I.; Howe, P.R.C. Chronic resveratrol consumption improves brachial flow-mediated dilatation in healthy obese adults. *J. Hypertens.* **2013**, *31*, 1819–1827. [[CrossRef](#)]
131. Fujitaka, K.; Otani, H.; Jo, F.; Jo, H.; Nomura, E.; Iwasaki, M.; Nishikawa, M.; Iwasaka, T.; Das, D.K. Modified resveratrol Longevinex improves endothelial function in adults with metabolic syndrome receiving standard treatment. *Nutr. Res.* **2011**, *31*, 842–847. [[CrossRef](#)]
132. Haghghatdoost, F.; Hariri, M. Effect of resveratrol on lipid profile: An updated systematic review and meta-analysis on randomized clinical trials. *Pharmacol. Res.* **2018**, *129*, 141–150. [[CrossRef](#)]
133. Agarwal, B.; Campen, M.J.; Channell, M.M.; Wherry, S.J.; Varamini, B.; Davis, J.G.; Baur, J.A.; Smoliga, J.M. Resveratrol for primary prevention of atherosclerosis: Clinical trial evidence for improved gene expression in vascular endothelium. *Int. J. Cardiol.* **2013**, *166*, 246–248. [[CrossRef](#)]
134. Mortezaee, K.; Najafi, M.; Farhood, B.; Ahmadi, A.; Shabeeb, D.; Musa, A.E. Resveratrol as an Adjuvant for Normal Tissues Protection and Tumor Sensitization. *Curr. Cancer Drug Targets* **2019**, *20*, 130–145. [[CrossRef](#)]
135. Yu, H.; Jove, R. The STATs of cancer—New molecular targets come of age. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 97–105. [[CrossRef](#)]
136. Baek, S.H.; Ko, J.-H.; Lee, H.; Jung, J.; Kong, M.; Lee, J.-W.; Lee, J.; Chinnathambi, A.; Zayed, M.; Alharbi, S.A.; et al. Resveratrol inhibits STAT3 signaling pathway through the induction of SOCS-1: Role in apoptosis induction and radiosensitization in head and neck tumor cells. *Phytomedicine* **2016**, *23*, 566–577. [[CrossRef](#)]
137. Yang, Y.-P.; Chang, Y.-L.; Huang, P.-I.; Chiou, G.-Y.; Tseng, L.-M.; Chiou, S.-H.; Chen, M.-H.; Shih, Y.-H.; Chang, C.-H.; Hsu, C.-C.; et al. Resveratrol suppresses tumorigenicity and enhances radiosensitivity in primary glioblastoma tumor initiating cells by inhibiting the STAT3 axis. *J. Cell. Physiol.* **2012**, *227*, 976–993. [[CrossRef](#)]
138. Luo, H.; Wang, L.; Schulte, B.A.; Yang, A.; Tang, S.; Wang, G.Y. Resveratrol enhances ionizing radiation-induced premature senescence in lung cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2013**, *43*, 1999–2006. [[CrossRef](#)]
139. Fang, Y.; Herrick, E.J.; Nicholl, M.B. A Possible Role for Perforin and Granzyme B in Resveratrol-Enhanced Radiosensitivity of Prostate Cancer. *J. Androl.* **2012**, *33*, 752–760. [[CrossRef](#)]
140. Fang, Y.; DeMarco, V.; Nicholl, M.B. Resveratrol enhances radiation sensitivity in prostate cancer by inhibiting cell proliferation and promoting cell senescence and apoptosis. *Cancer Sci.* **2012**, *103*, 1090–1098. [[CrossRef](#)]
141. Rashid, A.; Liu, C.; Sanli, T.; Tsiani, E.; Singh, G.; Bristow, R.G.; Dayes, I.; Lukka, H.; Wright, J.; Tsakiridis, T. Resveratrol enhances prostate cancer cell response to ionizing radiation. Modulation of the AMPK, Akt and mTOR pathways. *Radiat. Oncol.* **2011**, *6*, 144. [[CrossRef](#)]
142. Scarlatti, F.; Sala, G.; Ricci, C.; Maioli, C.; Milani, F.; Minella, M.; Botturi, M.; Ghidoni, R. Resveratrol sensitization of DU145 prostate cancer cells to ionizing radiation is associated to ceramide increase. *Cancer Lett.* **2007**, *253*, 124–130. [[CrossRef](#)]
143. Hannun, Y.A. Functions of Ceramide in Coordinating Cellular Responses to Stress. *Science* **1996**, *274*, 1855–1859. [[CrossRef](#)]
144. Johnson, G.E.; Ivanov, V.N.; Hei, T.K. Radiosensitization of melanoma cells through combined inhibition of protein regulators of cell survival. *Apoptosis* **2008**, *13*, 790–802. [[CrossRef](#)]
145. Tak, J.K.; Lee, J.H.; Park, J.-W. Resveratrol and piperine enhance radiosensitivity of tumor cells. *BMB Rep.* **2012**, *45*, 242–246. [[CrossRef](#)]
146. Luo, H.; Yang, A.; Schulte, B.A.; Wargovich, M.J.; Wang, G.Y. Resveratrol Induces Premature Senescence in Lung Cancer Cells via ROS-Mediated DNA Damage. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e60065. [[CrossRef](#)]
147. Lele, W.; Lei, L.; Liting, Q. Resveratrol sensitizes A549 cells to irradiation damage via suppression of store-operated calcium entry with Orai1 and STIM1 downregulation. *Exp. Ther. Med.* **2021**, *21*, 587. [[CrossRef](#)]
148. Collins, H.E.; Zhu-Mauldin, X.; Marchase, R.B.; Chatham, J.C. STIM1/Orai1-mediated SOCE: Current perspectives and potential roles in cardiac function and pathology. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2013**, *305*, H446–H458. [[CrossRef](#)]

149. Lopez, E.; Frischauf, I.; Jardin, I.; Derler, I.; Muik, M.; Cantonero, C.; Salido, G.M.; Smani, T.; Rosado, J.; Redondo, P.C. STIM1 phosphorylation at Y316 modulates its interaction with SARAF and the activation of SOCE and ICRAC. *J. Cell Sci.* **2019**, *132*, jcs.226019. [[CrossRef](#)]
150. Bosch-Presegué, L.; Vaquero, A. The Dual Role of Sirtuins in Cancer. *Genes Cancer* **2011**, *2*, 648–662. [[CrossRef](#)]
151. Yang, Q.; Wang, B.; Zang, W.; Wang, X.; Liu, Z.; Li, W.; Jia, J. Resveratrol Inhibits the Growth of Gastric Cancer by Inducing G1 Phase Arrest and Senescence in a Sirt1-Dependent Manner. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e70627. [[CrossRef](#)]
152. Ji, K.; Sun, X.; Liu, Y.; Du, L.; Wang, Y.; He, N.; Wang, J.; Xu, C.; Liu, Q. Regulation of Apoptosis and Radiation Sensitization in Lung Cancer Cells via the Sirt1/NF- $\kappa$ B/Smac Pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *48*, 304–316. [[CrossRef](#)]
153. Voellger, B.; Waldt, N.; Rupa, R.; Kirches, E.; Melhem, O.; Ochel, H.-J.; Mawrin, C.; Firsching, R. Combined effects of resveratrol and radiation in GH3 and TtT/GF pituitary adenoma cells. *J. Neuro-Oncology* **2018**, *139*, 573–582. [[CrossRef](#)]
154. Beucken, T.V.D.; Koch, E.; Chu, K.; Rupaimoole, R.; Prickaerts, P.; Adriaens, M.; Voncken, J.W.; Harris, A.; Buffa, F.; Haider, S.; et al. Hypoxia promotes stem cell phenotypes and poor prognosis through epigenetic regulation of DICER. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5203. [[CrossRef](#)]
155. Carnero, A.; Lleonart, M. The hypoxic microenvironment: A determinant of cancer stem cell evolution. *BioEssays* **2016**, *38* (Suppl. S1), S65–S74. [[CrossRef](#)]
156. Qin, J.; Liu, Y.; Lu, Y.; Liu, M.; Li, M.; Li, J.; Wu, L. Hypoxia-inducible factor 1 alpha promotes cancer stem cells-like properties in human ovarian cancer cells by upregulating SIRT1 expression. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 10592. [[CrossRef](#)]
157. Iyer, A.K.; Singh, A.; Ganta, S.; Amiji, M.M. Role of integrated cancer nanomedicine in overcoming drug resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1784–1802. [[CrossRef](#)]
158. Spirou, S.V.; Basini, M.; Lascialfari, A.; Sangregorio, C.; Innocenti, C. Magnetic Hyperthermia and Radiation Therapy: Radiobiological Principles and Current Practice. *Nanomaterials* **2018**, *8*, 401. [[CrossRef](#)]
159. Eckert, F.; Zwirner, K.; Boeke, S.; Thorwarth, D.; Zips, D.; Huber, S.M. Rationale for Combining Radiotherapy and Immune Checkpoint Inhibition for Patients With Hypoxic Tumors. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 407. [[CrossRef](#)]
160. Khoei, S.; Shoja, M.; Mostaar, A.; Faeghi, F. Effects of resveratrol and methoxyamine on the radiosensitivity of iododeoxyuridine in U87MG glioblastoma cell line. *Exp. Biol. Med.* **2016**, *241*, 1229–1236. [[CrossRef](#)]
161. Tan, Y.; Wei, X.; Zhang, W.; Wang, X.; Wang, K.; Du, B.; Xiao, J. Resveratrol enhances the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells by downregulating E2F1. *Oncol. Rep.* **2017**, *37*, 1833–1841. [[CrossRef](#)]
162. da Costa Araldi, I.C.; Bordin, F.P.R.; Cadoná, F.C.; Barbisan, F.; Azzolin, V.F.; Teixeira, C.F.; Baumhardt, T.; da Cruz, I.B.M.; Duarte, M.M.M.F.; Bauermann, L.D.F. The in vitro radiosensitizer potential of resveratrol on MCF-7 breast cancer cells. *Chem. Biol. Interact.* **2018**, *282*, 85–92. [[CrossRef](#)]
163. Komorowska, D.; Gajewska, A.; Hikisz, P.; Bartosz, G.; Rodacka, A. Comparison of the Effects of Resveratrol and Its Derivatives on the Radiation Response of MCF-7 Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9511. [[CrossRef](#)]
164. Amini, P.; Nodooshan, S.J.; Ashrafizadeh, M.; Eftekhari, S.-M.; Aryafar, T.; Khalafi, L.; Musa, A.E.; Mahdavi, S.R.; Najafi, M.; Farhood, B. Resveratrol Induces Apoptosis and Attenuates Proliferation of MCF-7 Cells in Combination with Radiation and Hyperthermia. *Curr. Mol. Med.* **2020**, *21*, 142–150. [[CrossRef](#)]



Article

# Comparison of the Effects of Resveratrol and Its Derivatives on the Radiation Response of MCF-7 Breast Cancer Cells

Dominika Komorowska <sup>1</sup>, Agnieszka Gajewska <sup>1</sup>, Paweł Hikisz <sup>1</sup>, Grzegorz Bartosz <sup>2</sup> and Aleksandra Rodacka <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Molecular Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 141/143 Pomorska St., 90-236 Lodz, Poland; dominika.komorowska@edu.uni.lodz.pl (D.K.); agatazator@wp.pl (A.G.); pawel.hikisz@biol.uni.lodz.pl (P.H.)

<sup>2</sup> Department of Bioenergetics, Food Analysis and Microbiology, Institute of Food Technology and Nutrition, College of Natural Sciences, Rzeszow University, 4 Zelwerowicza St., 35-601 Rzeszow, Poland; grzegorz.bartosz@gmail.com

\* Correspondence: aleksandra.rodacka@biol.uni.lodz.pl; Fax: +48-426354473

**Abstract:** Radiotherapy is among the most important methods for breast cancer treatment. However, this method's effectiveness is limited by radioresistance. The aim of this study was to investigate whether the stilbene derivatives piceid, resveratrol, and piceatannol have a radiosensitising effect on breast cancer cells (MCF-7). The conducted research enabled us to determine which of the tested compounds has the greatest potential in sensitising cells to ionising radiation (IR). Among the stilbene derivatives, resveratrol significantly increased the effect of IR. Resveratrol and IR used in combination had a higher cytotoxic effect on MCF-7 cells than using piceatannol, piceid, or radiation alone. This was due to a significant decrease in the activity of antioxidant enzymes, which resulted in the accumulation of formed reactive oxygen species (ROS). The effect of resveratrol and IR enhanced the expression of apoptotic genes, such as *Bax*, *p53*, and *caspase 8*, leading to apoptosis.

