

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**ANTIPROLIFERAČNÉ ÚČINKY NOVÝCH
ANALÓGOV RESVERATROLU NA
NÁDOROVÉ BUNKOVÉ LÍNIE MCF-7 A HL-60**

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Veronika Keresteš

Hradec Králové 2024

Kristína Moravová

Pod'akovanie

Moje pod'akovanie patrí všetkým, ktorí mi akýmkoľvek spôsobom pomohli pri vypracovaní diplomovej práce. V prvom rade by som chcela pod'akovať PharmDr. Anne Jirkovskej, Ph.D., za odborné vedenie pri písaní tejto diplomovej práce, ochotu, trpezlivosť a cenné rady. Moje veľké pod'akovanie patrí Mgr. Veronike Keresteš za pomoc pri práci v laboratóriu, praktické rady, ochotu a milý prístup. Taktiež by som chcela pod'akovať mojej rodine a kamarátom za nekonečnú podporu a dôveru, bez ktorej by táto práca nevznikla.

Čestné prehlásenie

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka použitá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové, dňa 15.5.2024

Podpis:

1 ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických vied

Kandidát: Kristína Moravová

Školiteľ: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Veronika Keresteš

Názov diplomovej práce: Antiproliferačné účinky nových analógov resveratrolu na nádorové bunkové línie MCF-7 a HL-60

Nádorové ochorenia predstavujú druhú najčastejšiu príčinu úmrtí na svete. S ohľadom na rôzne možnosti liečebných postupov nádorových ochorení patrí medzi základný typ liečby používanie chemoterapeutík. Najviac používané chemoterapeutiká sú antracyklíny. Antracyklíny (napr. doxorubicín, daunorubicín a epirubicín) sú klasifikované ako inhibítory topoizomerázy II. Antracyklíny predstavujú skupinu chemoterapeutík, ktorá disponuje relatívne veľkým množstvom nežiaducich účinkov. Jedným z najzávažnejších je kardiotoxicita, ktorá môže byť zmiernené použitím vhodného kardioprotektívneho liečiva. Aktuálne jediné registrované kardioprotektívum je dexrazoxan. Relatívne nedávno bolo zistené, že podstata kardioprotektívneho účinku dexrazoxanu je inhibícia topoizomerázy II.

Táto práca je súčasťou širšieho výskumu zameraného na hľadanie látok potencionálne kardioprotektívnych inhibítorov topoizomerázy II. Konkrétne v tejto práci som sa zamerala na hodnotenie antiproliferačného potenciálu novo navrhnutých analógov resveratrolu. Resveratrol, patriaci do skupiny polyfenolov, preukázal *in vitro* sľubné antiproliferačné účinky a tiež aj inhibíciu topoizomerázy II. Nové analógy resveratrolu sa líšili najmä v polohe a počte methoxylových a hydroxylových skupín. Antiproliferačný účinok bol sledovaný u dvoch bunkových línií a to MCF-7 (prsny karcinóm) a HL-60 (bunky ľudskej leukémie). Výsledky naznačujú, že nové analógy resveratrolu sú schopné inhibovať bunkovú proliferáciu.

Kľúčové slová: DNA topoizomeraza II, katalytické inhibítory, protinádorové účinky, antracyklinové antibiotiká, resveratrol

2 ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Kristína Moravová

Supervisor: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Consultant: Mgr. Veronika Keresteš

Title of diploma thesis: Antiproliferative effects of novel resveratrol analogs on cancer cell lines MCF-7 and HL-60

Cancer diseases are the second leading cause of death worldwide. The use of chemotherapeutic agents is considered a fundamental type of treatment for these diseases, with anthracyclines being used the most. Anthracyclines (including for example doxorubicin, daunorubicin, and epirubicin) are classified as topoisomerase II inhibitors. Despite their efficacy, anthracyclines are associated with a relatively large number of adverse effects. Among these, cardiotoxicity is particularly serious, albeit manageable with an appropriate cardioprotective drug. Currently, the only registered cardioprotective agent is dexrazoxane. Relatively recently, it has been reported that the mechanism underlying cardioprotective effect of dexrazoxane involves the inhibition of topoisomerase II.

This study is part of a broader research aimed at identifying potential cardioprotective topoisomerase II inhibitor compounds. Specifically, the focus of this investigation was to assess the antiproliferative potential of newly designed resveratrol analogues. Resveratrol, a member of the polyphenol group, has shown promising *in vitro* antiproliferative effects and also inhibition of topoisomerase II. The new resveratrol analogues differed mainly in the position and number of methoxy and hydroxy groups. The antiproliferative activity was observed in two cell lines, MCF-7 (breast carcinoma) and HL-60 (human leukemia cells). These results indicate that the new resveratrol analogues are capable of inhibiting cell proliferation.

Key words: DNA topoisomerase II, catalytic inhibitors, anticancer effects, anthracycline antibiotics, resveratrol

3 OBSAH

1 ABSTRAKT	4
2 ABSTRACT.....	5
3 OBSAH.....	6
4 ÚVOD.....	8
5 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	10
5.1 Antracyklíny	10
5.1.1 Mechanizmus účinku ANT	11
5.1.2 Nežiaduce účinky ANT vrátane kardiotoxicity	12
5.1.3 Kardioprotekcia	15
5.2 Topoizomeráza.....	18
5.2.1 Inhibícia topoizomerázy II a jej význam v protinádorovej terapii.....	20
5.3 Resveratrol a jeho účinky	22
6 CIEĽ PRÁCE.....	26
7 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	27
7.1 Základné vybavenie pre prácu s bunkovými líniami	27
7.2 Prístrojové vybavenie	27
7.3 Chemikálie a reagensy	28
7.4 Bunkové kultúry	32
7.4.1 Bunková línia MCF-7	33
7.4.2 Bunková línia HL-60	33
7.5 Kultivácia bunkových kultúr	33
7.6 Bunková pasáž	34
7.7 Stanovenie počtu životaschopných buniek	36
7.8 Nasadzovanie buniek pre účely experimentu	37
7.9 Ovplyvňovanie nasadených látok skúmanými látkami	38
7.9.1 Proces ovplyvnenia bunkovej kultúry MCF-7 skúmanými látkami	39
7.9.2 Proces ovplyvnenie bunkovej kultúry HL-60 skúmanými látkami	41
7.10 Stanovenie a vyhodnotenie antiproliferačného účinku skúmaných látok.....	43
8 VÝSLEDKY	46
8.1 Antiproliferačné účinky na bunkovú líniu MCF-7	46
8.1.1 Antiproliferačné účinky DNR, DOX a RES	46

8.1.2 Antiproliferačné účinky analógov MC-111, MC-151 a MC-121	48
8.1.3 Antiproliferačné účinky analógov MC-122, MC-126 a MC-130	50
8.1.4 Antiproliferačné účinky analógov MC-137, MC-136 a MC-108	52
8.1.5 Antiproliferačné účinky analógov MC-138, MC-149 a MC-150	54
8.1.6 Antiproliferačné účinky analógov MC-152 a Pinosylvinu	56
8.2 Antiproliferačné účinky na bunkovú líniu HL-60	57
8.2.1 Antiproliferačné účinky DNR, RES a analógu MC-111	57
8.2.2 Antiproliferačné účinky analógov MC-151, MC-121 a MC-122	59
8.2.3 Antiproliferačné účinky analógov MC-126, MC-130 a MC-137	61
8.2.4 Antiproliferačné účinky analógov MC-136, MC-108 a MC-138	63
8.2.5 Antiproliferačné účinky analógov MC-149, MC-150 a MC-152	65
8.2.6 Antiproliferačné účinky Pinosylvinu	67
9 DISKUSIA	68
10 ZÁVER	72
11 ZOZNAM SKRATIEK	73
12 POUŽITÁ LITERATÚRA	75

4 ÚVOD

Predkladaná diplomová práca je súčasťou dlhoročného výskumu realizovaného výskumnou skupinou molekulárnej a bunkovej toxicity na Farmaceutickej fakulte v Hradci Králové. Témou výskumu je mimo iného aj kardiovaskulárna toxicita vyvolaná vybranými liečivami, s dôrazom na antracyklínové chemoterapeutiká.

Antracyklínové chemoterapeutiká patria medzi najúčinnšie liečivá používané v protinádorovej terapii, a to aj vďaka tomu, že ich hlavným bunkovým cieľom je enzým topoizomeráza II. Topoizomeráza II je schopná modifikovať terciárnu štruktúru DNA a tým výrazne ovplyvňuje prežitie buniek. Použitie antracyklínov je však limitované významnými nežiaducimi účinkami, medzi ktoré patrí antracyklínmi navodená kardiotoxicita. Cieľom výskumnej skupiny je prispieť ku kardiovaskulárnej bezpečnosti antracyklínov pomocou kardioprotektívnych liečiv pri zachovaní ich protinádorového účinku. Činnosť skupiny je zameraná na komplexné štúdium novo pripravených, originálnych inhibítorov topoizomerázy II, ktoré sú schopné chrániť srdce pred antracyklínmi navodenou kardiotoxicitou. Dôležitá je selektívna inhibícia topoizomerázy II a konkrétne izoformy beta, ktorá môže byť kľúčová pri odstránení nežiaducich účinkov a zároveň posilnení protinádorového účinku antracyklínov. Dexrazoxan v súčasnosti predstavuje jediné klinicky používané kardioprotektívum. Z tohto dôvodu je nevyhnutné zamerať sa na hľadanie nových kardioprotektív, ktoré by mali lepšie farmakologické vlastnosti ako dexrazoxan.

Diplomová práca nadväzuje na predchádzajúce štúdie, ktoré boli zamerané na zistené antiproliferačné účinky resveratrolu. Resveratrol je prirodzene vyskytujúci sa polyfenol s množstvom pozitívnych účinkov vrátane kardioprotekcie a prevencie rakoviny. Štúdie *in vitro* preukázali pozitívny a sľubný efekt resveratrolu. Zatiaľ čo štúdie účinku resveratrolu na hlodavcoch a ľuďoch sú rozporuplné. *In vitro* štúdie taktiež potvrdili schopnosť resveratrolu inhibovať TOP II. Z tohto dôvodu sme sa zamerali na skúmanie analógov resveratrolu, ktoré boli navrhnuté a syntetizované vo výskumnej skupine doc. Roha na Katedre organickej a bioorganickej chémie (Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova). Testovanie antiproliferačných účinkov týchto zlúčenín prebiehalo *in vitro* na dvoch bunkových líniiach MCF-7 (bunky karcinómu prs) a HL-60 (ľudské leukemické bunky). Cytotoxický účinok jednotlivých zlúčenín bol hodnotený pomocou metódy MTT.

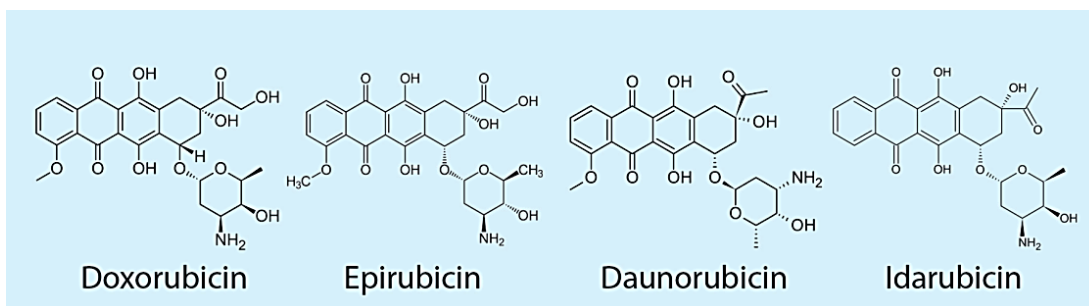
Výsledky naznačujú antiproliferačný účinok niektorých z novo syntetizovaných analógov resveratrolu, pričom silnejšiu antiproliferačnú aktivitu je možné sledovať pri bunkovej línii HL-60. Aj navzdory predkladaným výsledkom, je potrebné vykonať ďalšie štúdie *in vitro* a *in vivo* aby sa potvrdil účinok a mechanizmus pôsobenia týchto analógov predovšetkým azda je inhibícia topoizomerázy II hlavným antiproliferačným účinkom týchto látok.

5 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

5.1 Antracyklíny

Antracyklíny (ANT) patria medzi najúčinnnejšie liečivá používané v protinádorovej terapii. Doxorubicín (DOX) a daunorubicín (DNR), ako prvé antracyklíny, boli izolované v 60. rokoch 20. storočia zo *Streptomyces peucetius* (Minotti et al. 2004). Zavedenie ANT do praxe znamenalo prielom v protinádorovej liečbe, zvlášť u detí, ktoré trpeli leukémiou, kde sa prežitie zvýšilo z 58% na 83% (Lipshultz et al. 2014). Zanedlho sa však ukázalo, že klinické použitie DOX aj DNR je limitované významnými nežiaducimi účinkami. Ako závažné nežiaduce účinky je možné uviesť chronickú kardiomyopatiu, mestnavé srdcové zlyhanie, poškodenie krvotvorby alebo vývoj rezistencie u nádorových buniek. Jednou skúmanou stratégiou k obmedzeniu týchto nežiaducich účinkov ANT bolo (a stále je) tvorenie štruktúrnych obmien molekuly ANT (Minotti, et al. 2004). Nič menej, v klinickej praxi sú stále najviac používané dva pôvodné ANT a to DOX, DNR a dva ich blízke analógy epirubicín a idarubicín (Obrázok 1). Štruktúrne sú ANT planárne molekuly, ktoré pozostávajú z tetracyklického aglykonu, ktorý je viazaný na cukrovú zložku pomocou glykozidickej väzby (Marinello, Delcuratolo, and Capranico 2018). Cukor, ktorý je obsiahnutý v týchto molekulách sa označuje ako daunosamín. Jedinou odlišnosťou medzi DOX a DNR je ukončenie bočného reťazca. Zatiaľ čo DOX má ukončený bočný reťazec primárnym alkoholom, bočný reťazec DNR je ukončený metylovou skupinou (Carvalho et al. 2009). Epirubicín, stereoisomér DOX, má dlhší polčas a zároveň väčší distribučný objem než DOX. Idarubicín, derivát DNR, má vyššiu lipofilitu a lepšiu bunkovú absorpciu ako DNR (McGowan et al. 2017).

ANT sú zásadnou zložkou veľkého množstva chemoterapeutických schém aj po polstoročí od ich objavu. Klinické použitie ANT sa vzťahuje na rozličné typy nádorov, vrátane leukémie, lymfómov, karcinómu prs a sarkómov. DOX spolu s DNR sa zaraďuje medzi ANT prvej generácie. Zatiaľ čo DNR sa používa pri liečbe akútnych lymfoblastických a myeloblastických nádorov, DOX preukázal väčšiu účinnosť voči lymfómom, sarkómom a širokému spektru pevných nádorov, vrátane rakoviny prsníka, pľúc, močového mechúra, kostí a krčka maternice. Súčasťou druhej generácie ANT sú epirubicín a idarubicín, ktoré sú aktuálne najpoužívanejšie (Martins-Teixeira and Carvalho 2020).



Obrázok 1 - Chemické štruktúry klinicky najviac používaných antracyklínov – prevzaté z Marinello, Delcuratolo a Capranico (2018)

5.1.1 Mechanizmus účinku ANT

Pre účinky ANT bolo navrhnutých niekoľko mechanizmov účinku, medzi ktoré radíme tvorbu voľných radikálov; zosieťovanie DNA; interkalácia DNA s nasledujúcou inhibíciou biosyntézy makromolekúl; interferencia s následným odvinutím DNA alebo oddelením vlákien DNA; inhibícia topoizomerázy (TOP) spôsobujúca poškodenie DNA (Gewirtz 1999). Medzi najviac študované mechanizmy patrí indukcia oxidačného stresu, interkalácia DNA a inhibícia TOP II.

Prostredníctvom antrachinónového farmakoru, ktorý je súčasťou ANT, vznikajú redoxnými reakciami reaktívne formy kyslíka (ROS) (Bayles et al. 2023). Generovanie O_2 a H_2O_2 spúšťa prostredníctvom enzýmov redukčno-oxidačné cykly, ktoré produkujú reaktívne a deštruktívne hydroxylové radikály. Následkom týchto procesov je alkylácia proteínov, peroxidácia lipidov a priame poškodenie DNA, ktoré môže mať za následok spustenie bunkovej kaskády vedúcej k bunkovej smrti (Martins-Teixeira and Carvalho 2020).

Schopnosť ANT interkalovať DNA je podmienená ich planárnou štruktúrou. ANT sa viažu do malých drážok medzi jednotlivé páry báz pomocou cukrových zložiek, čím spôsobujú odtlačanie susedných báz a dochádza k zvyšovaniu torzného napätia. Torzné napätie narúša procesy závislé od DNA a vedie k zmene štruktúry a dynamiky nukleozómov. Tento proces má za následok zvýšené uvoľňovanie nukleozómov. Vypudenie nukleozómu vyvoláva kaskádu udalostí, ktoré narúšajú chromatín. Tieto následky zahŕňajú epigenomické a transkripčné zmeny a s nimi zníženú opravu dvojláknových zlomov (Mattioli et al. 2023).

TOP II bola zreteľne určená ako východiskový cieľ ANT až vďaka korelačným štúdiám zameraných na expresiu TOP II α a citlivosť ANT u rôznych nádorových buniek. V prípade absencie DNA TOP II samotný DOX nebol schopný vyvolať akékoľvek dvojvláknové zlomy DNA. DOX, ako charakteristický zástupca ANT je schopný blokovat' katalytický cyklus v dvoch rôznych štádiách. DOX o nízkej koncentrácii zamedzuje opakovanému spojeniu reťazcov DNA. Dochádza k vytvoreniu proteínových komplexov medzi TOP II a DNA tzv. štiepne komplexy, ktoré sa kovalentnou väzbou viažu na vlákna DNA. Pri vysokej koncentrácii DOX blokuje väzbu TOP II na DNA. V tomto prípade vystupuje DOX ako interkalátor (Tewey et al. 1984). Výsledkom týchto mechanizmov je inhibícia transkripcie, replikácie a vytváranie zlomov v DNA vláknach, čo môže nakoniec viesť k apoptóze. Stabilizácia štiepných komplexov, rovnako ich zvýšená koncentrácia v jadre, spôsobuje bunkovú odpoveď na tieto procesy a teda selektívnu proteolýzu za pomoci 26S proteazómu. Dochádza k degradácii TOP II α , ale vo výrazne nižšej miere ako než je degradácia TOP II β (Mao et al. 2001).

5.1.2 Nežiaduce účinky ANT vrátane kardiotoxicity

Medzi najčastejšie vyskytujúce sa nežiaduce účinky, ktoré sú spojené s používaním ANT patria gastrointestinálne poruchy, ako vracanie, nevoľnosť a stomatitída. Ďalej sledujeme u pacientov stav spojený so stratou vlasov a ochlpenia, ktorý môže prechádzať do plešatosti (Carvalho, et al. 2009). Následkom tvorby voľných radikálov dochádza k spomaleniu regenerácie hepatocytov a poškodeniu pečene. Metastatické postihnutie obličiek je taktiež pomerne časté a to v dôsledku eliminácie odpadových látok z tela (Chittipolu 2020). Pomalé hojenie rán, krvácajúce d'asná alebo zvýšená incidencia mikrobiálnej infekcie môžu mať pôvod v depresii kostnej drene. Od regeneračnej schopnosti kostnej drene a dávky liečiva závisia aj ďalšie nežiaduce účinky a to anémia, neutropénia, trombocytopenia a leukopénia. Zároveň sa môže vyskytnúť precitlivosť (zvýšená teplota, zimnica, žihľavka), zvýšená pigmentácia nechto, slzenie a konjunktivitída (Carvalho, et al. 2009). Veľké množstvo nežiaducich účinkov predstavuje limitáciu pri používaní ANT v protinádorovej terapii. Dávka liečiva, dĺžka terapie a individuálne rizikové faktory pacienta udávajú mieru výskytu nežiaducich účinkov ANT (Mattioli, et al. 2023). Vďaka klinickým štúdiám sa však podarilo

vyhodnotiť benefit voči vedľajším účinkom ANT už v počiatočných rokoch ich používania (Carvalho, et al. 2009).

ANT navodená kardiotoxicita je radená medzi najväčší limitujúci faktor v efektívnej protinádorovej terapii. Aj niekoľko rokov po ukončení liečby môžu ANT spôsobiť komorovú dysfunkciu (Shan, Lincoff, and Young 1996). Vďaka retrospektívnej analýze, vykonanej Von Hoff *et al.* na viac než 4 000 pacientoch, boli popísané klinické symptómy a prejavy mestnavého srdcového zlyhania (Zhang et al. 2012; Volkova and Russell 2011). Štúdia Von Hoff *et al.* demonštrovala fakt, že kumulatívna dávka DOX má priamy efekt na rozvoj srdcového zlyhania. Výrazný nárast frekvencie srdcového zlyhania bol pozorovaný pri kumulatívnej dávke 550 mg/m². Kumulatívna dávka, čiže súčet dávok podaných jednotlivému pacientovi je klinickým faktorom, ktorý najviac ovplyvňuje pravdepodobnosť rozvoja srdcového zlyhania. Taktiež forma podania má svoj vplyv. Pri podaní vo forme krátkodobej bolusovej infúzie bol pozorovaný najväčší výskyt kardiotoxicity, naopak pri podaní viacerých, menších dávok a pomalšej infúzie sa zníži šanca vzniku srdcového zlyhania. Závislosť vzniku poškodenia srdca na kumulatívnej dávke ANT bola potvrdená aj pri zmenách v ejekčnej frakcii ľavej komory srdca (LVEF). Výrazné zmeny boli potvrdené pri kumulatívnej dávke > 350 mg/m² (Von Hoff et al. 1979). Novšie štúdie, v ktorých na meranie LVEF bola použitá rovnovážna rádionuklidová angiografia, potvrdili výrazné riziko kardiotoxicity už pri dávke DOX (300 mg/m²), ktorá predtým bola považovaná za relatívne bezpečnú (Swain, Whaley, and Ewer 2003). Prekonanie nádorového ochorenia v detstve zvyšuje riziko zlyhania srdca 5 až 15 násobne v porovnaní s bežnou populáciou (Armenian and Bhatia 2018). Dôležité je si uvedomiť, že pre každého pacienta, ktorý plánuje liečbu ANT, existuje iná úroveň rizika. Väčšie riziko kardiotoxicity sa môže objaviť u pacientov mladších ako päť alebo starších ako šesťdesiatpäť rokov. Zároveň je riziko rozvoja kardiotoxicity vyššie u pacientov, ktorý manifestujú (alebo prekonali) kardiovaskulárne ochorenia (Cardinale, Iacopo, and Cipolla 2020; Armenian and Bhatia 2018).

ANT kardiotoxicita má variabilnú závažnosť a klasifikuje sa v závislosti na čase nástupu. Akútna kardiotoxicita sa vyskytuje už počas alebo tesne po infúzii, včasná forma sa objavuje do jedného roka po infúzii a neskorá, ktorú je možné sledovať v rozmedzí 1 až 20 rokov, po prvej expozícii ANT. Pri akútnej forme sledujeme zmeny elektrického vedenia (zmeny T vlny, ktoré sú nešpecifické a predĺženie QT intervalu) a arytmiu

(Geisberg and Sawyer 2010). Pre včasnú formu je charakteristický postupný vznik systolickej dysfunkcie ľavej komory, ktorá sa rozvíja k dilatačnej kardiomyopatii a chronickej srdcovej nedostatočnosti. Neskorá forma, bola pozorovaná u ľudí, ktorý prežili nádorové ochorenie v detstve. V súčasnosti je známe, že ANT toxicita sa prejavuje aj niekoľko rokov po ukončení liečby. Chronická kardiotoxicita vyvolaná ANT sa vyznačuje značnou interindividuálnou variabilitou. U niektorých pacientov sa môže prejaviť už pri terapeutických kumulatívnych dávkach, naopak u iných pacientov bolo pozorované, že aj značne vysoké kumulatívne dávky nespôsobili významné kardiálne problémy. Z predchádzajúcich informácií vyplýva, že na chronickej kardiotoxicite má pomerne veľký podiel genetická zložka (Stěrba et al. 2013).

Základným cieľom pre onkológov a kardiológov je včasná identifikácia kardiotoxického rizika u pacientov. Použitie endomyokardiálnej biopsie, ako techniky na odhalenie ANT kardiotoxicity, je v súčasnosti problematické z dôvodu invazívnosti tejto techniky. Momentálne odporúčanie zahŕňa používanie novších, neinvazívnych a finančne menej náročných diagnostických postupov na skorú diagnostiku pacientov, u ktorých je väčšie riziko kardiotoxicity. V klinickej praxi sa bežne používa hodnotenie LVEF pomocou echokardiografie alebo rádionuklidovej ventrikulografie (Horacek et al. 2014). Ďalej sa používajú selektívne biochemické markery, ktoré patria medzi včasné prístupy odhaľovania kardiotoxicity. Zvýšenie troponínu I a zároveň detekcia natriuretických peptidov (N-terminálnych pro-B-typu natriuretického peptidu (NT-proBNP)) značia včasné poškodenie myokardu (Sawaya et al. 2011; Leerink et al. 2019). Avšak použitie neinvazívnej techniky jednoduchých biochemických markerov nenahrádza hodnotenie echokardiografiou a jeho aplikáciu treba pred použitím dôkladne zvážiť (Horacek, et al. 2014).