**Keywords:** natural polyphenols; stilbene derivative; ionising radiation; MCF-7 cells; breast cancer; radiotherapy



**Citation:** Komorowska, D.; Gajewska, A.; Hikisz, P.; Bartosz, G.; Rodacka, A. Comparison of the Effects of Resveratrol and Its Derivatives on the Radiation Response of MCF-7 Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9511. <https://doi.org/10.3390/ijms22179511>

Academic Editors: Antonio González-Sarriás and Juan Antonio Giménez-Bastida

Received: 29 July 2021  
Accepted: 28 August 2021  
Published: 1 September 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

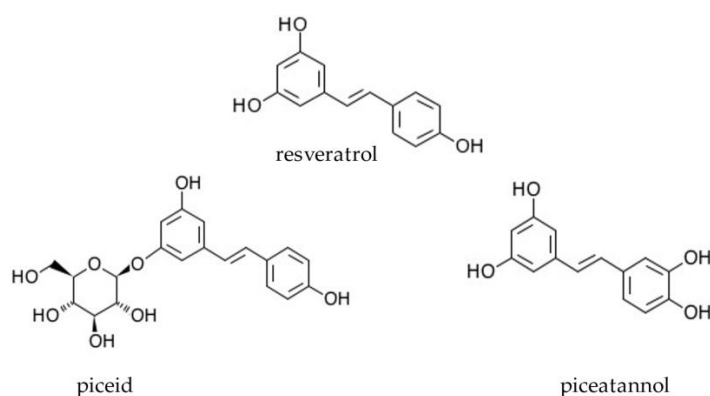
Cancer is the second most common cause of death in the world, after cardiovascular diseases. Each year, there are 18,100,000 new cancer cases in the world. Breast cancer is the most commonly diagnosed type of cancer and the leading cause of cancer-related deaths in women, with approximately 1,500,000 new cases and 400,000 deaths each year [1]. Currently, the basic methods of treatment of breast cancer include surgical tumour removal, chemotherapy, endocrine therapy and radiotherapy. Half of metastatic breast cancers respond to endocrine therapy. Postoperative adjuvant hormone therapy reduces disease relapse by approximately 50% [2]. Radiotherapy is aimed at destroying cancerous changes using ionising radiation (IR); however, in some cases, solid epithelial breast tumours are observed to be resistant to the apoptosis that is induced by IR. Despite the fact that radiotherapy has huge potency, it also poses risks for patients since normal cells are also sensitive to radiation-induced damage. Therefore, a lot of studies are aimed at developing new drugs that can protect normal cells from radiation-induced apoptosis and increase the toxic effect of IR in cancer cells [3].

In recent years, compounds of plant origin—called phytochemicals—have been the subject of many studies and have been identified as potential radiosensitisers that enhance the sensitivity of cancer cells to IR [4,5]. Many of them are also considered antitumour drugs [6,7].

The most popular polyphenol and powerful antioxidant is resveratrol (3,4,5-*trans*-trihydroxystilbene, abbreviation R) [8–10]. The highest concentrations of this compound have been observed in grapes, berries, and peanuts.



Naturally occurring analogues of resveratrol are piceatannol (3-hydroxyresveratrol, abbreviation ROH) and piceid, also known as polydatin (trans-resveratrol substituted at position 3 by a beta-D-glucosyl residue, abbreviation RG) (Figure 1). Piceid is a natural precursor and the glycoside form of resveratrol. In addition, it is the most abundant form of resveratrol in nature [11]. A number of studies have suggested that piceid may have a bioactivity that is similar to resveratrol [12,13]. Piceatannol is a resveratrol metabolite found in red wine, white tea, passion fruit, and Japanese knotweed. Studies have shown that these compounds possess many different biological properties, such as anti-inflammatory, immunoregulatory, antioxidative, and antitumour activities. The antitumour activity of stilbene derivatives is mediated mainly by the signalling pathways associated with gene expression and the induction of cell apoptosis [14,15].



**Figure 1.** Chemical structure of resveratrol and its derivatives, piceatannol and piceid.

In this study, we aimed to investigate whether resveratrol and its derivatives, piceatannol and piceid, could sensitise breast cancer cells (MCF-7) to ionising irradiation. In all experiments, cells were pretreated with the stilbene derivative for 3 h (5 or 25  $\mu\text{M}$ ) and/or with IR (doses of 2 or 6 Gy), and then the following series of assays were performed: cell viability assays (MTT assay), FITC Annexin V staining (for determination of the percentage of cells that were actively undergoing apoptosis), apoptotic gene expression assays (*p53*, *Bax*, *Bcl-2*, *caspase 3*, and *caspase 8*), Western blotting analyses and antioxidant enzyme activity assays (catalase [CAT], superoxide dismutase [SOD], and glutathione peroxidase [GPx] activity).

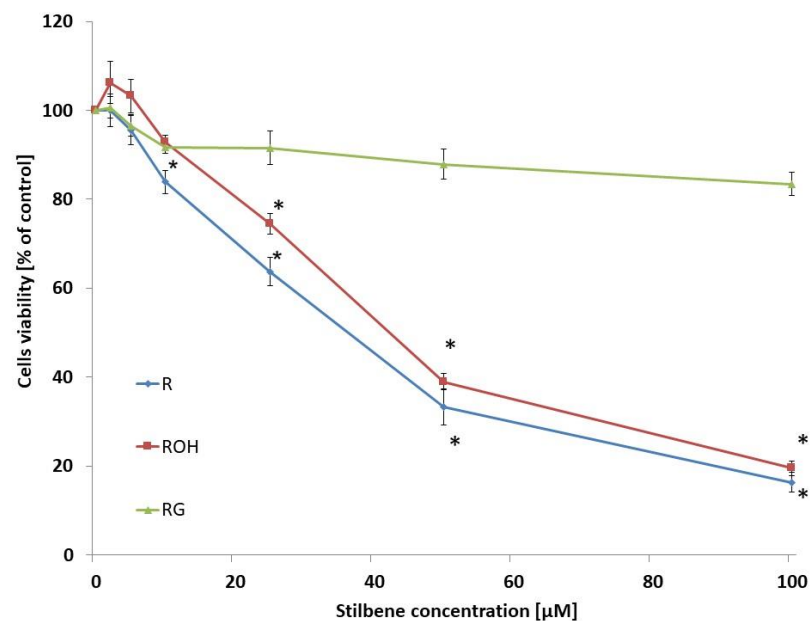
## 2. Results

### 2.1. Cell Viability

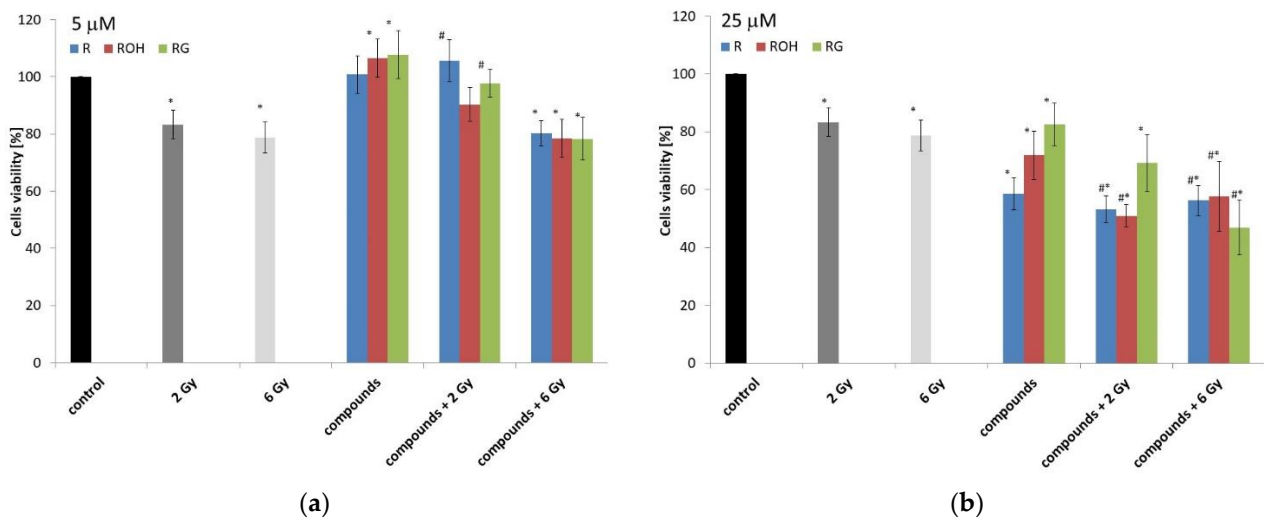
In the first stage of our study, we investigated the cytotoxic effect of the studied compounds on MCF-7 cells incubated for 48 h. These compounds were used at concentrations of 2.5–100  $\mu\text{M}$ . The control consisted of cells that were not treated with the compounds. Of the tested compounds, resveratrol was the most cytotoxic. Piceatannol showed a slightly lower cytotoxicity, whereas piceid did not significantly affect metabolic viability. Incubation of the cells with resveratrol for 48 h resulted in a statistically significant decrease in viability above a concentration of 25  $\mu\text{M}$ . Piceatannol caused a statistically significant decrease in viability above a concentration of 50  $\mu\text{M}$  (Figure 2). Piceid did not alter viability in the concentration range studied. For further studies, compounds were used at concentrations of 5 or 25  $\mu\text{M}$ .

Next, we determined the cytotoxicity of the tested compounds in combination with the action of IR in doses of 2 or 6 Gy. IR alone (at both doses used) caused a decrease in the metabolic viability of MCF-7 cells after 48 h of incubation (Figure 3a,b). There was no difference in viability depending on the dose. At doses of both 2 and 6 Gy, the decrease in viability was about 20% (Figure 3).





**Figure 2.** Effect of resveratrol (R), piceatannol (ROH), and piceid (RG) on MCF-7 viability. Cell viability was estimated with the MTT test and analysed after 48 h of treatment of the MCF-7 cells with stilbene at concentrations of 0–100 μM. The presented data are the average of five independent experiments, shown as the mean ± SD (\*  $p < 0.05$ , Student's  $t$ -test).

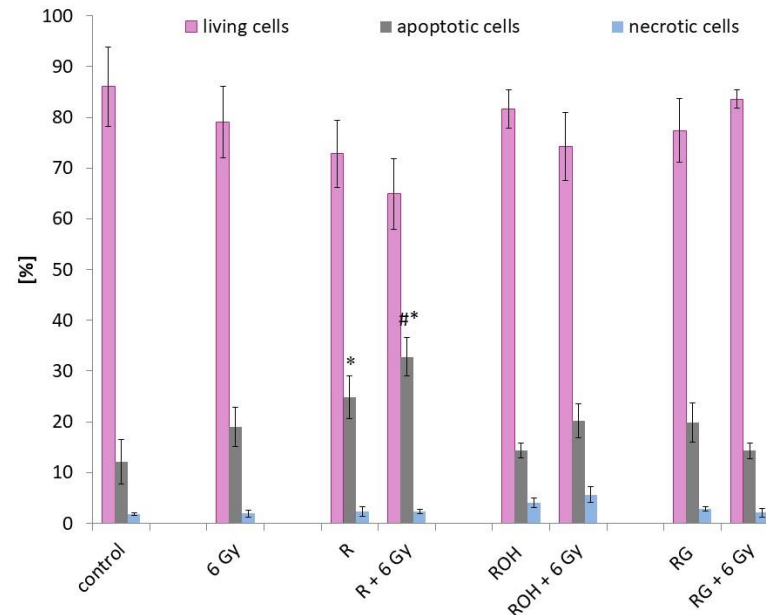


**Figure 3.** The MCF-7 cell viability under the effect of 5 (a) or 25 μM (b) of resveratrol (R), piceatannol (ROH), and piceid (RG) alone and in combination with ionising radiation (IR) (dose of 2 or 6 Gy) was determined using an MTT test after 48 h of incubation. All results are presented as the mean ± SD of three independent repetitions. Treatments were compared by a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test ( $p < 0.05$ ). The mean difference (\*) was compared with the control and (#) with IR.

Forty-eight hours after irradiation, we observed an increase in the viability of cells incubated with the tested compounds (concentration: 5 μM) compared to the control. Similarly, we observed an increase in cell viability under combination therapy (preincubation with stilbenes at a concentration of 5 μM and treated with an IR dose of 2 Gy) compared to cells treated with IR alone (Figure 3a). The use of a higher dose of 6 Gy resulted in a decrease in viability, similar to that observed for cells exposed to radiation alone. Metabolic viability significantly decreased in cells preincubated with polyphenols at a concentration of 25 μM and treated with IR at doses of 2 and 6 Gy.

## 2.2. Apoptosis

Apoptotic and necrotic changes were determined by flow cytometry using an Annexin V Apoptosis Detection Kit. Figure 4 shows the fraction of live, apoptotic, and dead cells. The study was performed on cells that were preincubated with the tested compounds at a concentration of 25  $\mu$ M and then irradiated with a dose of 6 Gy and incubated for 24 h.



**Figure 4.** Apoptosis in MCF-7 cells treated with 25  $\mu$ M of resveratrol (R), piceatannol (ROH), and piceid (RG) alone and in combination with IR (dose of 6 Gy). Annexin V and propidium iodide staining in MCF-7 cells incubated with stilbene and/or IR for 24 h. Data are shown as the mean  $\pm$  SD of three independent repetitions. Treatments were compared by a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test ( $p < 0.05$ ). The mean difference (\*) was compared with the control and (#) with IR.

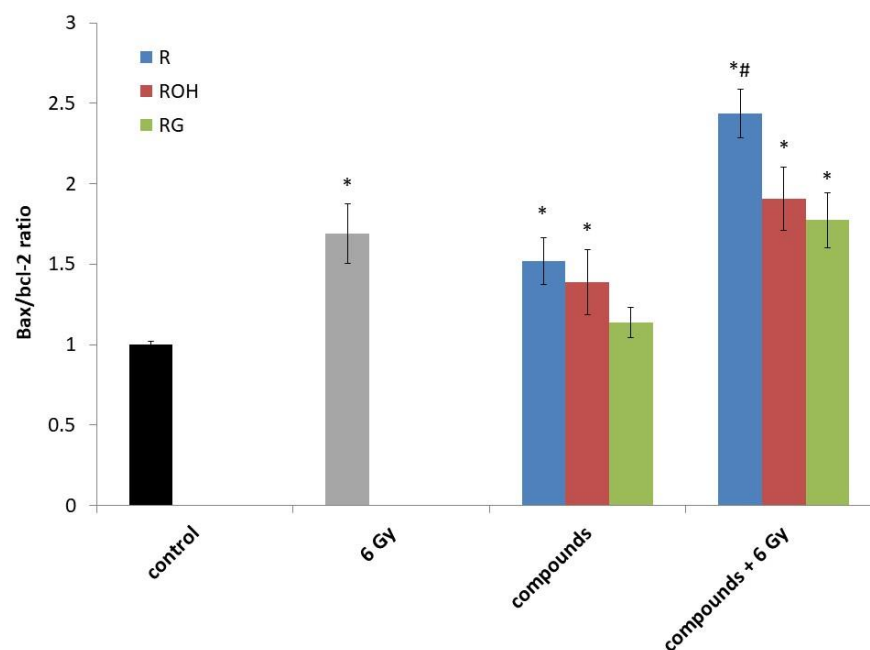
Among the tested compounds, only resveratrol significantly induced apoptosis in MCF-7 cells (about 20%) compared to the control (cells not treated with the compounds and not exposed to radiation). In cells preincubated with resveratrol and then exposed to IR, apoptosis was further induced. Apoptosis increased to about 33% (an increase of approximately 10% compared to cells treated only with resveratrol, and an increase of about 15% compared to cells treated with radiation alone). In samples preincubated with piceatannol or piceid and then subjected to radiation, no significant increase in the percentage of apoptotic cells was observed compared to the samples subjected to only radiation.

## 2.3. Apoptotic Gene Expression

In MCF-7 cells, we determined the expression of the following five genes related to the cell death process: *Bax*, *Bcl-2*, *caspase 3*, *caspase 8*, and *p53* (Table 1 and Figure 5). Gene expression was analysed by real-time PCR. Cells were incubated with the compounds at 25  $\mu$ M and irradiated with a dose of 6 Gy. Changes in the expression of the selected genes were examined after 24 h of incubation.

**Table 1.** Effect of resveratrol (R), piceatannol (ROH), and piceid (RG) at concentrations of 25  $\mu$ M, IR (dose of 6 Gy), and their combinations on the transcription of genes involved in the apoptosis of MCF-7 cells. Gene expression was normalised to the HPRT housekeeping gene. The delta–delta Ct method was used to determine the relative levels of mRNA expression between the experimental samples and controls. The mean difference (\*) was compared with the control and (#) with IR.

	Control	6 Gy	R	R + 6 Gy	ROH	ROH + 6 Gy	RG	RG + 6 Gy
<i>p53</i>	1.00 $\pm$ 0.13	1.56 $\pm$ 0.11 *	1.78 $\pm$ 0.28 *	1.97 $\pm$ 0.20 *#	1.64 $\pm$ 0.27 *	1.74 $\pm$ 0.15 *	1.27 $\pm$ 0.12 *	1.50 $\pm$ 0.19 *
<i>Caspase 3</i>	1.00 $\pm$ 0.05	1.24 $\pm$ 0.12 *	1.19 $\pm$ 0.30	1.25 $\pm$ 0.16	1.04 $\pm$ 0.16	1.28 $\pm$ 0.03 *	0.87 $\pm$ 0.10	1.26 $\pm$ 0.16
<i>Caspase 8</i>	1.00 $\pm$ 0.04	1.50 $\pm$ 0.31 *	1.41 $\pm$ 0.42 *	2.07 $\pm$ 0.11 *#	1.13 $\pm$ 0.44	2.12 $\pm$ 0.12 *#	1.73 $\pm$ 0.41 *	1.94 $\pm$ 0.03 *#
<i>Bax</i>	1.00 $\pm$ 0.03	2.73 $\pm$ 0.26 *	2.36 $\pm$ 0.27 *	5.25 $\pm$ 0.46 *#	2.17 $\pm$ 0.46 *	4.05 $\pm$ 0.53 *#	1.48 $\pm$ 0.11 *	3.19 $\pm$ 0.42 *#
<i>Bcl-2</i>	1.00 $\pm$ 0.05	1.63 $\pm$ 0.26 *	1.53 $\pm$ 0.31 *	2.18 $\pm$ 0.39 *#	1.52 $\pm$ 0.31 *	2.02 $\pm$ 0.36 *#	1.25 $\pm$ 0.28 *	1.65 $\pm$ 0.26 *



**Figure 5.** The *Bax/Bcl-2* ratio in the MCF-7 cells treated with 25  $\mu$ M of resveratrol (R), piceatannol (ROH), and piceid (RG) alone and in combination with IR (dose of 6 Gy). MCF-7 cells were incubated with stilbene and/or IR for 24 h. Data are the results of three independent repetitions. Treatments were compared by a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test ( $p < 0.05$ ). The mean difference (\*) was compared with the control and (#) with IR.

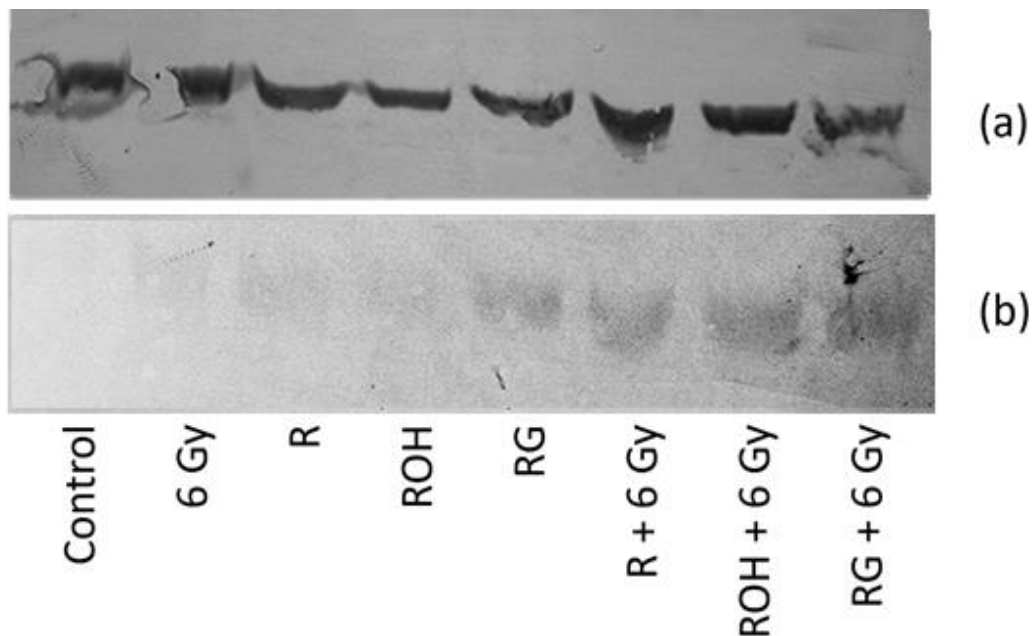
A statistically significant overexpression of *p53* was observed under all tested models—i.e., for cells exposed to radiation alone, cells treated with stilbene derivatives alone, and cells treated with the compounds and radiation. The highest expression was induced by resveratrol alone and resveratrol used in combination with radiation.

Expression of the proapoptotic *Bax* gene and the antiapoptotic *Bcl-2* gene followed the expression ratio of *Bax/Bcl-2* (Figure 5). We observed an increase in the *Bax/Bcl-2* ratio in all systems tested. The highest increase in *Bax* expression relative to *Bcl-2* was observed for resveratrol used in combination with IR. The highest level of apoptosis was also observed in this combination (Figure 4). To determine the apoptotic pathway induced by stilbene derivatives alone or in combination with IR, the expression of *caspase 3* and *caspase 8* was also measured.

In general, the increase in *caspase 3* expression in MCF-7 cells was relatively low. Among the tested derivatives, only resveratrol increased *caspase 3* expression. All compounds in combination with radiation increased *caspase 3* expression at the level of expression observed for only irradiated cells. For *caspase 8*, an increase in expression was observed in all tested systems—i.e., for cells exposed to radiation alone, cells treated with stilbene derivatives alone, and cells treated with the compounds and radiation.

#### 2.4. Western Blot Analysis

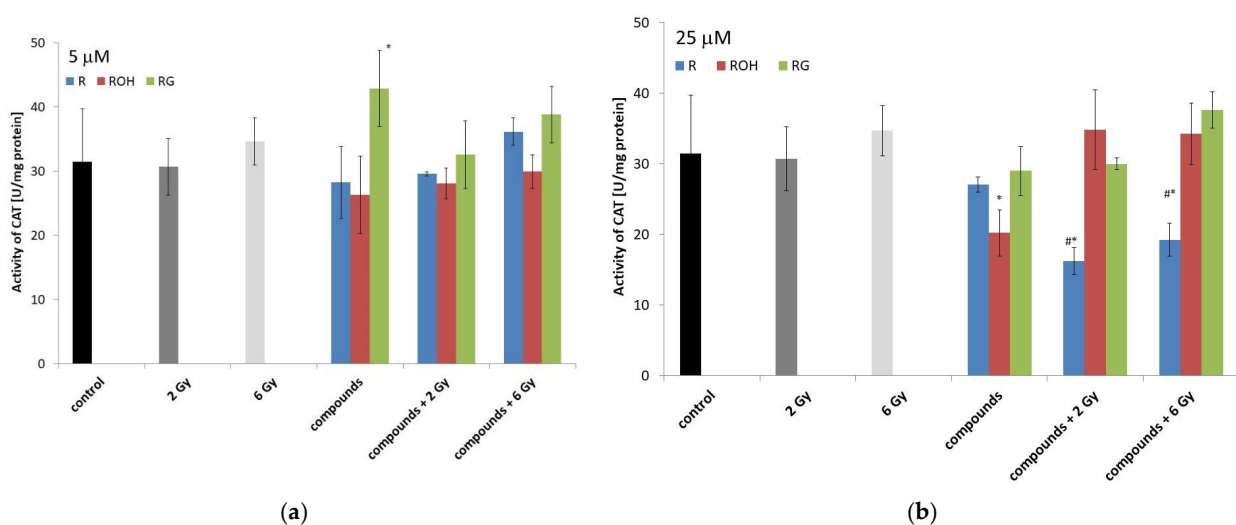
Western blot analysis confirmed the increase in caspase 8 expression in MCF-7 cells treated with the studied stilbene and irradiated together (Figure 6). We did not observe any caspase 3 expression in MCF-7 cells, which is consistent with the data in the literature [16].