Mechanizmus, ktorý je základom ANT spôsobenej kardiálnej toxicity bol predmetom mnohých štúdií už od prvých klinických použití. Aj v súčasnosti stále prebieha mnoho výskumov so snahou objasniť presný priebeh kardiotoxicity spôsobenej ANT. Medzi hlavné príčiny, ktoré súvisia s poškodením srdcového svalu bol tradične radený oxidačný stres. Oxidačný stres vzniká pri porušení rovnováhy v rámci reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a antioxidantmi. Ukázalo sa, že množstvo ROS má súvislosť s množstvom patologických zmien (Qiu, Jiang, and Huang 2023). Hypotéza ROS a železa zdôrazňuje najmä škodlivý účinok labilného bunkového železa. V prítomnosti ANT môže

tento katalicky aktívny kov značne zvýšiť produkciu ROS a presmerovať redoxné dráhy k tvorbe mimoriadne reaktívnych a toxických hydroxylových radikálov (Jirkovský et al. 2021).

TOP II predstavuje najpravdepodobnejšiu príčinu vzniku ANT kardiotoxicity. Inhibícia TOP II β , ktorá vykazuje svoju aktivitu v pokojových neproliferujúcich bunkách zahrňujúcich kardiomyocyty, sa preukazuje ako kľúčový mediátor podieľajúci sa na vzniku kardiotoxicity. Pôsobením TOP II β v kardiomyocytoch vznikajú dvojvláknové zlomy DNA a prostredníctvom proteínu p53 je aktivovaná apoptická dráha, ktorá vedie k bunkovej smrti srdcových buniek (Henriksen 2018).

Ďalšími diskutovanými mechanizmami kardiotoxicity spôsobenej ANT je napríklad zníženie transkripcie srdcovo špecifických myocelulárnych proteínov vrátane myozínu ťažkého reťazca (MHC) a aktínu (Boucek et al. 1999); narušenie homeostatických mechanizmov regulujúcich vápnik v bunkách a mitochondriách (Solem, Henry, and Wallace 1994); naviazanie antracyklínov na mitochondriálnu DNA (mtDNA) a jej následné poškodenie (Lebrecht et al. 2005). Okrem spomenutých mechanizmov existuje rada ďalších dodatočných a alternatívnych hypotéz. Navrhnutých bolo mnoho mechanizmov ako narušenie produkcie oxidu dusného; štiepenie titínu, proteínu srdcového svalstva, prostredníctvom kalpainu; zvýšenie produkcie endotelínu-1 alebo dysregulácia autonómneho nervového systému (Stěrba et al. 2011).

5.1.3 Kardioprotekcia

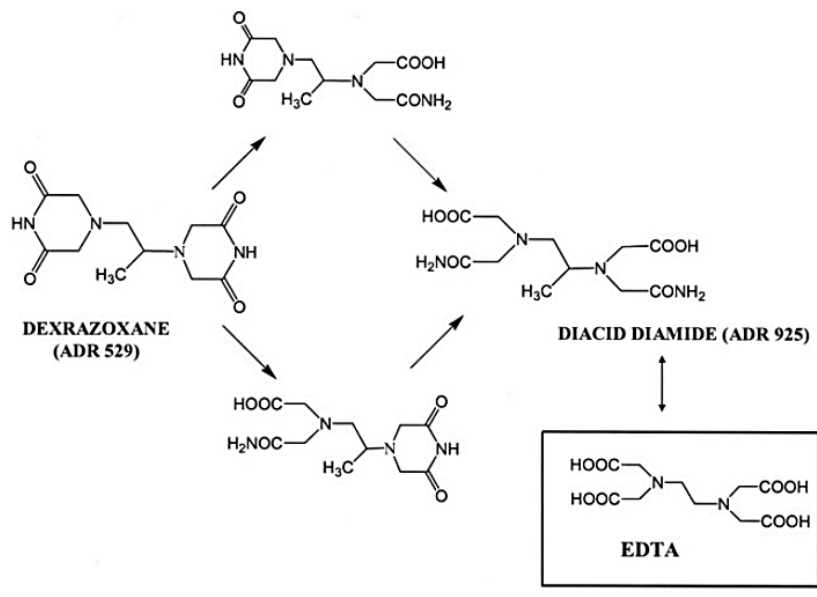
Stratégia kardioprotekcie voči ANT kardiotoxicite v súčasnosti spočíva primárne v obmedzení kumulatívnej dávky ANT a používaní kardioprotektívnych látok. Za primárnu prevenciu ANT kardiotoxicity môžeme označiť iba použitie dexrazoxanu, ktorý je schopný obmedziť jej príčinu a je takto aj registrovaný (European Medicines Agency 2017). Ostatné liečivá, ktoré boli v klinických štúdiách skúmané ako potencionálne kardioprotektívne a bol u nich preukázaný efekt boli inhibítori angiotenzínu a vybrané β -blokátory (karvedilol), ktoré zaručili najväčší kardioprotektívny prínos. V jednej z najrozsiahljších randomizovaných klinických štúdií CECCY (Carvedilol Effect in preventing Chemotherapy-induced Cardiotoxicity) bolo preukázané, že súčasné podávanie karvedilolu znížilo ANT vyvolanú kardiotoxicitu

(Sawicki et al. 2021). Štúdia Apeka *et al.* potvrdila prínos spironolaktónu u pacientov so srdcovým zlyhaním triedy I a II (Alizadehasl et al. 2021).

Kardioprotektívum dexrazoxan (ICFR-187) zo skupiny bis-dioxopiperazínov patrí medzi (+) enantiomer racemickej zmesi razoxanu (ICFR-159) (Andoh 1998). Dexrazoxan (DEX) predstavuje vo vode rozpustnú zlúčeninu, ktorá bola pôvodne skúmaná ako protinádorové liečivo. Štruktúra DEX je podobná kyseline etyléndiamíntetraoctovej (EDTA) (Weiss, Loyevsky, and Gordeuk 1999). Konkrétne pri jeho hydrolýze dochádza k vzniku zlúčeniny podobnej EDTA, ktorá je rovnako ako EDTA silným chelátorom železa (Hasinoff et al. 1998).

Štúdie vykonané na zvieracích modeloch potvrdili kardioprotektívny účinok DEX pri súčasnom podávaní s ANT chemoterapeutikami (Herman et al. 1988). Kombinácia DEX a DOX umožnila u zvierat lepšiu toleranciu vyšších kumulatívnych dávok DOX. Zároveň bolo pozorované zlepšenie prežitia s minimálnym negatívnym dopadom na funkčné zmeny srdcového tkaniva (Herman et al. 1985). Randomizovaná štúdia, vykonaná na 92 ženách, ktoré trpeli pokročilým štádiom prsného karcinómu ukázala významný kardioprotektívny účinok DEX a zároveň neovplyvnila chemoterapeutický účinok DOX. U pacientov liečených DEX bolo potvrdené signifikantne nižšie riziko mestnavého srdcového zlyhania a lepšia zachovaná LVEF v porovnaní s pacientmi užívajúcimi placebo (Speyer et al. 1988). Ochranný efekt DEX pred poškodením srdca bol preukázaný aj v randomizovanej dvojito zaslepenej štúdií vykonanej u detí a dospelých, ktorý trpeli rôznymi formami nádorového bujenia (Hensley et al. 2009).

Mechanizmus kardioprotektívneho účinku DEX bol na začiatku prisudzovaný jeho schopnosti chelatovať železo a tým brániť oxidačnému poškodeniu srdca. Hydrolýzou DEX vzniká analóg EDTA (ADR-925), ktorý má schopnosť chelatovať železo (Obrázok 2) (Hasinoff and Herman 2007). Teória chelatácie železa bola zanedlho spochybnená a vyvrátená ako hlavný mechanizmus kardioprotekcie. Mechanizmus kardioprotektívneho účinku DEX bol pripísaný katalytickej inhibícii TOP II, kde DEX vystupuje ako najsilnejší inhibítor TOP II. Aj napriek tomu, sa teória chelatácie železa stále často cituje ako hlavný mechanizmus kardioprotekcie DEX. Aktuálne výsledky získané štúdiom DEX a jeho analógov identifikujú TOP II β ako hlavný cieľ kardioprotektívnej aktivity (Jirkovská et al. 2021).

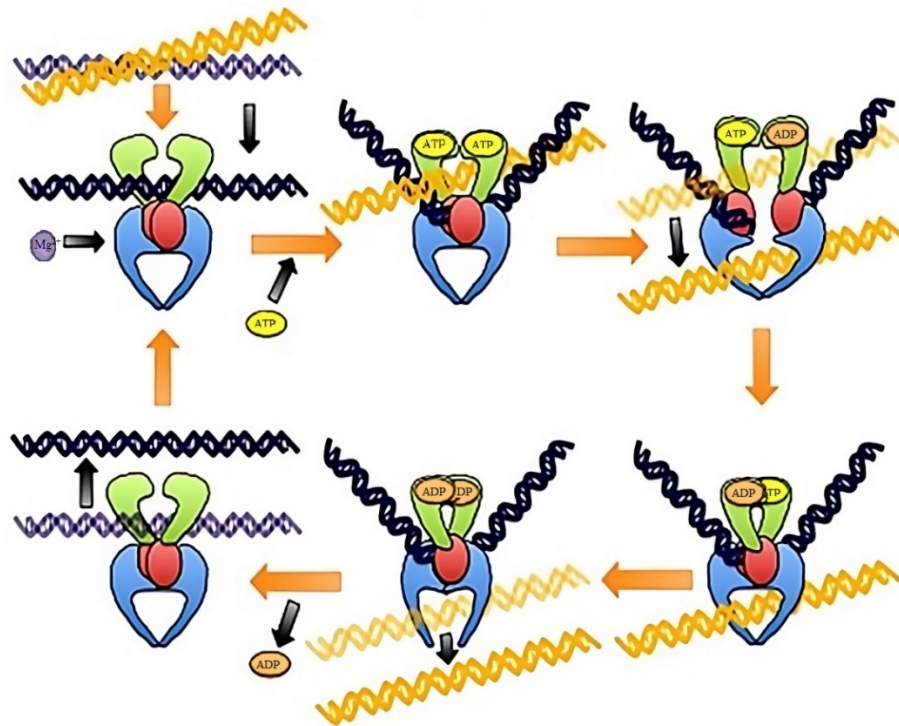


Obrázok 2 - Dvojstupňová hydrolyza DEX na ADR 925 podobný EDTA – prevzaté a upravené z Minotii et al. (2004)

5.2 Topoizomeráza

DNA TOP sú enzýmy, ktorých úlohou je kontrolovať DNA topológiu. Zároveň patria medzi hlavné zložky v procesoch replikácie, transkripcie, homológnej rekombinácie a delenia buniek (Giliarov and Shkundina 2012). Rozlišujeme niekoľko typov ľudských TOP, ktorých základnou úlohou je tvorba jednoreťazcových zlomov DNA (topoizomeráza IA, IB, IC) alebo dvojreťazcových zlomov DNA (topoizomeráza II α , II β) (McKie, Neuman, and Maxwell 2021). Potreba topoizomeráz vyplýva z dvojzávitovej štruktúry DNA a potreby uvoľnenia nadzávitového vinutia pre zaistenie prístupu ku genetickej informácii (Champoux 2001). V dôsledku toho vzniká pred replikačnými alebo transkripčnými miestami pozitívne nadzávitové vinutie a za nimi negatívne nadzávitové vinutie. V prípade neprítomnosti DNA topoizomerázy by pozitívne nadzávitové vinutie spôsobilo zastavenie replikácie a transkripcie. Na druhej strane, negatívne nadzávitové vinutie by zapríčinilo tvorbu abnormálnych štruktúr zahŕňajúc D slučky, R slučky, G-kvartety a Z-DNA, ktoré sa podieľajú na poškodení metabolizmu DNA (Pommier et al. 2010).

Základnou katalytickou funkciou TOP II je štiepenie fosfodiesterovej väzby oboch vlákien dvojitej špirály DNA. Dvojreťazcový zlom je uskutočnený v časti DNA, ktorá je označená ako G-segment. Tento zlom zabezpečí prechod druhej časti neporušenej dvojvláknovej DNA označovanej ako T-segment. Vzniká kovalentná väzba medzi fosfodiesterovou skupinou štiepeného vlákna a tyrozínovým zvyškom a to na oboch monomérnych jednotkách (Tyr805 pre ľudskú TOP II α a Tyr821 pre ľudskú TOP II β). Reakcia štiepenia DNA vyžaduje prítomnosť Mg²⁺ a ATP (Deweese and Osheroff 2009).