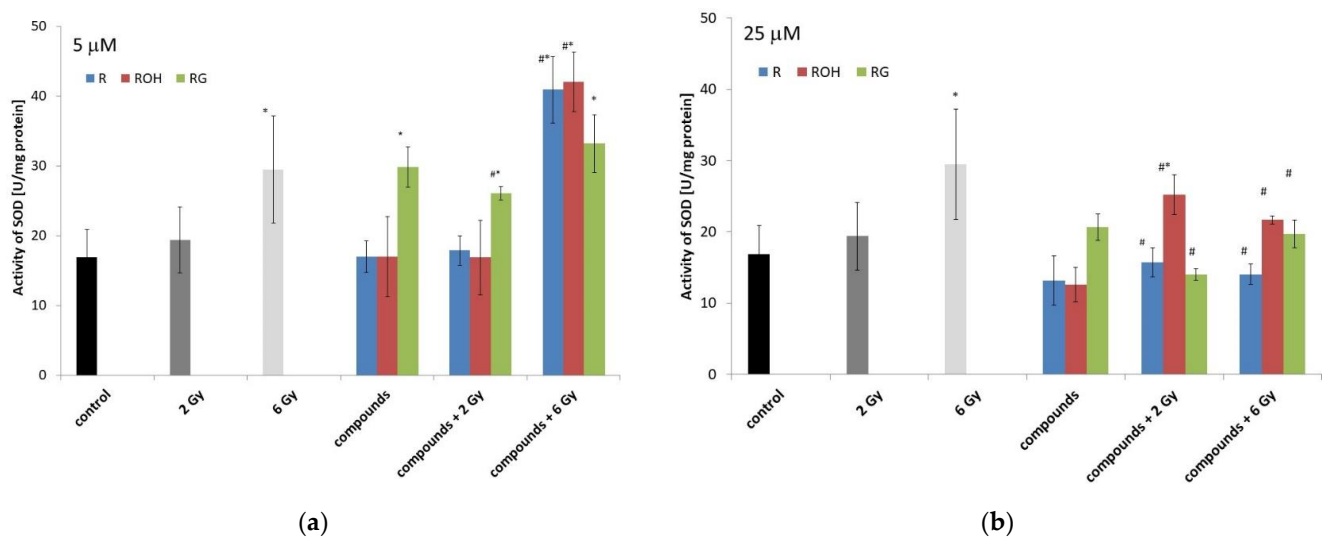
**Figure 6.** Protein levels of  $\beta$ -actin (a) and caspase 8 (b) in MCF-7 cells treated with 25  $\mu$ M of resveratrol (R), piceatannol (ROH), and piceid (RG) alone and in combination with IR (dose of 6 Gy). MCF-7 cells were incubated with stilbene and/or IR for 24 h. The lysates were resolved by SDS-PAGE and analysed via the Western blot technique; primary mouse antibodies  $\beta$ -actin (1:1000 dilution) and caspase 8 (1:500).

#### 2.5. Antioxidant Enzyme Activities

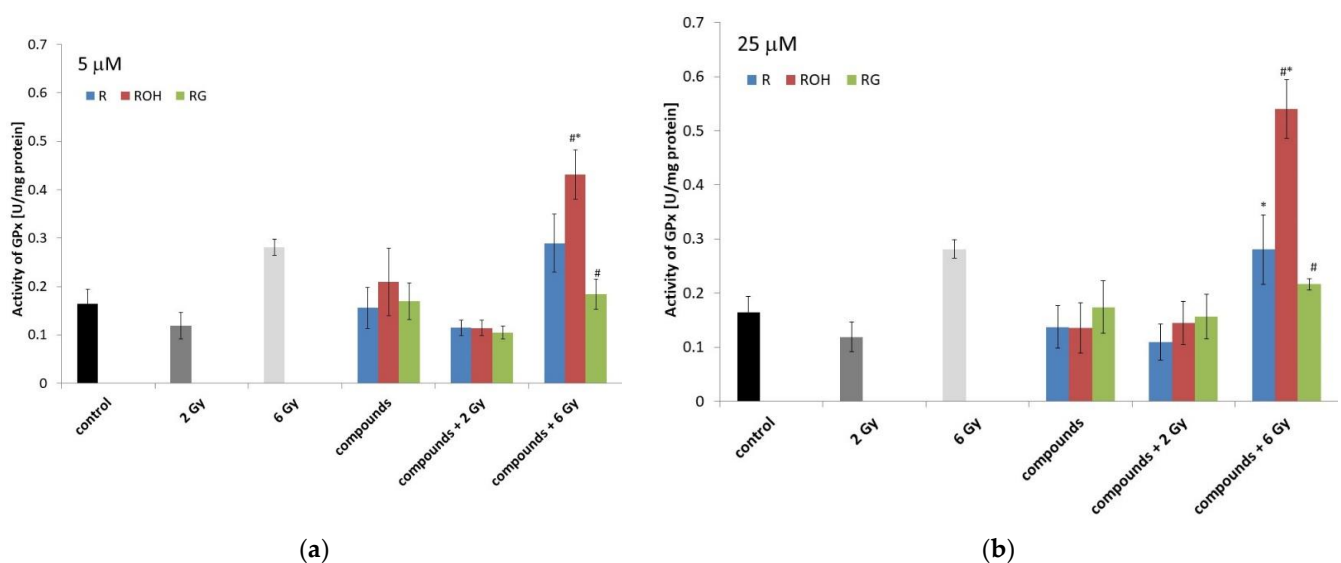
In this study, the enzymatic activity of three antioxidant enzymes, CAT, SOD, and GPx was determined (Figures 7–9).



**Figure 7.** Effect of resveratrol (R), piceatannol (ROH), piceid (RG), ionising radiation, and their combinations on the catalase (CAT) activity of MCF-7 cells. CAT activity was measured after incubation of the cells for 48 h. Cells were treated with stilbene derivatives at concentrations of 5  $\mu$ M (a) and 25  $\mu$ M (b). The presented data are the averages of three independent experiments, shown as the mean  $\pm$  SD. Treatments were compared by a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test ( $p < 0.05$ ). The mean difference (\*) was compared with the control and (#) with IR.



**Figure 8.** Effect of resveratrol (R), piceatannol (ROH), piceid (RG), ionising radiation, and their combinations on the superoxide dismutase (SOD) activity of MCF-7 cells. SOD activity was analysed after incubation of the cells for 48 h. Cells were treated with stilbene derivatives at concentrations of 5 µM (a) and 25 µM (b). All data are the average of three independent experiments, shown as the mean  $\pm$  SD (two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test,  $p < 0.05$ ). The mean difference (\*) was compared with the control and (#) with IR.



**Figure 9.** Effect of resveratrol (R), piceatannol (ROH), piceid (RG), ionising radiation, and their combinations on the glutathione peroxidase (GPx) activity of MCF-7 cells. GPx activity was measured after incubation of the cells for 48 h. Cells were treated with stilbene derivatives at concentrations of 5 µM (a) and 25 µM (b). The presented data are the average of three independent experiments, shown as the mean  $\pm$  SD (two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test,  $p < 0.05$ ). The mean difference (\*) was compared with the control and (#) with IR.

### 2.5.1. Catalase

Under the influence of radiation alone, after 48 h of incubation, we did not observe any significant changes in CAT activity (Figure 7).

Incubation of the cells for forty-eight hours with low concentrations of piceid alone significantly increased CAT activity by approximately 12% compared to the control. At a concentration of 5 µM, resveratrol and piceatannol did not change the enzyme activity (Figure 7a).

At a higher concentration of the tested compounds (25  $\mu\text{M}$ ), a significant decrease in CAT activity was observed for cells preincubated with resveratrol and then irradiated with doses of 2 and 6 Gy.

### 2.5.2. Superoxide Dismutase

With an increase in dose radiation, we observed an increase in enzyme activity compared to the control. Resveratrol and piceatannol alone at both applied concentrations did not statistically change the enzyme activity. Piceid alone at a concentration of 5  $\mu\text{M}$  produced a statistically significant increase in SOD activity.

We observed a statistically significant decrease in SOD activity in cells treated with resveratrol or piceid at a concentration of 25  $\mu\text{M}$  and then irradiated, compared to that in cells treated only with ionising radiation. A significant increase in SOD activity was observed in cells preincubated with piceid at a concentration of 5  $\mu\text{M}$  and then irradiated with a dose of 2 Gy. Application of the 6 Gy dose did not significantly affect the activity of the enzymes in cells preincubated with piceid. However, we observed an increase in enzyme activity in the cells preincubated with resveratrol or piceatannol. In most cases, the treatment of cells with 25  $\mu\text{M}$  of polyphenol followed by irradiation significantly reduced the activity of SOD.

### 2.5.3. Glutathione Peroxidases

The effect of radiation and polyphenols alone on MCF-7 cells did not significantly affect the activity of GPx (Figure 9). A significant increase in enzyme activity was also observed in cells preincubated with piceatannol (at both concentrations used) and irradiated with a dose of 6 Gy.

## 3. Discussion

Breast cancer is the most frequently detected malignancy in women and a major cause of cancer death among women worldwide [17]. Radiotherapy is among the most important methods of cancer treatment. Radiotherapy is not only considered a primary therapy but is also used alongside chemotherapy, hormone therapy, and surgery [18,19]. Nonetheless, radioresistance and side effects are limiting factors of this method for breast cancer treatment. Therefore, studying substances that can enhance the radiation effect and protect normal cells is highly relevant. Many studies have demonstrated that several bioactive food components, such as polyphenols (curcumin, genistein, and quercetin), can increase the radiosensitivity of tumour cells [20,21]. The latest studies have shown that resveratrol intensifies the radiosensitivity of breast cancer cells (MCF-7), prostate cancer cells (PC3), and nasopharyngeal carcinoma cells (CNE-1) [22–25].

The aim of this study was to investigate whether stilbene derivatives, i.e., piceid, resveratrol, and piceatannol, can affect the radiosensitising effect on breast cancer cells (MCF-7). In addition, the conducted research allowed us to determine which of the tested compounds had the greatest potential in sensitising cells to IR.

The concentrations of the tested compounds used in the present study were 5 and 25  $\mu\text{M}$ . The greatest cytotoxic effect on MCF-7 cells, assessed using an MTT test, was observed at a concentration of 25  $\mu\text{M}$ . The most cytotoxic compound was resveratrol (yielding a decrease in metabolic viability of about 41%), and the least cytotoxic was piceid (yielding a decrease of about 17%). The use of resveratrol and the other tested compounds at a concentration of 5  $\mu\text{M}$  did not significantly affect the metabolic viability, apoptosis, or activity of antioxidant enzymes in the cells treated with the compound alone or in combination with IR. In many cases, we observed a significant stimulation of MCF-7 cells (increased viability and activity of antioxidant enzymes). A concentration-dependent impact of resveratrol, piceatannol, and another small natural compounds on cancer cells was previously observed by other authors [24,26–28]. Low concentrations promoted the viability and proliferation of a variety of cancer cell lines (i.e., a procarcinogenic effect), while higher concentrations had an anticarcinogenic effect [24,26,29].



Subsequently, we determined which of the studied compounds increased the cytotoxic effect of ionising radiation on the cells. It was shown that piceid at a concentration of 25  $\mu\text{M}$  together with IR (6 Gy) can reduce metabolic viability to the greatest extent (a reduction of around 14% compared to the additive effect of piceid and IR). In the remaining cases, it was shown that the tested compounds (25  $\mu\text{M}$ ) in combination with radiation reduced the metabolic viability of MCF-7 cells to a lesser extent compared to the sum of the effects of the studied stilbenes and IR. Resveratrol in combination with radiation decreased metabolic viability to the same extent as the compound alone, without an additive effect. Rai et al. showed that radiation induces mitochondrial biogenesis and hyperactivation, leading to increased metabolic viability and MTT reduction. The extent of the radiation-induced reduction in cell numbers was found to be larger than the decrease in MTT reduction in many cell lines tested. The tetrazolium salts used in the MTT assays to measure the mitochondrial metabolic rate did not correlate with actual percentage of terminated cells [30].

We then estimated the extent to which the tested compounds, in combination with radiation, induced cell death. This evaluation was performed using the fluorimetric method with a high-sensitivity Annexin V-FITC Apoptosis Kit. We also attempted to assess the rate of apoptosis and necrosis 48 h after irradiation was performed (i.e., incubation time, after which the viability and activities of the antioxidant enzymes were assessed). However, the obtained results were unreliable. Apoptosis, which involves the activation of proteins from the BCL-2 family and depolarisation of the mitochondria, is a relatively rapid process that occurs within a few hours of the applied stimulus [31,32]. Finally, the rate of apoptosis was measured 24 h after IR exposure. Our study showed that among the selected compounds, only resveratrol statistically significantly induced apoptosis in cells treated with resveratrol alone, as well as in cells exposed to resveratrol and IR. For the remaining stilbene derivatives (piceatannol and piceid) used alone or in combination with radiation, we did not observe a statistically significant increase in the level of apoptosis compared to the control cells or the cells that were irradiated only. Our results indicate that among the studied stilbene derivatives, resveratrol has the greatest ability to strengthen the effect of IR in the MCF-7 cell line. Recently published studies by Amini et al. also showed that resveratrol potentiated the effects of radiation on MCF-7 cells [33].