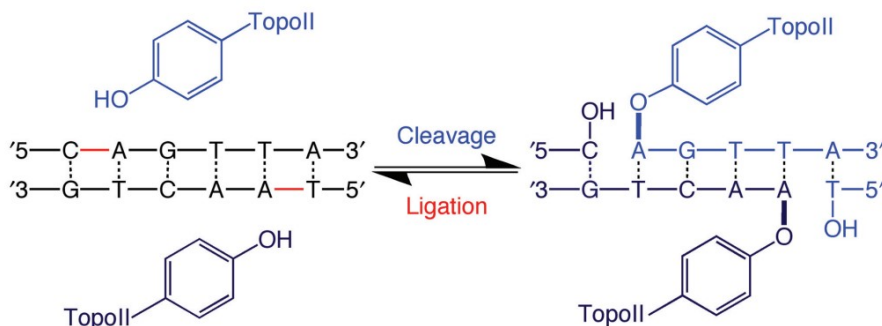


Obrázok 3 – Znárodnenie katalytickej funkcie topoizomerázy II – prevzaté a upravené z Gibson and Deweese (2013)

V bunkách cicavcov sú prítomné dve izoformy TOP II, forma α a β (170 a 180 kDa), ktoré boli izolované z leukemických buniek P388 rezistentných na amsacrin (Drake et al. 1987; Cummings and Smyth 1993). Ich primárna štruktúra a katalytické vlastnosti *in vitro* sú takmer zhodné. TOP II α je izoformou, ktorá sa primárne podieľa na mitotických procesoch. Naznačujú to skutočnosti, ktoré poukazujú na priamy súvis medzi koncentráciou TOP II α a bunkovou proliferáciou; proliferujúce bunky vykazujú vyššiu expresiu mRNA TOP II α ; fáza G2/M bunkového cyklu dosahuje vrchol hladiny TOP II α a zároveň sa TOP II α sústreďuje na osiach chromozómov a v centromérach počas metafázy (Sakaguchi and Kikuchi 2004).

Biologická funkcia TOP II β je oproti fyziologickej funkcii TOP II α menej jasná. Zo štúdií vyplýva, že hladina TOP II β je počas celého bunkového cyklu konštantná (Woessner et al. 1991). Zároveň je prítomná vo všetkých typoch buniek, pričom terminálne diferencované bunky vykazovali vyššiu expresiu tohto enzýmu oproti bunkám nediferencovaným (Lyu et al. 2007). Pri vývoji nervovej sústavy má TOP II β zásadnú rolu. Špecifické zníženie tohto enzýmu v mozgu myši spôsobilo ovplyvnenie stratifikácie mozgu a abnormality v kortikogenéze (Yang et al. 2000). Izoforma beta je hlavnou

formou TOP II taktiež v dospelom srdci. Pričom terminálne diferencované srdcové bunky, kardiomyocyty, nemajú izoformu alfa vôbec detekovateľnú (Capranico et al. 1992).



Obrázok 4 - Štiepenie dvojvláknovej DNA sprostredkované TOP II. Cleavage (štiepenie vlákna), Ligation (ligácia vlákna, opačný proces) – prevzaté z Dewesse a Osheroff (2009)

5.2.1 Inhibícia topoizomerázy II a jej význam v protinádorovej terapii

Asociácia topoizomeráz s protinádorovým účinkom bola dokázaná v polovici 80. rokoch 20. storočia na základe zistení, že niektoré zlúčeniny majú schopnosť vyvolávať špecifické zmeny DNA na nádorových bunkách *in vitro* (Cummings and Smyth 1993).

Jadrová TOP II je primárnym cieľom klinicky používaných antineoplastických liečiv. Protinádorové liečivá blokujú katalytický cyklus TOP II v rôznych fázach, pričom látky najviac účinné blokujú fázu, v ktorej je DNA rozštiepená a vzniká tak dvojitý zlom DNA. Nasleduje kaskáda udalostí, ktorá vyústi do bunkovej smrti. TOP II, jej aktivita a množstvo zastáva dôležitú funkciu pri cytotoxickej schopnosti liečiva. Hladina TOP II priamo súvisí s proliferáciou bunky. Regulácia úrovne TOP II v nádorových bunkách predstavuje zložitejší proces. Transformované bunky disponujú vyššími hladinami TOP II, ktoré neklesajú ani v prípade zastavenia proliferácie. Z toho vyplýva, že regulácia TOP II môže byť na rozdiel od normálnych buniek v transformovaných bunkách zmenená čo tvorí základ pre protinádorovú aktivitu inhibítorov TOP II (Capranico, et al. 1992).

TOP II, ako základný cieľ antineoplastických liečiv je používaná v liečbe nádorov prsníka, karcinómu prostaty a pľúc, sarkómov alebo hematologických ochorení.

Látky, ktoré sú schopné zasahovať minimálne do jedného katalytického cyklu TOP II sa rozdeľujú na topoizomerázové jedy a katalytické inhibítory (Nitiss 2009).

a) Topoizomerázové jedy

Látky označované ako TOP II jedy sú schopné inhibovať krok religácie, čím spôsobujú stabilizáciu obyčajne prechodného kovalentného komplexu enzým – DNA (Pommier, et al. 2010). Takto stabilizované kovalentné komplexy TOP II-DNA vykazujú cytotoxickú aktivitu. Z hľadiska klinického významu sú najdôležitejšie DOX, DNR, epirubicín, idarubicín, etopozid, mitoxantrón a mAMSA. Väčšina TOP II jedov je nešpecifická, inhibujú obe izoformy TOP II. Štúdiá vykonaná na myšiacich embryách a neskôr aj na ľudských bunkách potvrdila, že bunky s nedostatkom TOP II β vykazujú najväčšiu rezistenciu voči vyššie spomenutým liečivám (Austin et al. 2018). TOP II jedy sú vďaka svojim cytotoxickým účinkom využívané pri liečbe nádorových ochorení. Okrem kardiotoxicity však môžu spôsobiť rozvoj nádorového bujenia, ktoré súvisí s terapiou. Najčastejšie vyskytujúce sa sekundárne malignity sú akútna myeloidná leukémia (t-AML) a akútna promyelocytová leukémia (t-APL), pričom obe formy leukémie sú spojené s liečbou (Delgado et al. 2018). Vznik t-AML je spojený s rekurentnými chromozómovými translokáciami zahŕňajúcimi gén MLL/KMT 2A na chromozóme 11q23, ktorý reguluje expresiu génov a vývoj krvných buniek (Austin, et al. 2018).

b) Katalytické inhibítory

Katalytické inhibítory svojou aktivitou najčastejšie ovplyvňujú funkciu domény ATP, z čoho vyplýva, že nespôsobujú akumuláciu zlomov vlákien DNA (Gibson and Dewese 2013). Katalytické inhibítory patria medzi heterogénnu skupinu liečiv a ich mechanizmus pôsobenia na TOP II sa môže líšiť. Môžeme si uviesť napr. aklarubicín, ktorý interferuje s väzbou vytvorenou medzi TOP II a DNA; nekovalentné stabilizovanie DNA (dexrazoxan, merbaron); alebo vyššie spomínanú inhibíciu väzby ATP (novobiocín). Tieto liečivá predstavujú aktivitu, ktorá súvisí s kardioprotektívnymi účinkami (dexrazoxan), protinádorovými účinkami (aklarubicín) alebo majú schopnosť zvýšiť účinok iných látok (sumarín a novobiocín) (Larsen, Escargueil, and Skladanowski 2003). Do tejto skupiny patrí tiež resveratrol (Lee, Wendorff, and Berger 2017).

5.3 Resveratrol a jeho účinky

Resveratrol (RES), prirodzene vyskytujúci sa polyfenol, vykazuje antioxidačné, protizápalové účinky, ďalej účinky spojené so zlepšením metabolizmu, kardioprotekčné účinky a súčasne sa podieľa na prevencii rakoviny. RES je prítomný v hrozne, bobuľovom ovocí, arašidoch, ale aj v červenom víne (Schmidt et al. 2020). Výskum RES na bunkových kultúrach, *in vitro*, potvrdil jeho viaceré protinádorové účinky a zároveň ovplyvnenie vzniku a progresie nádorov (Carter, D'Orazio, and Pearson 2014). Veľké množstvo klinických štúdií zdokumentovalo bezpečnosť, účinnosť a farmakokinetiku RES. Bezpečná dávka polyfenolu predstavuje množstvo do 5g/deň podané v samostatných dávkach, alebo ako súčasť kombinovanej liečby. Terapeutické použitie RES je limitované nízkou biologickou dostupnosťou a rýchlym metabolizmom (Singh et al. 2019).

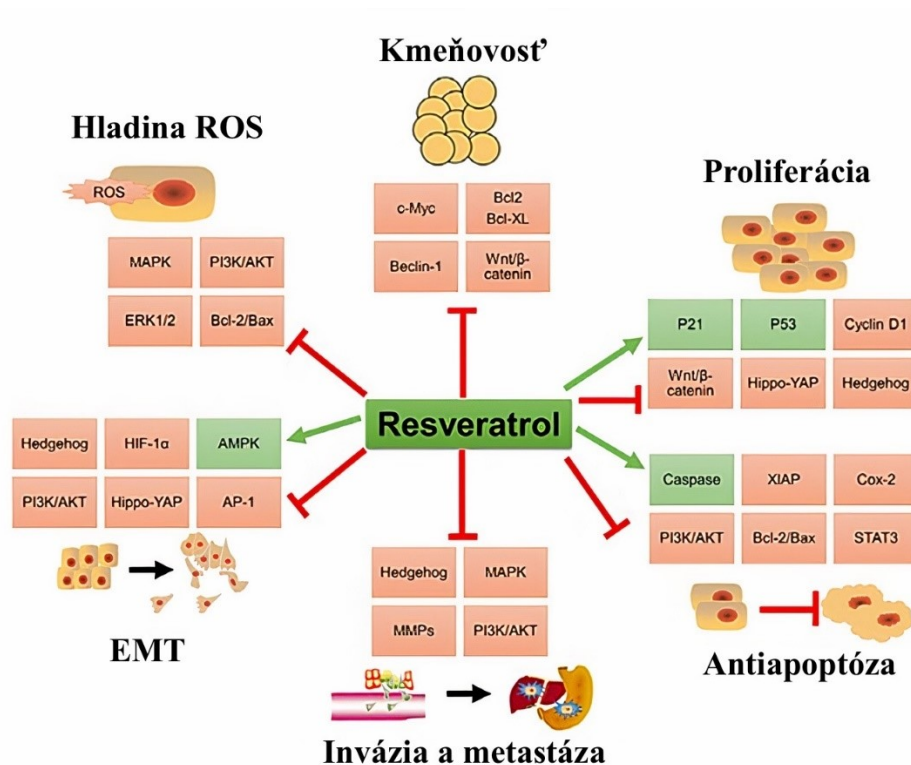
Štúdie vykonané na nádorových bunkových líniiach HepG2 (hepatocelulárny karcinóm) a 4T1 (karcinóm mliečnej žľazy u myši) hodnotili cytotoxické účinky RES. Významnejší antiproliferačný efekt RES bol pozorovaný na bunkách 4T1. Následné štúdie preukázali, že inhibičný účinok RES je závislý na jeho dávke (Wu et al. 2019). Ďalšie štúdie, ktoré boli vykonané na bunkovej línii MCF-7 (prsný karcinóm), potvrdili inhibíciu proliferácie buniek prsného karcinómu vďaka RES (Schmidt, et al. 2020). RES preukázal synergický účinok v kombinácii s chemoterapeutikami (Yang et al. 2022). Štúdie Jin *et al.* dokázali, že proliferácia a metastázovanie buniek MCF-7 je výrazne inhibované v kombinácii RES a DOX (Jin et al. 2019). Nadväzujúce štúdie Bostan *et al.* potvrdzujú zvýšený cytotoxický účinok cisplatiny v kombinácii s RES na nádory krku a hlavy (Bostan et al. 2020).

Štúdie *in vitro* potvrdili protinádorový efekt RES na bunky:

- kolorektálneho karcinómu,
- karcinómu pľúc,
- karcinómu vaječníkov,
- karcinómu krčka maternice,
- hepatocelulárneho karcinómu,
- karcinómu hlavy a krku,
- karcinómu pľúc,
- karcinómu prostaty,
- karcinómu pažeráku,
- leukemické.

Väčšina z uvedených zistení je založená hlavne *in vitro* a niektoré súčasne *in vivo*. Výsledky z bunkových línií poskytujú cenné informácie o potenciálnych účinkoch RES, ale nie sú priamo prenositeľné na ľudský organizmus (Rauf et al. 2018).

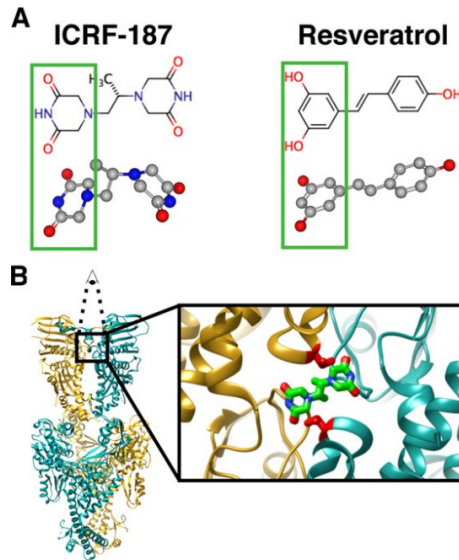
Napriek tomu, že RES potvrdil svoje protinádorové účinky, mechanizmy, akými sú tieto účinky vyvolané, nie sú úplne objasnené. Niektoré z mechanizmov sú znázornené nižšie (Obrázok 5). RES vystupuje ako antioxidant a moduluje aktivitu antioxidantných enzýmov, čo má za následok protinádorový efekt. RES môže svojou aktivitou prispievať k mitochondriálnej akumulácii H_2O_2 , ktorá v konečnom dôsledku vedie k indukovanej apoptóze nádorových buniek (Jiang et al. 2017). Proliferácia a súčasne aj životaschopnosť buniek je narušená prostredníctvom schopnosti RES stimulovať molekulárne dráhy, ktoré vedú k apoptóze a autofágii buniek (Behroozaghdam et al. 2022). Modulácia funkcie protinádorových buniek patrí medzi ďalšie možné účinky RES v protinádorovej terapii. RES indukuje aktiváciu NK buniek (Natural Killer cells) a CTL buniek (Cytotoxic T Lymphocytes). Podieľa sa na zvýšení uvoľňovania IFN- γ (Interferon gamma) a TNF- α (Tumor necrosis factor alfa) a zároveň na znížení imunosupresívnych cytokínov, medzi ktoré sa radia IL-1, IL-6, IL-10 a TGF- β (Transforming Growth Factor Beta) (Mu and Najafi 2021). Okrem iného RES znižuje mieru fosforylácie a acetylácie NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), čo má za následok nedostatočné množstvo faktorov podieľajúcich sa na rozširovaní nádoru (Buhrmann et al. 2018). Medzi ďalšie skúmané mechanizmy účinku zaraďujeme ovplyvnenie bunkového cyklu (zastavenie G1/S fázy cyklu); zamedzenie opravy DNA alebo napríklad inhibícia COX-2 (Cotino-Nájera et al. 2023).



Obrázok 5 - Ovplyvnenie signálnych dráh, ktorými RES inhibuje maligne biologické správanie nádorových buniek – prevzaté a upravené z Jiang et al. (2017)

Pri užívaní RES v dávke 2,5-5 g klinické štúdie potvrdili niekoľko nežiaducich účinkov, medzi ktoré radíme hlavne gastrointestinálne príznaky zahrňujúce nevoľnosť, pocit plynatosti, brušný diskomfort a riedku stolicu (Ramírez-Garza et al. 2018; Yiu et al. 2015). Gastrointestinálne nežiaduce účinky boli pozorované v časovom rozmedzí pol až hodinu po požití RES. Úbytok hmotnosti nebol preukázaný u žiadneho z účastníkov (Brown et al. 2010).

Štúdie *in vitro* poukázali na chemickú podobnosť RES s DEX (Obrázok 6) a zároveň bolo zistené, že RES je schopný inhibovať TOP II. Predpokladalo sa, že RES pôsobí ako TOP jed, ale nakoniec boli tieto hypotézy vyvrátené. Na rozdiel od DEX, ktorý podporuje dimerizáciu ATPázovej domény TOP II, RES túto interakciu blokuje. Okrem toho, účinok RES na ATPázovú doménu TOP II nebol taký silný ako účinok DEX. Štúdie súčasne naznačujú, že RES môže potencióálne modulovať toxicitu DOX podobným spôsobom ako DEX (Lee, Wendorff, and Berger 2017).



Obrázok 6 - Porovnanie DEX (ICRF-7) a RES. **A** – chemické štruktúry DEX a RES so zvýraznenými časťami, ktoré sa navzájom podobajú **B** – miesto väzby DEX na dimerizačnom rozhraní ATPázových domén – prevzaté a upravené z Lee, Wendorff, and Berger (2017)

Väčšina klinických štúdií RES bola uskutočnená na malej vzorke rôznych populácií s pomerne širokým spektrom dávkovania. Z tohto dôvodu je ťažké konkretizovať bezpečnosť a účinnosť RES v určitej dávke pre konkrétnu populáciu (Novelle et al. 2015). Výsledky biologických účinkov RES *in vitro* a *in vivo* sú spojené s jeho hormetickým účinkom. Hormetický účinok predstavuje stav kedy má RES v nízkych dávkach priaznivé účinky zatiaľ čo jeho vysoké dávky sú spojené s toxickým účinkom. Bez ohľadu na rozsiahly počet štúdií, ktoré boli zamerané na prospešnosť a ochranné funkcie RES neexistuje dostatok klinických štúdií zameriavajúcich sa na škodlivé účinky RES. Zároveň molekulárne mechanizmy pôsobenia RES je nutné presnejšie identifikovať (Shaito et al. 2020).

6 CIEĽ PRÁCE

- Stanovenie antiproliferačného účinku DNR a DOX na bunkovej línii MCF-7.
- Stanovenie antiproliferačného účinku RES a jeho nových analógov (MC-111, MC-121, MC-126, MC-151, MC-122, MC-130, MC-137, MC-108, MC-149, MC-152, MC136, MC-138, MC-150, Pinosylvín) na bunkovej línii MCF-7.
- Stanovenie antiproliferačného účinku DNR na bunkovej línii HL-60.
- Stanovenie antiproliferačného účinku RES a jeho nových analógov (MC-111, MC-121, MC-126, MC-151, MC-122, MC-130, MC-137, MC-108, MC-149, MC-152, MC136, MC-138, MC-150, Pinosylvín) na bunkovej línii HL-60.

7 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

7.1 Základné vybavenie pre prácu s bunkovými líniami

- Sterilné kultivačné nádoby rôznych objemov (TPP, Švajčiarsko)
- Sterilné serologické pipety rôznych objemov (TPP, Švajčiarsko)
- Sterilné mikroskúmavky rôznych objemov (Eppendorf, Nemecko)
- Bürkerova komôrka (Brand, Nemecko)
- 96-jamkové mikrotitračné doštičky s plochým dnom (TPP, Švajčiarsko)
- Sterilné plastové špičky rôznych objemov (Eppendorf, Nemecko)
- Sterilné laboratórne sklo (Simax, Česká republika)
- Nesterilné mikroskúmavky rôznych objemov (Eppendorf, Nemecko)

7.2 Prístrojové vybavenie

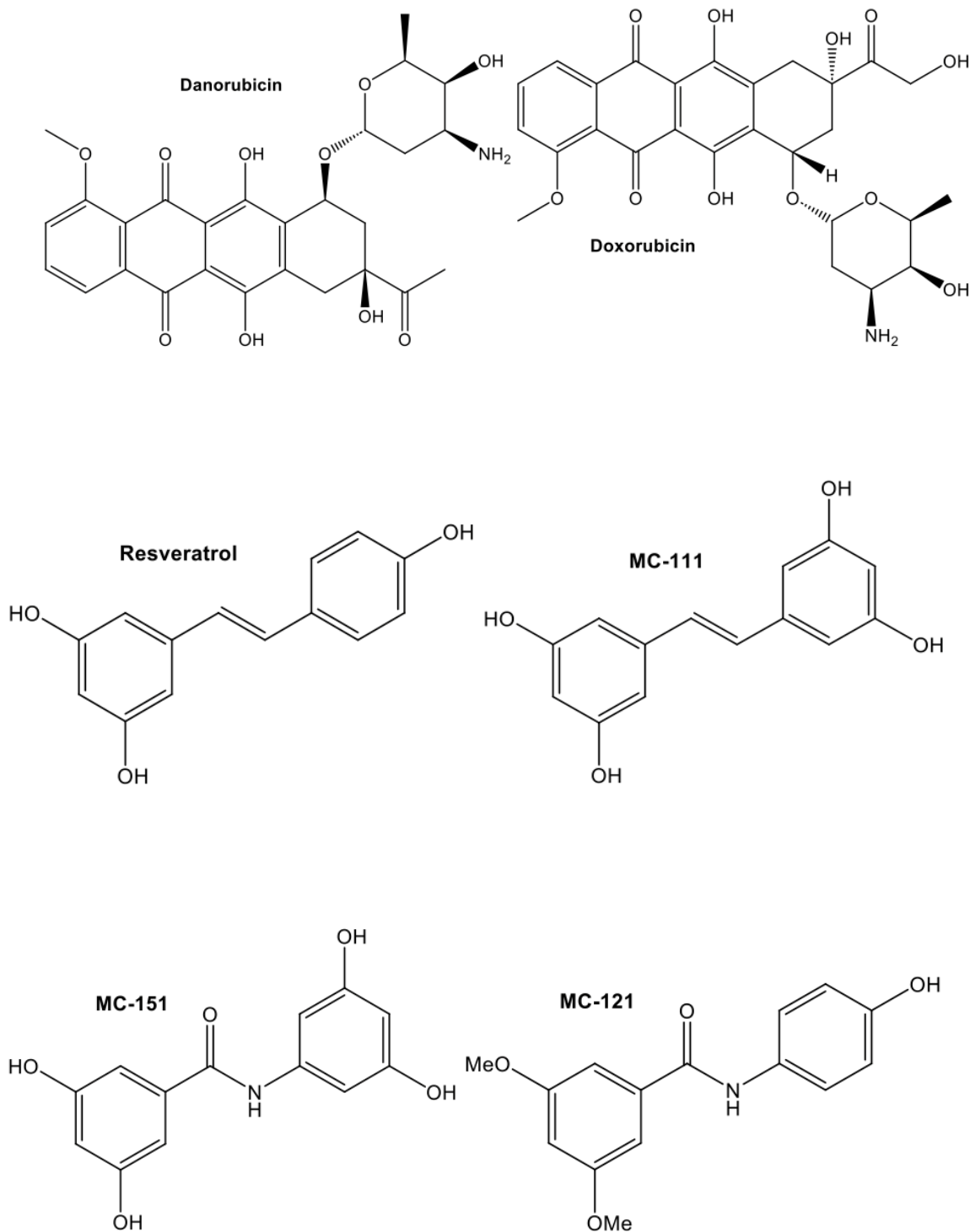
- Bunkové inkubátory s termostatom a reguláciou koncentrácie CO₂ (Sanoy, Japonsko a Esco, USA)
- Boxy s laminárnym prúdením BioAir TopSafe 1.2 (EuroClone, Taliansko)
- Vodný kúpeľ Memmert WB 14 LV (Memmert, Nemecko)
- Automatické pipety rôzneho rozsahu (Eppendorf, Nemecko)
- Multikanálové pipety rôzneho rozsahu (Eppendorf, Nemecko)
- Pipetovacie nadstavce Integra (Integra, Švajčiarsko)
- Doštičková trepačka Heidolph Titramax 100 (Heidolph Instruments, Nemecko)
- Čítačka mikrotitračných doštičiek Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Švajčiarsko)
- Analytické váhy Scaltec SBC 22 (Scaltec, Nemecko)
- Optický mikroskop Eclipse TS100 (Nikon, Japonsko)
- Laboratórna trepačka Vortex V-1 Plus (BioSan, Litva)