Research showed that the balance between proapoptotic and antiapoptotic proteins, mitochondrial dysfunction, caspase activities, and level of reactive oxygen species (ROS) are the most important factors involved in programmed cell death in tumour cells [32,34,35]. Higher levels of ROS are observed in cancer cells compared to normal cells. Despite this, cancer cells maintain their redox balance due to their high antioxidant capacity [36]. A high level of oxidative stress is considered a novel target for anticancer therapy. This can be achieved by increasing exogenous ROS and/or inhibiting the antioxidant system [37,38].

In this work, we demonstrated that the level of apoptotic changes in MCF-7 cells treated with the studied stilbenes and IR is related to, among other factors, changes in the activities of antioxidant enzymes (catalase and superoxide dismutase). Resveratrol in combination with radiation significantly reduced CAT activity and, to a lesser extent, SOD activity. The decreased activity of these enzymes led to the accumulation of ROS in the cells exposed to radiation [37,39].

Excessive amounts of ROS may act as cellular toxicants, which can lead to cancer-cell growth arrest, apoptosis, and necrosis. It is speculated that malignant cells under increased levels of oxidative stress are more vulnerable to further ROS attacks [40]. The radiotherapy strategy is based on IR, which increases ROS generation and induces apoptotic damage in cancer cells [41].

It was observed that the tested compounds alone did not significantly change the activity of the antioxidant enzymes in MCF-7 cells. The only exception was piceid, which at a lower concentration, significantly stimulated the activity of catalase and superoxide dismutase. Our results confirm earlier reports showing that piceid enhances the endogenous antioxidant defence system, especially increasing superoxide dismutase and catalase

activities [42–45]. In this way, piceid effectively protects cells experiencing the induced overproduction of free radicals [46]. Based on this study, we determined that the antioxidant capacity of piceid is ten times stronger than that of resveratrol [44]. Additionally, in a study by Su et al. (2013), piceid exhibited higher scavenging activity than resveratrol against hydroxyl radicals [47].

In cells treated with piceatannol or piceid, the IR activity of the studied enzymes did not change significantly compared to the control. In some cases, we observed that the combination treatment of MCF-7 cells significantly enhanced the activity of the studied enzymes. For example, piceatannol significantly increased GPx activity under conditions of enhanced oxidative stress. The stimulating effect of piceatannol on the activity of GPx was also observed in an earlier work on neuroblastoma cells [48]. The effective action of antioxidant enzymes in cells protects those cells against the ROS generated by radiation.

In the irradiated cells themselves, we observed a dose-dependent increase in the activity of the studied enzymes, especially for SOD and GPx. The increased activities of antioxidant enzymes after ionising irradiation are well known. Our research confirmed that mammalian cells can generate an SOS-like response, similar to that previously described by other authors in prokaryotic cells [49,50]. The enhanced antioxidant potential of tumour cells after irradiation is connected with radioresistance [51,52].

One property of resveratrol is its inhibition of cell survival signalling, which may directly stimulate the signalling cascade of the apoptotic pathway or block the antiapoptotic mechanisms in this situation [53]. Resveratrol can sensitise cancer cells and enhance antitumour activities when it is used in combination with another therapy, such as chemotherapy or radiotherapy [15,22–25]. In our study, we showed that resveratrol alone and, to a greater extent, resveratrol in combination with IR enhance *p53* gene expression.

It has been well studied that in unstressed cells *p53* protein levels are very low because it is targeted for proteasomal degradation. This protein is activated in response to many stress stimuli, including reactive oxygen species [54,55]. The *p53* protein stimulates a wide network of signals that act through two major apoptotic pathways: extrinsic pathways and intrinsic pathways [56]. The extrinsic, death receptor pathway induces the activation of a caspase cascade, and the intrinsic, mitochondrial pathway shifts the balance in the Bcl-2 family of intracellular proteins towards the pro-apoptotic members [56]. Pro-apoptotic members of the Bcl-2 family (Bax, Bak etc.) induce the release of cytochrome c and cause mitochondrial dysfunction. In contrast, antiapoptotic members such as Bcl-2 work as protectors of the outer membrane, and preserve its integrity by suppressing the release of cytochrome c [57]. The balance of anti- (*Bcl-2*) and proapoptotic (*Bax*) genes can determine the fate of cancer cells. We next examined the effects of the stilbenes alone and in combination with IR on the gene expression of *Bax* and *Bcl-2*. The results of our analysis show that the *Bax:Bcl-2* gene expression ratio was significantly higher after treatment with a combination of resveratrol and ionising radiation compared to that in the groups treated with resveratrol or ionising radiation alone (Figure 5). Our results suggest that resveratrol and IR in combination greatly intensify apoptotic signal transmission. A lower rate of apoptosis in cells treated with resveratrol analogues, i.e., piceatannol or piceid (also in combination with IR), correlated to a lower expression of *p53* and a smaller increase in the *Bax/Bcl-2* ratio (Figure 5 and Table 1). Similar effects of resveratrol on MCF-7 cells were observed by, among others, Mirzapur et al. [35].

Previous studies showed that resveratrol in MCF-7 cells cannot affect the activities of caspase 3 and caspase 8 in the apoptosis process [58,59]. In turn, studies by Mirzapur showed that resveratrol increases the expression of both caspases 3 and 8 in MCF-7 cells [35]. In addition, some studies have shown that MCF-7 breast cells do not express caspase 3 [16,60]. Taking into account the discrepancies in the literature data in this study, we investigated the expression of two caspases, initiator caspase 8 and executive caspase 3. In our research, we observed very low expression of the caspase 3 gene only in irradiated cells in the absence or presence of polyphenols. As expected, the results of our Western blot analyses directly demonstrated the absence of caspase 3 in MCF-7 cells. The very



low gene expression of *caspase 3* in our research may be partially explained by the use of inappropriate primers that could amplify non-functional caspase 3 mRNA [61].

We and others have shown that the absence of caspase 3 did not prevent death in MCF-7 cells [62]. Wang et al. demonstrated that MCF-7 cells underwent cell death, utilising an atypical apoptosis pathway, at an insignificant, slower rate, compared to that in caspase 3-expressing MCF-7 cells, and in A431 cells, which underwent typical intracellular apoptosis [63]. Kagawa et al. evaluated the role of caspase 3 in Bax-induced apoptosis. In the research they used caspase 3-deficient MCF7 cells and clones stably transfected with the caspase 3 gene (MCF7/Casp3). The results revealed that caspase 3 is not required for Bax-mediated cell death itself. They also demonstrated that in MCF-7 cells caspase 6 can be activated even in the absence of caspase 3 [62]. Our study confirmed that a lack of caspase 3 did not impact Bax-induced apoptosis in MCF-7 cells.

Caspase 3 is crucial for apoptosis induction, as this enzyme is not only activated downstream of both the extrinsic and intrinsic death pathway but is also responsible for DNA fragmentation. Studies by other authors showed that in MCF-7 cells lacking caspase 3, apoptosis proceeds via the sequential activation of caspases 9, 7, and 6 [61,64,65]. On the basis of the temporal sequence of caspase activation in neocarzinostatin-treated MCF-7 cells, Liang et al. proposed apoptosis cascade in these cells. According to the obtained data, decreased Bcl-2 and increased Bax levels induce the release of cytochrome c from the mitochondria. Cytochrome c activates caspase 9, which in turn activates caspase 7. Activated caspase 7 activates caspase 6, which induces apoptosis in MCF-7 cells, presumably through cleavage of nuclear lamins [61].

Our study also showed that all tested stilbenes alone or in combination with IR increase the expression of caspase 8, which is a characteristic of the receptor pathway for apoptosis activation. A Western blot analysis of caspase 8 was also performed. Despite the poor quality of the blot, we decided to include the results to confirm the increase in caspase 8 expression, especially in systems where cells were exposed to both stilbene and radiation. We were unable to densitometrically assess and compare the levels of proteins in the tested systems.

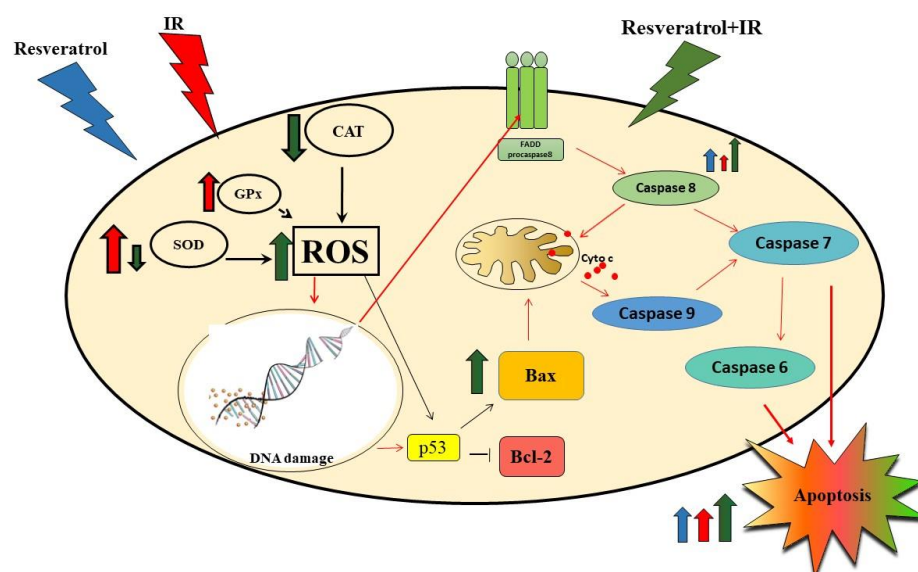
The role of caspase 8 in resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 has been confirmed by other authors [25,35]. Caspase 8 activation can induce death via direct cleavage of caspase 7, or can cleave the Bcl-2 family protein BID that can activate intrinsic apoptosis [66,67].

Our results suggest that the most likely mechanism of resveratrol- and IR-induced apoptosis in MCF-7 cells is ROS generation with the involvement of either intrinsic or extrinsic apoptotic pathways.

In conclusion, among the selected stilbene derivatives, resveratrol most significantly increased the effect of IR. Resveratrol and IR used in combination had a higher cytotoxic effect on MCF-7 cells than using piceatannol, piceid, or radiation alone. This effect was, among other factors, due to a significant decrease in the activity of antioxidant enzymes, resulting in the accumulation of formed ROS. The effects of resveratrol and IR were found to enhance the expression of apoptotic genes, such as *Bax*, *p53*, and *caspase 8*, leading to apoptosis (Figure 10).

The presented basic research helps to better understand the mechanism of action of resveratrol in breast cancer cells under the conditions of increased oxidative stress. However, these results cannot be directly translated into physiological conditions. The biological effect of resveratrol in vivo appears to be strongly limited by its low bioavailability, which is a barrier for the development of therapeutic applications. As clinical trial demonstrated, no free RSV was observed in both malignant and normal breast tissues in breast cancer patients who consumed a dietary blend of polyphenols, including RSV [68]. Orally administered resveratrol, like other polyphenols, has poor bioavailability and is converted into a wide variety of metabolites. Growing evidence highlights that mainly glucuronide and sulfate conjugates metabolites of resveratrol are the molecules that could reach systemic human tissues [69,70]. Ávila-Gálvez et al. showed, that in normal and malignant mammary tissues from breast cancer patients major metabolites of resveratrol

are resveratrol-3-O-sulfate and dihydro resveratrol-3-O-glucuronide. Among these, the percentage of sulphated was slightly lower in normal tissues (31%) than in tumour (42%). In both tissues, resveratrol metabolites showed levels in the range of the low nM [71]. In analogous study performed on rats, the concentration of resveratrol metabolites was shown to be in the low  $\mu\text{M}$  range. In this case higher proportion of RSV sulphates than glucuronides (opposite to what is observed in humans) was observed [72]. Studies have shown that conjugated metabolites are less bioactive than their free forms [68]. Despite this, Giménez-Bastida et al. demonstrated for the first time that physiologically relevant RSV metabolites can promote a moderate cellular senescence induction in breast cancer cells. They also demonstrated that these metabolites are not deconjugated to release free RSV but enter the cells through ABC transporters [68].