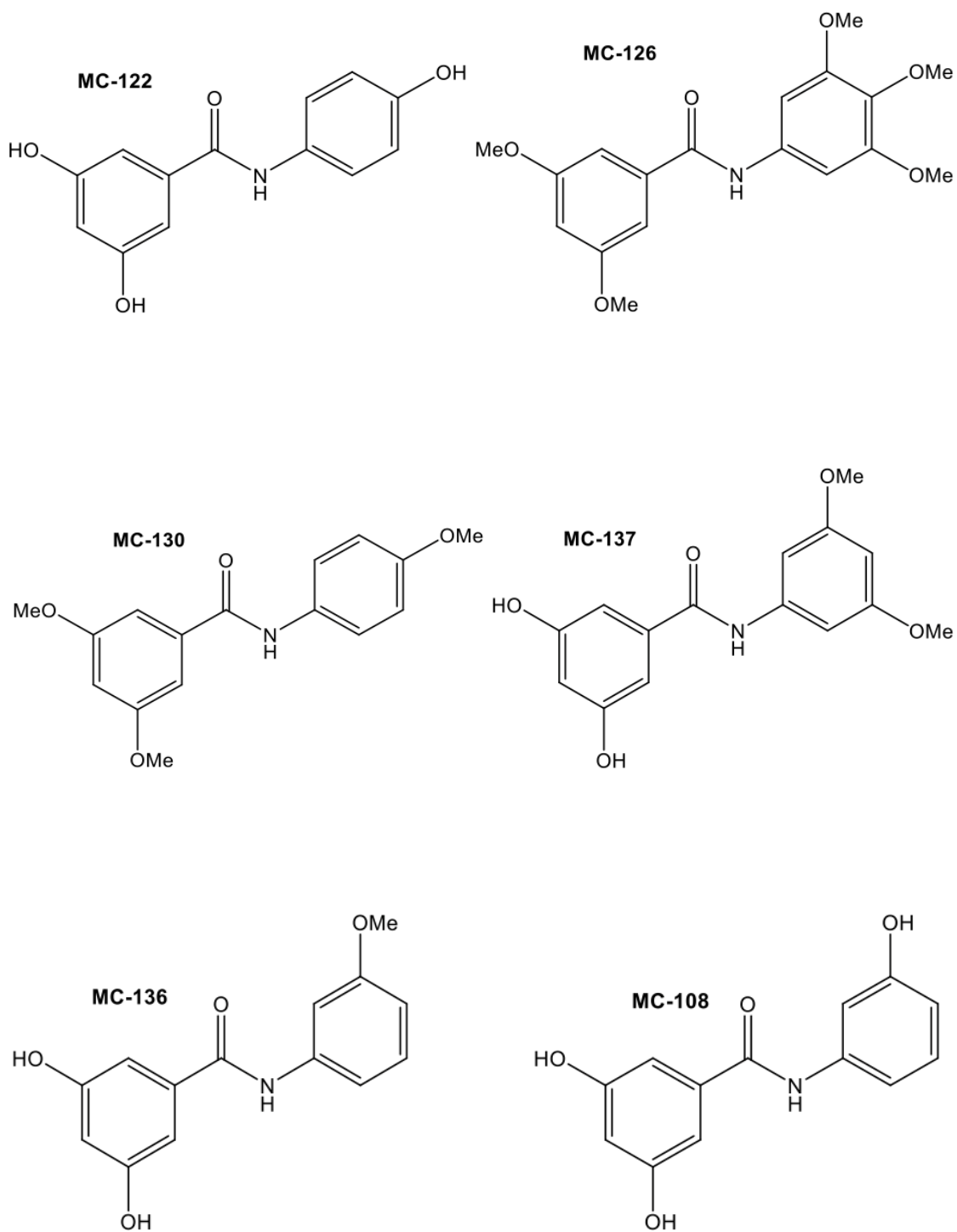
7.3 Chemikálie a reagenty

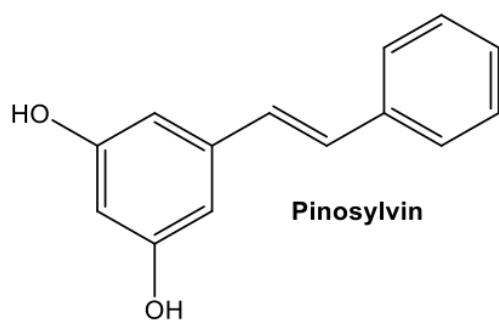
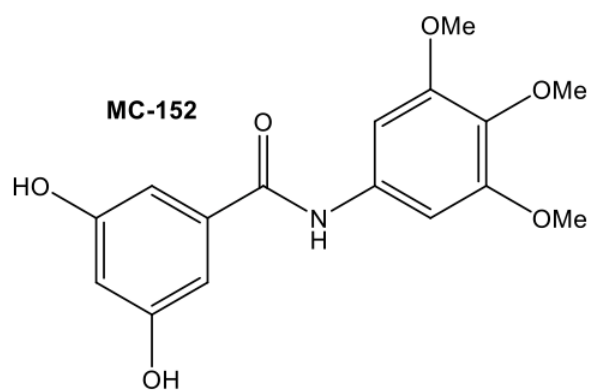
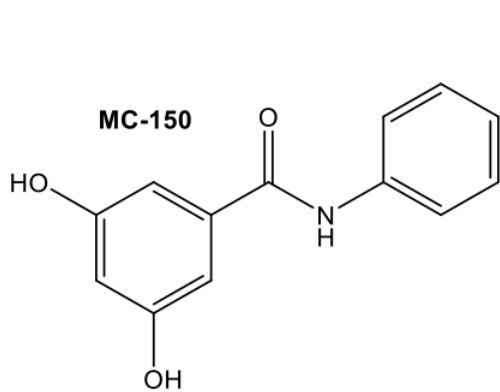
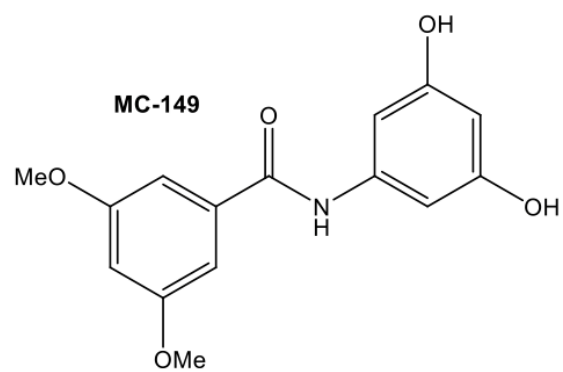
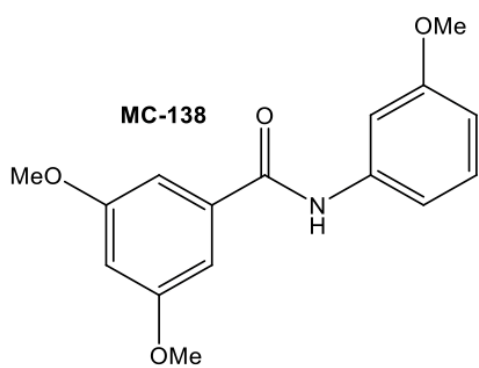
- Bunková kultúra MCF-7 (American Type Tissue Culture)
- Bunková kultúra HL-60 (American Type Tissue Culture)
- Kultivačné médium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Lonza, Belgicko)
- Kultivačné médium RPMI-1640 (With L-Glutamine, Lonza, Belgicko)
- Fosfátom pufovaný fyziologický roztok, tablety (PBS; Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Trypsín/EDTA (T/E; 10x koncentrovaný, Lonza, Belgicko)
- Ultraglutamín 1 (Lonza, Belgicko)
- HEPES pufovaný (Lonza, Belgicko)
- Trypanová modrá, 0,4% (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Dimethylsulfoxid (DMSO, Penta, Česká republika)
- Lyzačný roztok MTT (isopropanol; 0,1M HCl; triton-X 100)
- Thiazolyl blue tetrazolium bromide (Sigma-Aldrich, Nemecko)

SKÚMANÉ LÁTKY:

V praktickej časti tejto diplomovej práce sme experimentálne testovali deriváty resveratrolu, ktoré boli vyvíjané a pripravované v rámci vedeckej skupiny doc. Roha na Katedre organickej a bioorganickej chémie. Daunorubicin bol zakúpený ako hydrochlorid z Euroasian Chemicals Pvt. Ltd (Mumbai, India) a doxorubicin (TEVA, Izrael).







7.4 Bunkové kultúry

Bunkové kultúry patria medzi jeden z najhodnotnejších nástrojov používaných v základnom aj aplikovanom výskume. Izolácia buniek prebieha z ich prirodzeného prostredia (*in vivo*) a následne sú udržiavané, rozmnožované a študované v umelom prostredí (*in vitro*). Pri základnom a aplikovanom biomedicínskom výskume sa vo veľkej miere používajú systémy bunkových kultúr cicavcov, ktoré sú ľahko ovládateľné, geneticky sledovateľné a sú najbližšie k podmienkam *in vivo*. Bunky môžeme získať priamou izoláciou od darcov ako "primárne bunky" alebo z tzv. bunkových bánk, ktorou je napríklad American Type Culture Collection (ATCC) slúžiaca ako úložisko primárnych buniek a bunkových línií. Na základe výskumného projektu je potrebné vybrať bunky a bunkové línie s potrebnými kultivačnými podmienkami. V neposlednom rade sa s experimentálnym procesom spája správna starostlivosť o bunkové línie a náležitá starostlivosť o osobnú bezpečnosť a sterilita pri práci (Preksha, Yesheswini, and Srikanth 2021).

Bunkové kultúry a ich výskum hrajú dôležitú úlohu vo vedeckom výskume a zároveň umožňujú rozvoj biofarmácie, toxikológie alebo biotechnológie. Vo farmaceutickom výskume sa čoraz častejšie používajú bunkové kultúry na štúdium absorpcie liečiv, hodnotenie toxicity a na predpovedanie vlastností. V súčasnosti sa používajú dve metódy kultivácie buniek: dvojrozmernú (2D) a trojrozmernú (3D). V prípade klasickej, 2D bunkovej kultúry, sa bunky množia v monovrstvách, zároveň majú mnoho obmedzení a neumožňujú plnú kontrolu rastu a diferenciácie buniek. V bunkovej kultúre zohráva dôležitú úlohu použité médium, ktoré poskytuje bunkám potrebné živiny (Bober et al. 2022).

Návrh 3D sfér je založený na vytváraní sféroidných štruktúr, v ktorých sú bunky usporiadané do rôznych vrstiev. Takto vytvorená štruktúra fyzikálne a biochemicky napodobňuje vlastnosti pevnej nádorovej hmoty. Takto získané kultúry nám umožňujú vysokú opakovateľnosť a možnosti vykonávať výskum napríklad na liečivé látky (Kapałczyńska et al. 2018).

V prípade nášho experimentu sa použili 2D bunkové kultúry MCF-7 a suspenzné línie HL-60, ktoré boli obstarané od ATCC.

7.4.1 Bunková línia MCF-7

Nádorové bunky MCF-7 boli zriadené v roku 1973 Dr. Souleom spolu s jeho kolektívom na Michigan Cancer Foundation odkiaľ poznáme aj ich názov. Bunky boli izolované 69-ročnej pacientke s metastatickým ochorením z pleurálneho výpotku. Ťažiskovým objavom pre karcinóm prsníka bol opis estrogénneho receptora (ER) v bunkách MCF-7. Bunková línia MCF-7 postupom času priniesla viac informácií o praktických vedomostiach ohľadom starostlivosti o pacienta, ako akákoľvek iná línia buniek karcinómu prsníka. Zistilo sa, že táto línia buniek je ER-pozitívna a zároveň aj progesterón receptor (PR)-pozitívna a radíme ju do luminálneho Amolekulárneho podtypu (Comşa, Cîmpean, and Raica 2015).

7.4.2 Bunková línia HL-60

Bunková línia HL-60 pochádzajúca od pacientky, ktorá trpela akútnou promyelocytárnou leukémiou predstavuje jedinečný model *in vitro*. Tento model nám umožňuje štúdium bunkových a molekulárnych pochodov, ktoré sa podieľajú na proliferácii a diferenciácii normálnych a leukemických buniek (Collins 1987).

7.5 Kultivácia bunkových kultúr

Základom kultivácie buniek sú správne zvolené kultivačné médiá. Kultivačné médium predstavuje jednu zo základných a veľmi dôležitých súčastí, ktoré sú potrebné pre udržanie viability bunkových kultúr. Pri príprave kultivačného média musia byť dodržané podmienky sterilnej práce, ktoré boli zabezpečené vďaka práci v laminárnych boxoch. Pred samotnou prípravou kultivačného média sú jednotlivé zložky, okrem ultraglutamínu, vytemperované na teplotu 37 °C vo vodnom kúpeli.

Kultivačné médium, ktoré sme používali pri práci s bunkovou líniou MCF-7 sa pripravilo z DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) bez prídavku L-glutamínu a fenolovej červene a naopak s vysokou koncentráciou glukózy, ktorá predstavovala až 4.5 g glukózy na liter média. Zvýšená koncentrácia glukózy slúži ako zdroj výživy. Zabezpečiť fyziologické pH v kultivačnom médiu nám umožňuje HEPES pufor, ktorý tvoril 1% kultivačného média. Ďalej bolo do kultivačného média postupne pridané FBS (10%), ultraglutamín I (1%) a ako protiinfekčné agens sa použila kombinácia

úzkospektrého penicilínu a širokospektrého streptomycínu (1%). Následne boli všetky zložky média dostatočne premiešané a kultivačné médium bolo skladované v chladničke pri teplote 5-8 °C. Takto pripravené médium sa pred samotnou prácou s bunkovými líniami nechalo vytemperovať na 37 °C vo vodnom kúpeli.

Pri práci s bunkovou líniou HL-60 sme používali kultivačné médium, ktoré bolo pripravené z RPMI-1640 s ultraglutamínom I. Ultraglutamín I predstavuje mimoriadne stabilnú dipeptidovú formu L-glutamínu zabraňujúcu hromadeniu toxického amoniaku produkovaného pri spontánných degradáciách v médiu. Následne sme do kultivačného média pridali FBS (10%) a P/S (1%). Všetky zložky média boli pred homogenizáciou vytemperované na teplotu 37 °C a postupne dobre premiešané. Takto pripravené médium bolo rovnako skladované v chladničke pri teplote 2-8 °C a pred prácou s bunkovými líniami vytemperované na teplotu 37 °C.

Bunkové línie MCF-7 a HL-60 boli kultivované v bunkových inkubátoroch. Kultivácia bunkových líní prebiehala pri teplote 37 °C, 5% CO₂ atmosfére a konštantnej vlhkosti. Na inkubáciu sme používali sterilné plastové inkubačné nádoby rôznych objemov. Samotná práca s bunkovými kultúrami bola realizovaná v sterilnom laminárnom boxe, podľa štandardného pracovného protokolu.

7.6 Bunková pasáž

Pasážovanie a zároveň výmena média, označované aj ako proces subkultivácie, je proces, ktorý uplatňujeme pri práci s bunkovými kultúrami *in vitro*. Tento proces je spojený s prenosom určitej časti vykultivovaných buniek do novej kultivačnej nádoby s čerstvým médiom. Výmena média je spojená s dodávaním potrebných živým bunkám a zároveň tým udržiavame bunky zdravé, zatiaľ čo pasážovanie buniek zabezpečuje udržať bunky v exponenciálnom raste. Pasážovanie buniek považujeme za pomerne jednoduchú, ale veľmi dôležitú súčasť práce s bunkovými líniami. Každá bunková línia vyžaduje určité podmienky a nič nenahradí znalosť ich jednotlivých potrieb. Pri príslušnej starostlivosti a pozornosti sa väčšina bunkových líní ľahko udržiava a pestuje.

Kompletný proces bunkovej pasáže sa uskutočňuje za prísne sterilných podmienok v laminárnych boxoch za podmienky, že všetky použité roztoky boli vopred temperované vo vodnom kúpeli na teplotu 37 °C.

Prvým krokom pri pasážovaní bunkovej kultúry MCF-7 je odobratie starého kultivačného média. Následne boli bunky prepláchnuté roztokom sterilného pufru PBS, tento oplach sa vykonáva vždy dvakrát s 5 ml sterilného roztoku pufru. Oplach buniek je nevyhnutnou súčasťou pasážovania buniek a to z dôvodu odstránenie vápniku, ktorý by mohol negatívne ovplyvniť ďalší postup, a to hlavne pôsobenie enzýmu trypsínu (T/E).

Druhým krokom bolo pridanie 2 ml T/E pomocou sterilnej serologickej pipety a kývavými pohybmi bol rozprestretý po celom dne kultivačnej nádoby, následne sa znovu pomocou serologickej pipety 1,5 ml trypsínu odobralo. Takto pripravená kultivačná nádoba je umiestnená do inkubátoru po dobu piatich minút pri teplote 37 °C. Proces, ktorý následne prebieha v kultivačnej nádobe označujeme ako trypsinizácia, kde dochádza k oddeľovaniu buniek od dna kultivačnej nádoby pôsobením proteáz a stávajú sa bunkovou suspenziou. Po vybratí buniek z inkubátoru bol stav buniek skontrolovaný pod mikroskopom. Bunky boli prudkým trhnutím ztrepané do spodnej časti nádoby.

Proces trypsinizácie bol ukončený pridaním kultivačného média v závislosti na požadovanom riedení. V našom prípade išlo o riedenie 1:3, tým pádom bolo k bunkovej suspenzii pridané 5,5 ml kultivačného média, ktoré bolo predhriate na 37 °C. Kultivačné médium pôsobí inaktivujúco voči roztoku trypsínu.

Nasledujúcim krokom bolo resuspendovanie buniek. Resuspendovanie je proces, pri ktorom je bunková suspenzia opätovne nasatá a vypustená do serologickej pipety proti dnu kultivačnej nádoby. Zároveň je potrebný dôkladný oplach dna nádoby. Spojením týchto postupov je vytvorenie homogénnej suspenzie buniek bez prítomnosti zhlukov. Množstvo suspenzie, ktoré sa preniesie do novej kultivačnej nádoby závisí od aktuálnej konfluencie buniek a stavu z predošlej pasáže. V našom prípade, pri riedení 1:3 sme do novej kultivačnej nádoby pridali 2 ml suspenzie buniek a k tomu 13 ml vopred nahriateho média. Nová suspenzia buniek sa dôkladne premiešala s médiom v novej kultivačnej nádobe pomocou kývavých pohybov. Bunky pripravené týmto postupom boli ďalej kultivované podľa štandardných podmienok do ďalšej pasáže. Zvyšnú bunkovú suspenziu môžeme využiť na experimenty.

Bunková pasáž bunkovej kultúry HL-60 prebiehala vždy pravidelne v intervale každých 72 alebo 96 hodín. Pred pasážou sme bunkovú kultúru podrobili dôkladnej homogenizácií pomocou ľahkých kývavých pohybov. Následne sme zo zásobnej fľaše

T- 75 odobrali 50 µl bunkovej suspenzie do nesterilnej mikroskúmvky, ktorá slúži na počítanie buniek.

K bunkovej suspenzii sme v pomere 1:1 pridali 0,4% roztok trypanovej modrej v PBS. Nasledovalo dostatočné premiešanie bunkovej suspenzie a trypanovej modrej. Vzorku sme nechali inkubovať po dobu približne 2 minút pri izbovej teplote. Po uplynutí tejto doby sme zahájili proces počítania životaschopných buniek, ktorý je podrobne popísaný v nasledujúcej časti (4.8 Stanovenie počtu životaschopných buniek).

Zistili sme počet životaschopných buniek a previedli sme korekciu riedenia vynásobením dvomi tisícmi, tým sme vypočítali počet buniek v 1 ml. Počet buniek, ktoré sme chceli nasadiť do novej nádoby bol 150 eventuálne 200 tisíc buniek na 1 ml. Pomocou jednoduchého výpočtu sme si vypočítali koľko bunkovej suspenzie a koľko média preniesieme do novej kultivačnej nádoby, ktorá činila spoločný objem pre obe zložky 15 ml. Po odobratí požadovaného množstva jednotlivých zložiek sme ľahkými kývavými pohybmi obe zložky zmiešali, nádobu sme označili a uložili do inkubátoru na potrebný čas inkubácie. Zvyšné bunky boli použité experimentálne.

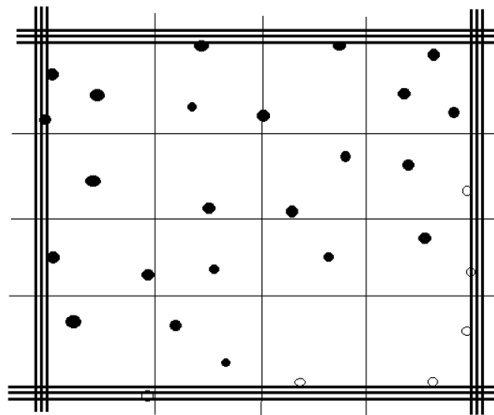
7.7 Stanovenie počtu životaschopných buniek

Pre meranie životaschopnosti buniek sa používa už viac ako sto rokov trypanová modrá. Trypanová modrá je azofarbivo, ktoré považujeme za základ pri tomto stanovení, ďalej sa však môže použiť eozín alebo jodid propídiu. Pri stanovení sledujeme neporušenosť bunkovej membrány živých buniek (Chan, Rice, and Qiu 2020).

Schopnosť buniek absorbovať farbivo, v našom prípade trypanovú modrú, patrí medzi základný princíp definovania počtu životaschopných buniek. Trypanová modrá preniká cez plazmatickú membránu a ľahko sa dostáva do vnútra bunky. To či je bunka živá alebo mŕtva spočíva v schopnosti buniek transportovať farbivo cez membránu bunky. Pri mŕtvych bunkách je farbivo zadržované vo vnútri bunky, kde nastáva jeho nahromadenie. Presný opak vykazujú živé bunky, ktoré sú schopné farbivo aktívne transportovať z bunky von cez membránu. Tento proces je možné mikroskopicky sledovať. Mŕtve bunky, u ktorých je farbivo nahromadené vo vnútri bunky, sa na svetlo modrom pozadí javia ako sýto modro sfarbené bunky. Na druhej strane máme živé bunky,

ktoré pod mikroskopom môžeme na svetlo modrom pozadí sledovať ako svetlé sférické útvary.

Pri tomto stanovení využívame mikroskúmavku, do ktorej napipetujeme 50 μl bunkovej suspenzie, ktorá nám ostala pri procese pasážovania a následne 50 μl 0,4% roztoku trypanovej modrej. Pomocou vortexu obe zložky dôkladne premiešame a necháme inkubovať pri laboratórnej teplote 5 minút. Po uplynutí tohto časového intervalu sa obsah mikroskúmavky znovu poriadne premieša. Na počítanie buniek používame Bürkerovu komôrku. Obsah mikroskúmavky nanesieme v objeme 10 μl na obe časti Bürkerovej komôrky. Počítanie buniek prebiehalo pod mikroskopom, kde sme vždy počítali bunky v 5 štvorcoch jednej časti komôrky vždy štvorce, ktoré boli uložené uhlopriečne, to znamená, že v dvoch častiach komôrky sme počítali s desiatimi štvorcami. Počítanie jednotlivého štvorca bolo nasledovné, počítame vždy s dvomi stranami ktorých sa bunky dotýkajú napr. pravý a dolný roh, to znamená že protiľahlé strany nepočítame. Výsledný počet buniek prepočítame na objem 1 ml bunkovej suspenzie.



Obrázek 7 – Počítanie buniek v Bürkerovej komôrke

7.8 Nasadzovanie buniek pre účely experimentu

Po spočítaní životaschopnosti buniek nasledovalo nasadenie buniek na 96- jamkovú kultivačnú doštičku.

Koncentrácia buniek MCF-1, ktorá bola použitá pri experimente činila 0,1 milióna buniek na 1 ml bunkovej suspenzie. Na začiatku, ešte pred nasadením buniek na doštičku, je dôležité si vypočítať objem média a množstvo bunkovej suspenzie tak aby sme zachovali nami zvolenú koncentráciu buniek. V sterilnej plastovej vaničke sme zmiešali

požadované množstvo média, ktoré bolo predom vytemperované vo vodnom kúpeli na teplotu 37 °C spolu s bunkovou suspenziou. Nasledovalo dôkladné premiešanie oboch zložiek použitím serologickej pipety. Po premiešaní sa táto zmes pomocou multikanálovej pipety aplikovala v množstve 100 µl na sterilnú 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku. Každá jamka tým pádom obsahovala približne 10 000 buniek. Takto pripravenú a označenú mikrotitračnú doštičku sme vložili do inkubátoru na 24 hodín. Inkubácia prebiehala za štandardných podmienok. Tento časový interval je dôležitý z dôvodu práce s adherentnou bunkovou líniou, za tento čas došlo k prisadnutiu buniek na dno mikrotitračnej nádoby. Po prisadnutí buniek nasledoval ďalší krok, ktorým bolo ovplyvnenie buniek pripravenými látkami.

Bunková kultúra HL-60 sa od bunkovej kultúry MCF-7 líši v tom, že na rozdiel od MCF-7 bunkovej kultúry, ktorá patrí medzi adherentné bunkové kultúry, je bunková kultúra HL-60 suspenzná. To má z hľadiska nasadzovanie buniek na experiment veľký význam. V prvom rade sa nám skrakuje doba inkubácie o 24 hodín a to z dôvodu, že nie je nevyhnutné čakať kým dôjde k prisadnutiu buniek na dno mikrotitračnej doštičky. V druhom rade sme museli inak pracovať so samotnou koncentráciou buniek a objemom buniek a skúmaných látok, ktoré boli napipetované do jednotlivých jamôčok mikrotitračnej doštičky.

Na začiatku bolo dôležité stanoviť si výslednú koncentráciu buniek a tým pádom aj koncentráciu buniek v jednej jamke. Rovnako aj pri tomto experimente sme počítali s koncentráciou 10 000 buniek v jednej jamke. Zvolenú koncentráciu sme dosiahli zmiešaním požadovaného množstva média a bunkovej suspenzie v sterilnej plastovej vaničke. Pri nasadzovaní buniek na 96-jamkovú titračnú doštičku sme museli počítať s dvojnásobnou koncentráciou buniek, to pre nás znamenalo 20 000 buniek na jednu jamku, pretože ide o suspenznú bunkovú líniu a po pridaní skúmaných látok dôjde k jej zriedeniu. Na jednu jamku prišlo 50 µl bunkovej suspenzie a 50 µl média so skúmanými látkami.