**Figure 10.** This image shows only the pathways of the resveratrol-induced radiosensitivity mechanism in MCF-7 cells that were investigated in this work (black arrows) or discussed on the basis of literature data (red arrows). Resveratrol potentiated the radiosensitivity in MCF-7 cells by decreasing antioxidant enzyme activity (SOD and CAT). Inhibiting SOD and CAT activity would result in increased ROS, thereby causing damage to cellular macromolecules. DNA damage leads to activation of the p53 protein. The p53 protein mainly acts as a transcription factor that induces and/or inhibits the activation of many genes associated with the induction of apoptosis. In the intrinsic pathway of apoptosis, p53 may directly activate the proapoptotic Bax protein or inhibit the antiapoptotic bcl-2 protein. The Bax protein causes the opening of mitochondrial channels and the release of cytochrome c. Cyt c, along with other proapoptotic agents, activates caspase 9, which affects the activation of executive caspases. DNA damage can also induce the extrinsic pathway of apoptosis associated with the activation of surface death receptors (FAS). The changes in the conformation of these receptors after attaching to the FADD protein lead to the activation of caspase 8, which can induce death via direct cleavage of caspase 7, or can activate intrinsic apoptosis. Thus, resveratrol enhances the process of apoptosis in MCF-7 cells that are exposed to IR.

Studies that show that metabolites of RSV are less bioactive than their free forms confirm that further studies on the effects of free resveratrol in biological systems are warranted. The well-documented biological effectiveness of resveratrol is the basis for further explore methods to optimize bioavailability in humans. Many of the strategies to increase bioavailability of resveratrol are described in detail by Amri et al. [73] and Smoliga et al. [74]. High hopes are placed on nanotechnology. Modern and intelligent nanocarriers are able to combine protection, controlled release and targeting functionalities.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Cell Line

The MCF-7 (ATCC, Manassas, VA, USA) human breast carcinoma cell line was used. The cells have the ability to process estradiol via cytoplasmic estrogen receptors. MCF-7 growth was inhibited by tumour necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ). MCF-7 were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum and antibiotics (10 U/mL penicillin and 50  $\mu$ g/mL streptomycin). The cells were incubated in 5% CO<sub>2</sub>/95% air at 37 °C. After reaching 80–90% confluence, cells were carefully removed with trypsin/EDTA and washed with fresh phosphate-buffered saline (PBS). Cell viability was determined using the trypan blue assay.

### 4.2. Chemicals and Reagents

Cell culture media, PBS, foetal bovine serum, antibiotics, and MTT were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). The Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit was obtained from Molecular Probes. The RNA isolation Kit EXTRACTME reagent was obtained from BLIRT. The RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit was obtained from Applied Thermo Scientific. 5x HOT FIREPol<sup>®</sup> EvaGreen<sup>®</sup> qPCR Supermix was from Solis Biodyne. Oligonucleotide, p53, Bax, Bcl-2, caspase 3, caspase 8, and hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) were purchased from Genomed. Antibodies specific to caspases 3, 8 and  $\beta$ -actin were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Secondary antibodies were purchased from Sigma–Aldrich.

In the experiments, three chemical compounds from the stilbenes group were used: resveratrol (3,4',5-*trans*-trihydroxystilbene, R), piceatannol (3,3',4,5'-*trans*-trihydroxystilbene, ROH)—a naturally occurring hydroxylated analogue of resveratrol—and piceid (3,4',5-*trans*-trihydroxystilbene-3-O- $\beta$ -mono-D-glucoside, RG)—the glucoside form of resveratrol. All compounds were purchased from Sigma-Aldrich Corp. or Cayman Chemical. All stilbenes were dissolved in ethanol, and the working concentrations of the tested compounds were obtained by adding a specified volume of concentrated solution to the culture medium.

### 4.3. Cytotoxicity Assays Using the MTT Test

The effect of resveratrol and its derivatives, piceatannol and piceid, on the proliferation of MCF-7 was estimated by the ability of the mitochondrial dehydrogenase of metabolically viable cells to reduce the tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to form the blue formazan product. For this purpose, cells were seeded on 96-well plates (5000 or 10,000 cells per well) and cultured for 12–24 h. After 24 h, resveratrol, piceatannol, or piceid were added at appropriate concentrations (0–100  $\mu$ M) and the incubation continued for 48 h.

For the combination of resveratrol or its derivative and IR treatment, cells were seeded into 40-mm tissue culture dishes (50,000 or 100,000 cells per dish) and cultured for 12–24 h. After this time, cells were pretreated with the indicated stilbene (at a concentration of 5 or 25  $\mu$ M) for 3 h prior to exposure to IR. Then, the cells were incubated for 48 h. In our study, we used the following doses of IR: 2 Gy and 6 Gy. These are the standard clinical X-ray doses used in radiotherapy.

Afterward, 20  $\mu$ L of MTT solution (5 mg/mL) was added to each well, or 200  $\mu$ L of MTT solution was added per dish, and the plate or dish was incubated for 2 h. After this time the medium was removed, and the formazan crystals that had formed were dissolved with 100  $\mu$ L of DMSO per well (or 1000  $\mu$ L per dish). The absorbance of the plate was read at 570 nm, with a reference wavelength of 720 nm, using a microplate reader. The absorbance value was proportional to the number of viable cells in a sample. The absorbance of the control cells was assumed to be 100%.

#### 4.4. Detection of Apoptosis and Necrosis by Flow Cytometry

Apoptotic, necrotic, and living cells were quantified by double staining with the Annexin V Apoptosis Detection Kit II, employing FITC-labelled Annexin V. Annexin V binds to cells that expose phosphatidylserine at their surface, a feature of cells that are undergoing apoptosis. Cells were seeded into 40-mm tissue culture dishes (500,000 cells per dish) and cultured for 12–24 h. The cells were preincubated with resveratrol or its derivative (at a concentration of 25  $\mu$ M) for 3 h at 37 °C and then exposed to IR (6 Gy). Cells were incubated for 24 h. Then the cells were trypsinised and suspended in DMEM. After incubation of the cells with the compounds, the cells were washed twice with cold PBS and resuspended in 1  $\times$  binding buffer, and 5  $\mu$ L of FITC-Annexin and 5  $\mu$ L of propidium iodide were added. Later, the cells were vortexed gently and incubated (15 min) in the dark, and their fluorescence was measured within 1 h. All fluorescence measurements were done in a Becton Dickinson LSR II cytometer. Cells emitting weak green (FITC-Annexin) and weak red fluorescence (propidium iodide) were counted as apoptotic.

#### 4.5. Antioxidant Enzyme Activity Assay

##### Preparation of Cell Lysates

For determination of the antioxidant enzyme activity, the cells were seeded into 40-mm tissue culture dishes at a density of 500,000 cells per dish and cultured for 12–24 h. The cells were preincubated with resveratrol and its derivatives (5 or 25  $\mu$ M) for 3 h at 37 °C and exposed to IR (2 or 6 Gy). The cells were incubated for 48 h. Next, the cells were harvested and washed twice with cold PBS. The supernatant was discarded, and the cells were resuspended in 100  $\mu$ L of protease inhibitor cocktail, which contained six broad-spectrum protease inhibitors: AEBSF, aprotinin, bestatin, E-64, leupeptin, and pepstatin A (Thermo Scientific 100  $\times$  Halt Protease Inhibitor Cocktail). The samples were frozen at  $-20$  °C.

The CAT activity was assayed by monitoring the rate of disappearance of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 240 nm [75]. One unit of CAT is the activity of catalase that catalyses the conversion of 1  $\mu$ mol of hydrogen peroxide per minute.

The GPx activity was determined spectrophotometrically at 340 nm by measuring the rate of glutathione (GSH) oxidation by t-butyl hydroperoxide (tBOOH), according to method by Rice-Evans et al. (1991) [76].

The SOD activity was based on the ability of SOD to inhibit the autoxidation of epinephrine at alkaline pH. The oxidation of epinephrine was followed in terms of the production of adrenochrome, which exhibits an absorption maximum at 480 nm [77]. One unit of SOD is described as the amount of enzyme required to cause 50% inhibition of epinephrine autoxidation per 300  $\mu$ L of assay mixture.

All enzyme activities (CAT, GPx, and SOD) were expressed as specific activities (U/mg protein). The concentration of protein was measured according to the Bradford method. The absorbances of the samples were measured at 595 nm, and bovine serum albumin was used as a standard.

#### 4.6. Gene Expression Analysis by Real-Time PCR

Total RNA was extracted by the Extractme Total RNA kit according to the manufacturer's instructions. The concentration of extracted RNA was assayed using a NanoDrop spectrophotometer. All extracted samples were stored at  $-80$  °C for further experiments. About 1  $\mu$ g of extracted RNA was reverse transcribed into cDNA with a cDNA synthesis kit (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit), according to the manufacturer's instructions. The cDNA sample was kept at  $-20$  °C until use.

The gene expressions of p53, Bcl-2, Bax, caspase 3, and caspase 8 were evaluated using the real-time PCR-based Eva Green assay. The HPRT gene was used as a housekeeping gene. Table 2 shows the sequences of primers used in the RT-PCR analysis. Real-time analysis was carried out using Eco 48 Real time PCR machine. Two microlitres of EvaGreen Supermix, 1  $\mu$ L of cDNA, and 0.2  $\mu$ L of each primer set were used for amplification in a

10 µL reaction mixture. All samples were amplified in triplicates. The cycling conditions were as follows: 12 s at 95 °C and 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 20 s.

**Table 2.** The primer sequences of genes.

Primer	Sense	Antisense
<i>HPRT</i>	ATGGACAGGACTGAACGTCTT	TCCAGCAGGTCAGCAAAGAA
<i>p53</i>	TAACAGTTCCTGCATGGGCGGC	AGGACAGGCACAAACACGCACC
<i>Bcl-2</i>	TTGTGGCCTTCTTTGAGTTCGGTG	GGTGCCGGTTCAGGTACTIONCAGTCA
<i>Bax</i>	CCTGTGCACCAAGGTGCCGGAACT	CCACCCTGGTCTTGGATCCAGCCC
<i>Caspase 3</i>	TGGACTGTGGCATTGAGAC	CAAAGCGACTGGATGAACC
<i>Caspase 8</i>	CTGGATGATGACATGAACCTGCTG	GCTCTTGTGATTTGGGCACAGAC

#### 4.7. Cell Lysate and Immunoblotting

In order to assess the expression of caspases 3, 8, and  $\beta$ -actin in MCF-7, after incubation with resveratrol, piceatannol and piceid cells were lysed (4 °C, 20 min) in a RIPA buffer containing 50 mmol/L Tris HCl pH 8, 150 mmol/L NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mmol/L EDTA, and 1 mmol/L PMSF (final concentration 10 µM). Protein concentration was determined using Lowry method [78]. After centrifugation, the supernatants were collected. Protein lysates (30 µg) were loaded to each lane, and the probes were electrophoretically separated by 8% and 12.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to Immobilon P as described by Towbin et al. (1979). Subsequently, the membranes were blocked in 5% non-fat dry milk in TBST buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween 20) for 1 h at room temperature. After blocking, the membranes were incubated overnight with antibodies specific to caspases 3 and 8 (1:500 dilution; Santa Cruz Biotechnology) and  $\beta$ -actin (1:1000 dilution; Santa Cruz Biotechnology) in TBST buffer in a cold room. After incubation with the primary antibody, the membranes were washed with TBST and incubated with appropriate secondary antibodies (1:5000 dilution; Sigma Aldrich) conjugated with alkaline phosphatase in TBST for 2 h at room temperature. After incubation, the membranes were then washed several times with TBST, and the proteins were visualised by incubation with the substrate solution (0.33 mg/mL of nitroblue tetrazolium, 0.17 mg/mL of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate in 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, and 5 mM MgCl<sub>2</sub>).

**Author Contributions:** Conceptualisation, D.K. and A.R.; Data curation, D.K.; Formal analysis, D.K. and A.G.; Funding acquisition, D.K. and A.R.; Investigation, D.K., A.G., P.H. and A.R.; Methodology, D.K., A.G. and A.R.; Project administration, A.R.; Supervision, A.R.; Writing—original draft, D.K., A.G., G.B. and A.R. Writing—review & editing, D.K., G.B. and A.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was financially supported by Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, (grant no. B191100002154.02).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All the data available is in the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rastelli, F.; Crispino, S. Factors Predictive of Responsa to hormone therapy in breast cancer. *Tumori* **2008**, *94*, 370–383. [[CrossRef](#)]



3. Nair, C.K.; Parida, D.K.; Nomura, T. Radioprotectors in radiotherapy. *J. Radiat. Res.* **2001**, *42*, 21–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Garg, A.K.; Buchholz, T.A.; Aggarwal, B.B. Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols. *Antioxid. Redox Signal.* **2005**, *7*, 1630–1647. [[CrossRef](#)]
5. Hazra, B.; Ghosh, S.; Kumar, A.; Pandey, B.N. The prospective role of plant products in radiotherapy of cancer: A current overview. *Front. Pharm.* **2012**, *2*, 94. [[CrossRef](#)]
6. Niedzwiecki, A.; Roomi, M.W.; Kalinovsky, T.; Rath, M. Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. *Nutrients* **2016**, *8*, 552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Abbaszadeh, H.; Keikhaei, B.; Mottaghi, S. A review of molecular mechanisms involved in anticancer and antiangiogenic effects of natural polyphenolic compounds. *Phytother. Res.* **2019**, *33*, 2002–2014. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Delmas, D.; Aires, V.; Limagne, E.; Dutartre, P.; Mazué, F.; Ghiringhelli, F.; Latruffe, N. Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2011**, *1215*, 48–59. [[CrossRef](#)]
9. Delmas, D.; Lançon, A.; Colin, D.; Jannin, B.; Latruffe, N. Resveratrol as a chemopreventive agent: A promising molecule for fighting cancer. *Curr. Drug Targets* **2006**, *7*, 423–442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Gerszon, J.; Rodacka, A.; Puchała, M. Antioxidant properties of resveratrol and its protective effects in neurodegenerative diseases. *Adv. Cell Biol.* **2014**, *4*, 97–117. [[CrossRef](#)]
11. Regev-Shoshani, G.; Shoseyov, O.; Bilkis, I.; Kerem, Z. Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation. *Biochem. J.* **2003**, *374*, 157–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Soleas, G.J.; Goldberg, D.M.; Grass, L.; Levesque, M.; Diamandis, E.P. Do wine polyphenols modulate p53 gene expression in human cancer cell lines? *Clin. Biochem.* **2001**, *34*, 415–420. [[CrossRef](#)]
13. Orsini, F.; Pelizzoni, F.; Verotta, L.; Aburjai, T.; Rogers, C.B. Isolation, synthesis, and antiplatelet aggregation activity of resveratrol 3-O-beta-D-glucopyranoside and related compounds. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 1082–1087. [[CrossRef](#)]
14. Fulda, S. Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of cancer. *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 757–765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Szekeres, T.; Saiko, P.; Fritzer-Szekeres, M.; Djavan, B.; Jäger, W. Chemopreventive effects of resveratrol and resveratrol derivatives. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2011**, *1215*, 89–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Janicke, R. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. *Breast Cancer Res. Treat.* **2009**, *117*, 219–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D.M.; Forman, D.; Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in globocan 2012. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, E359–E386. [[CrossRef](#)]
18. Tutt, A.; Yarnold, J. Radiobiology of breast cancer. *Clin. Oncol.* **2006**, *18*, 166–178. [[CrossRef](#)]
19. Jabbari, N.; Zarei, L.; Esmaeili Govarchin Galeh, H.; Mansori Motlagh, B. Assessment of synergistic effect of combining hyperthermia with irradiation and calcium carbonate nanoparticles on proliferation of human breast adenocarcinoma cell line (mcf-7 cells). *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2018**, *46*, 364–372. [[CrossRef](#)]
20. Malik, A.; Sultana, M.; Qazi, A.; Qazi, M.H.; Parveen, G.; Waquar, S.; Ashraf, A.B.; Rasool, M. Role of natural radiosensitizers and cancer cell radioresistance: An update. *Anal. Cell Pathol. Amst.* **2016**, *2016*, 6146595. [[CrossRef](#)]
21. Calvaruso, M.; Pucci, G.; Musso, R.; Bravatà, V.; Cammarata, F.P.; Russo, G.; Forte, G.I.; Minafra, L. Nutraceutical compounds as sensitizers for cancer treatment in radiation therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Rashid, A.; Liu, C.; Sanli, T.; Tsiani, E.; Singh, G.; Bristow, R.G.; Dayes, I.; Lukka, H.; Wright, J.; Tsakiridis, T. Resveratrol enhances prostate cancer cell response to ionizing radiation. Modulation of the AMPK, Akt and mTOR pathways. *Radiat. Oncol.* **2011**, *6*, 144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Luo, H.; Wang, L.; Schulte, B.A.; Yang, A.; Tang, S.; Wang, G.Y. Resveratrol enhances ionizing radiation-induced premature senescence in lung cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2013**, *43*, 1999–2006. [[CrossRef](#)]
24. Tan, Y.; Wei, X.; Zhang, W.; Wang, X.; Wang, K.; Du, B.; Xiao, J. Resveratrol enhances the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells by downregulating E2F1. *Oncol. Rep.* **2017**, *37*, 1833–1841. [[CrossRef](#)]
25. Da Costa Araldi, I.C.; Bordin, F.P.R.; Cadoná, F.C.; Barbisan, F.; Azzolin, V.F.; Teixeira, C.F.; Baumhardt, T.; da Cruz, I.B.M.; Duarte, M.M.M.F.; Bauermann, L.F. The in vitro radiosensitizer potential of resveratrol on MCF-7 breast cancer cells. *Chem. Biol. Interact.* **2018**, *282*, 85–92. [[CrossRef](#)]
26. Wang, X.; Ma, S.; Meng, N.; Yao, N.; Zhang, K.; Li, Q.; Zhang, Y.; Xing, Q.; Han, K.; Song, J.; et al. Resveratrol Exerts Dosage-Dependent Effects on the Self-Renewal and Neural Differentiation of hUC-MSCs. *Mol. Cells* **2016**, *39*, 418–425. [[CrossRef](#)]
27. Rajah, T.; Du, N.; Drews, N.; Cohn, R. Genistein in the presence of 17beta-estradiol inhibits proliferation of ERbeta breast cancer cells. *Pharmacology* **2009**, *84*, 68–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Vo, N.T.P.; Madlener, S.; Bago-Horvath, Z.; Herbacek, I.; Stark, N.; Gridling, M.; Probst, P.; Giessrigl, B.; Bauer, S.; Vonach, C.; et al. Pro- and anticarcinogenic mechanisms of piceatannol are activated dose dependently in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 2074–2081. [[CrossRef](#)]
29. Xiong, W.; Yin, A.; Mao, X.; Zhang, W.; Huang, H.; Zhang, X. Resveratrol suppresses human glioblastoma cell migration and invasion via activation of RhoA/ROCK signaling pathway. *Oncol. Lett.* **2016**, *11*, 484–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Rai, Y.; Pathak, R.; Kumari, N.; Sah, D.K.; Pandey, S.; Kalra, N.; Soni, R.; Dawarakanath, B.S.; Bhatt, A.N. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

31. Hantusch, A.; Rehm, M.; Brunner, T. Counting on Death—Quantitative aspects of Bcl-2 family regulation. *FEBS J.* **2018**, *285*, 4124–4138. [[CrossRef](#)]
32. Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35*, 495–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Amini, P.; Nodooshan, S.J.; Ashrafizadeh, M.; Eftekhari, S.M.; Aryafar, T.; Khalafi, L.; Musa, A.E.; Mahdavi, S.R.; Najafi, M.; Farhood, B. Resveratrol Induces Apoptosis and Attenuates Proliferation of MCF-7 Cells in Combination with Radiation and Hyperthermia. *Curr. Mol. Med.* **2021**, *21*, 142–150. [[CrossRef](#)]
34. D’Autréaux, B.; Toledano, M.B. ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 813–824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mirzapur, P.; Khazaei, M.R.; Moradi, M.T.; Khazaei, M. Apoptosis induction in human breast cancer cell lines by synergic effect of raloxifene and resveratrol through increasing proapoptotic genes. *Life Sci.* **2018**, *205*, 45–53. [[CrossRef](#)]
36. Nogueira, V.; Hay, N. Molecular pathways: Reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 4309–4314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Van Loenhout, J.; Peeters, M.; Bogaerts, A.; Smits, E.; Deben, C. Oxidative Stress-Inducing Anticancer Therapies: Taking a Closer Look at Their Immunomodulating Effects. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1188. [[CrossRef](#)]
38. Galadari, S.; Rahman, A.; Pallichankandy, S.; Thayyullathil, F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *104*, 144–164. [[CrossRef](#)]
39. Nuszkiwicz, J.; Woźniak, A.; Szewczyk-Golec, K. Ionizing Radiation as a Source of Oxidative Stress-The Protective Role of Melatonin and Vitamin D. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5804. [[CrossRef](#)]
40. Mileo, A.M.; Miccadei, S. Polyphenols as modulator of oxidative stress in cancer disease: New therapeutic strategies. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 6475624. [[CrossRef](#)]
41. Kim, W.; Lee, S.; Seo, D.; Kim, D.; Kim, K.; Kim, E.; Kang, J.; Seong, K.M.; Youn, H.; Youn, B. Cellular stress responses in radiotherapy. *Cells* **2019**, *8*, 1105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Wang, H.L.; Gao, J.P.; Han, Y.L.; Xu, X.; Wu, R.; Gao, Y.; Cui, X.-H. Comparative studies of polydatin and resveratrol on mutual transformation and antioxidative effect in vivo. *Phytomedicine* **2015**, *22*, 553–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Xu, L.Q.; Xie, Y.L.; Gui, S.H.; Zhang, X.; Mo, Z.Z.; Sun, C.Y.; Li, C.L.; Luo, D.D.; Zhang, Z.B.; Su, Z.R.; et al. Polydatin attenuates d-galactose-induced liver and brain damage through its anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects in mice. *Food Funct.* **2016**, *7*, 4545–4555. [[CrossRef](#)]
44. Ince, S.; Arslan Acaroz, D.; Neuwirth, O.; Demirel, H.H.; Denk, B.; Kucukkurt, I.; Turkmen, R. Protective effect of polydatin, a natural precursor of resveratrol, against cisplatin-induced toxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *72*, 147–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Robb, E.L.; Stuart, J.A. The stilbenes resveratrol, pterostilbene and piceid affect growth and stress resistance in mammalian cells via a mechanism requiring estrogen receptor beta and the induction of Mn-superoxide dismutase. *Phytochemistry* **2014**, *98*, 164–173. [[CrossRef](#)]
46. Arslan-Acaroz, D.; Zemheri, F.; Demirel, H.H.; Kucukkurt, I.; Ince, S.; Eryavuz, A. In vivo assessment of polydatin, a natural polyphenol compound, on arsenic-induced free radical overproduction, gene expression, and genotoxicity. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 2614–2622. [[CrossRef](#)]
47. Su, D.; Cheng, Y.; Liu, M.; Liu, D.; Cui, H.; Zhang, B.; Zhou, S.; Yang, T.; Mei, Q. Comparison of piceid and resveratrol in antioxidation and antiproliferation activities in vitro. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Gerszon, J.; Walczak, A.; Rodacka, A. Attenuation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neuronal cell damage by piceatannol. *J. Funct. Foods* **2017**, *35*, 540–548. [[CrossRef](#)]
49. Hardmeier, R.; Hoeger, H.; Fang-Kircher, S.; Khoschorur, A.; Lubec, G. Transcription and activity of antioxidant enzymes after ionizing irradiation in radiation-resistant and radiation-sensitive mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 7572–7576. [[CrossRef](#)]
50. Podlesek, Z.; Zgur Bertok, D. The DNA Damage Inducible SOS Response Is a Key Player in the Generation of Bacterial Persister Cells and Population Wide Tolerance. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1785. [[CrossRef](#)]
51. Lee, H.; Kim, D.; Jung, K.; Park, I.; Park, M.; Kim, M.; Woo, S.; Rhee, C.; Yoo, H.; Lee, S.; et al. Increased expression of antioxidant enzymes in radioresistant variant from U251 human glioblastoma cell line. *Int. J. Mol. Med.* **2004**, *13*, 883–887. [[CrossRef](#)]
52. Takada, Y.; Hachiya, M.; Park, S.H.; Osawa, Y.; Ozawa, T.; Akashi, M. Role of reactive oxygen species in cells overexpressing manganese superoxide dismutase: Mechanism for induction of radioresistance. *Mol. Cancer Res.* **2002**, *1*, 137–146.
53. Ko, J.H.; Sethi, G.; Um, J.Y.; Shanmugam, M.K.; Arfuso, F.; Kumar, A.P.; Bishayee, A.; Ahn, K.S. The role of resveratrol in cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Aubrey, B.; Kelly, G.; Janic, A.; Herold, M.J.; Strasser, A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 104–113. [[CrossRef](#)]
55. Beyfuss, K.; Hood, D.A. A systematic review of p53 regulation of oxidative stress in skeletal muscle. *Redox. Rep.* **2018**, *23*, 100–117. [[CrossRef](#)]
56. Haupt, S.; Berger, M.; Goldberg, Z.; Haupt, Y. Apoptosis—The p53 network. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 4077–4085. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Yang, J.; Liu, X.; Bhalla, K.; Kim, C.N.; Ibrado, A.M.; Cai, J.; Peng, T.I.; Jones, D.P.; Wang, X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **1997**, *275*, 1129–1132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

58. Pozo-Guisado, E.; Merino, J.M.; Mulero-Navarro, S.; Lorenzo-Benayas, M.J.; Centeno, F.; Alvarez-Barrientos, A.; Fernandez-Salguero, P.M. Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-kappaB. *Int. J. Cancer* **2005**, *115*, 74–84. [[CrossRef](#)]
59. Kumar, S.; Eroglu, E.; Stokes, J.A.; Scissum-Gunn, K.; Saldanha, S.N.; Singh, U.P.; Manne, U.; Ponnazhagan, S.; Mishra, M.K. Resveratrol induces mitochondria-mediated, caspase-independent apoptosis in murine prostate cancer cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 20895–20908. [[CrossRef](#)]
60. Janicke, R.; Sprengart, M.L.; Wati, M.R.; Porter, A.G. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 9357–9360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Liang, Y.; Yan, C.; Schor, N.F. Apoptosis in the absence of caspase 3. *Oncogene* **2001**, *20*, 6570–6578. [[CrossRef](#)]
62. Kagawa, S.; Gu, J.; Honda, T.; McDonnell, T.J.; Swisher, S.G.; Roth, J.A.; Fang, B. Deficiency of caspase-3 in MCF7 cells blocks Bax-mediated nuclear fragmentation but not cell death. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 1474–1480.
63. Wang, S.; He, M.; Li, L.; Liang, Z.; Zou, Z.; Tao, A. Cell-in-Cell Death Is Not Restricted by Caspase-3 Deficiency in MCF-7 Cells. *J. Breast Cancer* **2016**, *19*, 231–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Czemplik, M.; Mierziak, J.; Szopa, J.; Kulma, A. Flavonoid C-glucosides Derived from Flax Straw Extracts Reduce Human Breast Cancer Cell Growth In vitro and Induce Apoptosis. *Front. Pharmacol.* **2016**, *7*, 282. [[CrossRef](#)]
65. Mukherjee, A.K.; Saviola, A.J.; Burns, P.D.; Mackessy, S.P. Apoptosis induction in human breast cancer (MCF-7) cells by a novel venom L-amino acid oxidase (Rusvinoxidase) is independent of its enzymatic activity and is accompanied by caspase-7 activation and reactive oxygen species production. *Apoptosis* **2015**, *20*, 1358–1372. [[CrossRef](#)]
66. Feltham, R.; Vince, J.E.; Lawlor, K.E. Caspase-8: Not so silently deadly. *Clin. Transl. Immunol.* **2017**, *6*, e124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Tang, D.; Lahti, J.M.; Kidd, V.J. Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 9303–9307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Giménez-Bastida, J.A.; Ávila-Gálvez, M.A.; Espín, J.C.; González-Sarrías, A. Conjugated Physiological Resveratrol Metabolites Induce Senescence in Breast Cancer Cells: Role of p53/p21 and p16/Rb Pathways, and ABC Transporters. *Mol. Nutr. Food Res.* **2019**, *63*, e1900629. [[CrossRef](#)]
69. González-Sarrías, A.; Giménez-Bastida, J.A.; García-Conesa, M.T.; Gómez-Sánchez, M.B.; García-Talavera, N.V.; Gil-Izquierdo, A.; Sánchez-Alvarez, C.; Fontana-Compiano, L.O.; Morga-Egea, J.P.; Pastor-Quirante, F.A.; et al. Occurrence of urolithins, gut microbiota ellagic acid metabolites and proliferation markers expression response in the human prostate gland upon consumption of walnuts and pomegranate juice. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 311–322. [[CrossRef](#)]
70. Ávila-Gálvez, M.Á.; González-Sarrías, A.; Martínez-Díaz, F.; Abellán, B.; Martínez-Torrano, A.J.; Fernández-López, A.J.; Giménez-Bastida, J.A.; Espín, J.C. Disposition of Dietary Polyphenols in Breast Cancer Patients' Tumors, and Their Associated Anticancer Activity: The Particular Case of Curcumin. *Mol. Nutr. Food Res.* **2021**, *65*, e2100163. [[CrossRef](#)]
71. Ávila-Gálvez, M.Á.; García-Villalba, R.; Martínez-Díaz, F.; Ocaña-Castillo, B.; Monedero-Saiz, T.; Torrecillas-Sánchez, A.; Abellán, B.; González-Sarrías, A.; Espín, J.C. Metabolic Profiling of Dietary Polyphenols and Methylxanthines in Normal and Malignant Mammary Tissues from Breast Cancer Patients. *Mol. Nutr. Food Res.* **2019**, *63*, e1801239. [[CrossRef](#)]
72. Ávila-Gálvez, M.Á.; Romo-Vaquero, M.; González-Sarrías, A.; Espín, J.C. Kinetic disposition of dietary polyphenols and methylxanthines in the rat mammary tissue. *J. Funct. Foods.* **2019**, *61*, 103516. [[CrossRef](#)]
73. Amri, A.; Chaumeil, J.C.; Sfar, S.; Charrueau, C. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *J. Control. Release* **2012**, *158*, 182–193. [[CrossRef](#)]
74. Smoliga, J.M.; Blanchard, O. Enhancing the delivery of resveratrol in humans: If low bioavailability is the problem, what is the solution? *Molecules* **2014**, *19*, 17154–17172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzym.* **1984**, *105*, 121–126. [[CrossRef](#)]
76. Rice-Evans, C.A.; Diplock, A.T.; Symons, M.C. *Techniques in Free Radical Research*, 1st ed.; Elsevier Science: Amsterdam, The Netherlands, 1991.
77. Misra, H.P.; Fridovich, I. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 3170–3175. [[CrossRef](#)]
78. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275. [[CrossRef](#)]



## OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW

Mgr Dominika Komorowska

Łódź, 6.06.2023.....

Katedra Biologii Nowotworów i Epigenetyki

Uniwersytet Łódzki

### Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

**Komorowska, D.;** Radzik, T.; Kalenik, S.; Rodacka, A. Natural Radiosensitizers in Radiotherapy: Cancer Treatment by Combining Ionizing Radiation with Resveratrol. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 10627. <https://doi.org/10.3390/ijms231810627>.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na współdziałaniu przy tworzeniu koncepcji pracy, zebraniu, analizie i interpretacji zgromadzonej literatury, przygotowaniu tekstu manuskryptu, zredagowaniu pracy oraz odpowiedzi na recenzje.

Mój udział oceniam na 50%

*Komorowska Dominika*.....

Podpis

Dr n. med. Tomasz Radzik

Łódź, 29.05.2023.

MARINEX

Ul. Placowa 4, 93-446 Łódź

### Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Komorowska, D.; **Radzik, T.**; Kalenik, S.; Rodacka, A. Natural Radiosensitizers in Radiotherapy: Cancer Treatment by Combining Ionizing Radiation with Resveratrol. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 10627. <https://doi.org/10.3390/ijms231810627>.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na współudziale w przygotowaniu tekstu manuskryptu.

Mój udział oceniam na 10%.

*dr n.med Tomasz Radzik*  
Dział Nauk. Badań i Rozwoju  
Marinex International Sp. z o.o.

*Tomasz Radzik*

*Podpis*

Mgr Sebastian Kalenik

Łódź, 07.06.2023.....

Katedra Biologii Nowotworów i Epigenetyki

Uniwersytet Łódzki

### Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Komorowska, D.; Radzik, T.; **Kalenik, S.**; Rodacka, A. Natural Radiosensitizers in Radiotherapy: Cancer Treatment by Combining Ionizing Radiation with Resveratrol. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 10627. <https://doi.org/10.3390/ijms231810627>.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na współudziale przy tworzeniu tekstu manuskryptu oraz przygotowaniu grafik.

Mój udział oceniam na 10%.

.....Sebastian Kalenik.....

Podpis

Dr hab. Aleksandra Rodacka

Łódź, 07.06.2023 r.

Katedra Biologii Nowotworów i Epigenetyki

Uniwersytet Łódzki

### Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Komorowska, D.; Radzik, T.; Kalenik, S.; **Rodacka, A.** Natural Radiosensitizers in Radiotherapy: Cancer Treatment by Combining Ionizing Radiation with Resveratrol. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 10627. <https://doi.org/10.3390/ijms231810627>.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na współudziale przy tworzeniu koncepcji pracy oraz przygotowaniu tekstu manuskryptu.

Mój udział oceniam na 30%

Aleksandra Rodacka

Podpis

Mgr Dominika Komorowska

Łódź, 6.06.2023r.

Katedra Biologii Nowotworów i Epigenetyki

Uniwersytet Łódzki

### Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

**Komorowska, D.**; Gajewska, A.; Hikisz, P.; Bartosz, G.; Rodacka, A. Comparison of the Effects of Resveratrol and Its Derivatives on the Radiation Response of MCF-7 Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 9511. <https://doi.org/10.3390/ijms22179511>.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał współudziale w tworzeniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu wszystkich eksperymentów (testu MTT, oznaczeniu poziomu białek apoptotycznych metodą Western Blot, poziomu enzymów antyoksydacyjnych, ocenie ekspresji genów apoptotycznych metodą RT-PCR, ocenie poziomu apoptozy metodą cytometrii przepływowowej), opracowaniu wyników oraz ich interpretacji, wykonaniu analizy statystycznej i przedstawieniu wszystkich wyników w postaci wykresów. Ponadto współtworzyłam manuskrypt oraz odpowiedzi na recenzje.

Mój udział oceniam na 52%

*Komorowska Dominika*

Podpis

Dr Agnieszka Gajewska

Łódź, 26.05.2023r.

W czasie powstawania artykułu pracownik

Katedry Biofizyki Molekularnej

Uniwersytetu Łódzkiego

#### Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Komorowska, D.; **Gajewska, A.**; Hikisz, P.; Bartosz, G.; Rodacka, A. Comparison of the Effects of Resveratrol and Its Derivatives on the Radiation Response of MCF-7 Breast Cancer Cells. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 9511. <https://doi.org/10.3390/ijms22179511>.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na współudziale w planowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów.

Mój udział oceniam na 20%.

Gajewska

Podpis



Dr Paweł Hikisz

Łódź, ...07.06.2023...

Katedra Biologii Nowotworów i Epigenetyki

Uniwersytet Łódzki

### Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Komorowska, D.; Gajewska, A.; **Hikisz, P.**; Bartosz, G.; Rodacka, A. Comparison of the Effects of Resveratrol and Its Derivatives on the Radiation Response of MCF-7 Breast Cancer Cells. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 9511. <https://doi.org/10.3390/ijms22179511>.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na współudziale w wykonywaniu eksperymentu z wykorzystaniem metody Western Blot.

Mój udział oceniam na 5%.

Paweł Hikisz

*Podpis*



Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz

Rzeszów, dn 29. 5. 2023

Katedra Biofizyki Molekularnej (afiliacja zamieszczona w publikacji)

Uniwersytet Łódzki

### Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Komorowska, D.; Gajewska, A.; Hikisz, P.; **Bartosz, G.**; Rodacka, A. Comparison of the Effects of Resveratrol and Its Derivatives on the Radiation Response of MCF-7 Breast Cancer Cells. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 9511. <https://doi.org/10.3390/ijms22179511>.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na konsultacji naukowej oraz korekcie językowej pracy.

Mój udział oceniam na 3%.

.....

Podpis

Dr hab. Aleksandra Rodacka

Łódź, 07.06.2023r.

Katedra Biologii Nowotworów i Epigenetyki

Uniwersytet Łódzki

### Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Komorowska, D.; Gajewska, A.; Hikisz, P.; Bartosz, G.; **Rodacka, A.** Comparison of the Effects of Resveratrol and Its Derivatives on the Radiation Response of MCF-7 Breast Cancer Cells. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 9511. <https://doi.org/10.3390/ijms22179511>.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na współudziale w tworzeniu koncepcji pracy oraz pomocy merytorycznej przy pisaniu pracy i interpretacji wyników badań.

Mój udział oceniam na 20%

Aleksandra Rodacka

Podpis