7.9 Ovplyvňovanie nasadených látok skúmanými látkami

Pri nasadzovaní skúmaných látok na mikrotitračnú doštičku bolo nevyhnutné rešpektovať niekoľko kritérií. Zachovanie sterility pracovného prostredia bolo jedným

z primárnych a kľúčových kritérií pri manipulácii so skúmanými látkami v zásobných alebo pracovných roztokoch. Rovnaké kritérium platilo aj pre prácu s bunkovými kultúrami. Táto sterilita bola zabezpečená prácou v laminárnych boxoch. Ďalším dôležitým kritériom bolo zachovávanie všetkých bezpečnostných opatrení a smerníc pre manipuláciu s chemikáliami a bunkovými kultúrami.

Základným krokom pri nasadzovaní skúmaných látok na bunkové kultúry bolo pripraviť si zásobné roztoky požadovaných koncentrácií do sterilných mikroskúmaviek. Resveratrol aj deriváty resveratrolu sme mali vo forme pevných látok. Tie sme rozpúšťali a ďalej riedili v dimetylsulfooxide (DMSO). Pri príprave zásobných roztokov z DNR a DOX je dôležité aby tieto zásobné roztoky boli pripravené až tesne pred samotným nasadzovaním látok na mikrotitračnú doštičku pre zníženie adsorpcie DNR a DOX na steny sterilnej mikroskúmavky. DNR a DOX sme riedili na dané koncentrácie pomocou destilovanej vody.

Takto pripravené skúmané látky sme pridávali k bunkovej suspenzii. Postup ovplyvňovania jednotlivých bunkových kultúr sa líšil, nakoľko sa jedná o dve rozdielne bunkové kultúry.

7.9.1 Proces ovplyvnenia bunkovej kultúry MCF-7 skúmanými látkami

Po nasadení buniek na sterilnú mikrotitračnú doštičku sme bunky nechali 24 hodín inkubovať za štandardných podmienok z dôvodu prisadnutia bunkovej kultúry na dno sterilnej mikrotitračnej doštičky. Tento proces je detailne popísaný v kapitole nasadzovania buniek (kapitola 7.9.1). Pred ovplyvňovaním skúmanými látkami sme si do sterilných mikroskúmaviek pripravili 1 ml kultivačného média, ktoré bolo predom vytemperované na teplotu 37°C. Následne sme do mikroskúmavky pridali 1 µl skúmanej látky, ktorú sme mali pripravenú ako zásobný roztok podľa požadovanej koncentrácie. V prípade ovplyvňovania resveratrolom a jeho derivátmi boli finálne koncentrácie 0,1; 1; 3; 10; 30; 100; 300; 600 µM. Výsledné koncentrácie DNR a DOX činili koncentrácie 1; 3; 10; 30; 100; 300; 600; 1 000; 3 000; 6 000; 10 000 nM. Pred pridaním skúmaných látok do jednotlivých jamôčok 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky došlo k výmene starého média za roztok skúmanej látky a média v danej koncentrácii v objeme 100 µl do každej jamky. Na kultivačnej doštičke boli okrem buniek ovplyvnených skúmanými látkami

zahrnuté bunky, ktoré neboli ovplyvnené. Označujeme ich ako kontrola, tieto bunky neboli podrobené prídavku skúmaných látok, môžeme teda počítať s tým, že majú maximálnu viabilitu. Avšak, k týmto bunkám bol pridaný DMSO v rovnakej koncentrácii, akú sme používali v ostatných experimentálnych skupinách. Zároveň sa na doštičke nachádzali jamky, ktoré označujeme ako negatívna kontrola, alebo blank, predstavujú teda nulovú viabilitu. Tieto jamky obsahovali len samotné kultivačné médium. Podrobné rozloženie mikrotitračnej doštičky aj s príslušnými koncentráciami je popísané nižšie (Tabuľka 1 a Tabuľka 2). Takto pripravená 96-jamková mikrotitračná doštička bola označená, umiestnená do bunkového inkubátora a podľa štandardných podmienok inkubovaná po dobu 72 hodín.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Kontrola 0,1% (1 μ l DMSO + 1 000 μ l médium)	0,1 μ M (1 μ l z 0,1 mM zásobného roztoku + 1 000 μ l médium)	1 μ M (1 μ l z 1 mM zásobného roztoku + 1 000 μ l médium)	3 μ M (1 μ l z 3 mM zásobného roztoku + 1 000 μ l médium)	10 μ M (1 μ l z 10 mM zásobného roztoku + 1 000 μ l médium)	30 μ M (1 μ l z 30 mM zásobného roztoku + 1 000 μ l médium)	100 μ M (1 μ l z 100 mM zásobného roztoku + 1 000 μ l médium)	300 μ M (3 μ l z 100 mM zásobného roztoku + 1 000 μ l médium)	600 μ M (6 μ l z 100 mM zásobného roztoku + 1 000 μ l médium)	Kontrola 0,3% (3 μ l DMSO + 1 000 μ l médium)	Kontrola 0,6% (6 μ l DMSO + 1 000 μ l médium)
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Tabuľka 1 - Schematický návrh rozloženia pokusu (ovplyvňovanie resveratrolom a jeho derivátmi).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Kontrola	1 nM (1 µl z 1 µM zásobného roztoku + 1 000 µl médiu)	3 nM (1 µl z 3 µM zásobného roztoku + 1 000 µl médiu)	10 nM (1 µl z 10 µM zásobného roztoku + 1 000 µl médiu)	30 nM (1 µl z 30 µM zásobného roztoku + 1 000 µl médiu)	100 nM (1 µl z 100 µM zásobného roztoku + 1 000 µl médiu)	300 nM (1 µl z 300 µM zásobného roztoku + 1 000 µl médiu)	600 nM (1 µl z 600 µM zásobného roztoku + 1 000 µl médiu)	1 000 nM (1 µl z 1 000 µM zásobného roztoku + 1 000 µl médiu)	Kontrola	Blank + 1 µl z 6 000 µM zásobného roztoku
B												
C												
D												
E			3 000 nM (1 µl z 3 000 µM zásobného roztoku + 1 000 µl médiu)	6 000 nM (1 µl z 6 000 µM zásobného roztoku + 1 000 µl médiu)	10 000 nM (1 µl z 10 000 µM zásobného roztoku + 1 000 µl médiu)							
F												
G												
H			Blank + 1 µl z 10 000 µM zásobného roztoku									

Tabuľka 2 - Schematický návrh rozloženia pokusu (ovplyvňovanie DOX a DNR).

7.9.2 Proces ovplyvnenie bunkovej kultúry HL-60 skúmanými látkami

Postup ovplyvňovania bunkovej kultúry HL-60 sa líšil od postupu popísaného vyššie, najmä tým, že táto bunková kultúra patrí medzi suspenzné bunkové kultúry. V takomto prípade sme hneď po nasadení buniek na 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku mohli zahájiť proces ovplyvňovania buniek skúmanými látkami. Zo zásobných roztokov a kultivačného média sme do sterilnej mikroskúmavky pripravili roztok skúmanej látky a média v koncentrácii 0,2; 2; 6; 20; 60; 200; 600; 1 200 µM. Táto koncentrácia sa týkala resveratrolu a jeho derivátov. V prípade daunorubicínu sme nasadzovali koncentrácie 2; 6; 20; 60; 200; 600; 1 200; 2 000; 6 000; 12 000; 20 000 nM. Do jednotlivej sterilnej mikroskúmavky sme vždy pridali 1 µl zásobného roztoku požadovanej koncentrácie a 500 µl média, ktoré bolo predom vytemperované vo vodnom kúpeli na teplotu 37°C. Do každej z jamiek mikrotitračnej doštičky sa následne pridalo 50 µl roztoku média a skúmanej látky, tak aby celkový objem jednej jamky bol 100 µl. Bunky boli nasadené na doštičku za účelom cytotoxického experimentu v dvojnásobnej koncentrácii. Zároveň sme pridávali skúmané látky v dvojnásobnej koncentrácii. Dvojnásobná koncentrácia oboch zložiek bola použitá z dôvodu následného zriedenia zmiešaním buniek

a skúmaných látok. Rovnako ako v predošlom prípade aj tu doštička obsahovala jamky, ktoré označujeme ako kontrola a blank. Podrobné rozloženie doštičky s príslušnými koncentráciami je znázornené nižšie (Tabuľka 3 a Tabuľka 4). Mikrotitračná doštička bola následne označená, vložená do bunkového inkubátora a inkubovaná za štandardných podmienok po dobu 72 hodín.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Kontrola 0,1% (1 μ l DMSO + 500 μ l médium)	0,1 μ M (1 μ l z 0,1 mM zásobného roztoku + 500 μ l médium)	1 μ M (1 μ l z 1 mM zásobného roztoku + 500 μ l médium)	3 μ M (1 μ l z 3 mM zásobného roztoku + 500 μ l médium)	10 μ M (1 μ l z 10 mM zásobného roztoku + 500 μ l médium)	30 μ M (1 μ l z 30 mM zásobného roztoku + 500 μ l médium)	100 μ M (1 μ l z 100 mM zásobného roztoku + 500 μ l médium)	300 μ M (3 μ l z 100 mM zásobného roztoku + 500 μ l médium)	600 μ M (6 μ l z 100 mM zásobného roztoku + 500 μ l médium)	Kontrola 0,3% (3 μ l DMSO + 500 μ l médium)	Kontrola 0,6% (6 μ l DMSO + 500 μ l médium)
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

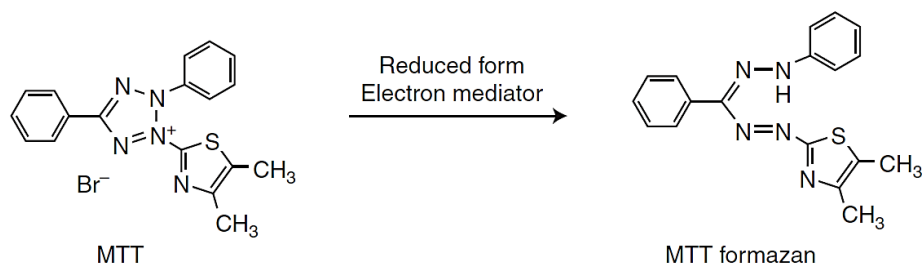
Tabuľka 3 - Schematický návrh rozloženia pokusu (ovplyvňovanie resveratrolom a jeho derivátmi).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Kontrola	1 nM (1 μ l z 1 μ M zásobného roztoku + 500 μ l médiu)	3 nM (1 μ l z 3 μ M zásobného roztoku + 500 μ l médiu)	10 nM (1 μ l z 10 μ M zásobného roztoku + 500 μ l médiu)	30 nM (1 μ l z 30 μ M zásobného roztoku + 500 μ l médiu)	100 nM (1 μ l z 100 μ M zásobného roztoku + 500 μ l médiu)	300 nM (1 μ l z 300 μ M zásobného roztoku + 500 μ l médiu)	600 nM (1 μ l z 600 μ M zásobného roztoku + 500 μ l médiu)	1 000 nM (1 μ l z 1 000 μ M zásobného roztoku + 500 μ l médiu)	Kontrola	Blank + 1 μ l z 10 000 μ M zásobného roztoku
B												
C												
D												
E			3 000 nM (1 μ l z 3 000 μ M zásobného roztoku + 500 μ l médiu)	6 000 nM (1 μ l z 6 000 μ M zásobného roztoku + 500 μ l médiu)	10 000 nM (1 μ l z 10 000 μ M zásobného roztoku + 500 μ l médiu)							
F												
G												
H			Blank + 1 μ l z 10 000 μ M zásobného roztoku									

Tabuľka 4 - Schematický návrh rozloženia pokusu (ovplyvňovanie DNR)

7.10 Stanovenie a vyhodnotenie antiproliferačného účinku skúmaných látok

Inhibícia proliferácie bunkových línií bola stanovená pomocou metódy MTT. Metódu MTT zaradujeme medzi jeden z najpoužívanejších a najznámejších testov. Podstatou metódy je premena žltého, vo vode rozpustného farbiva MTT [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium bromid] na formazan, ktorý je fialový a vo vode nerozpustný. Táto premena vzniká pôsobením mitochondriálnej reductázy u živých buniek. Tento test je veľmi citlivý a vykazuje vynikajúcu linearitu. Zároveň je štandardizovaný pre bunkové línie adherentné aj neadherentné (Kumar, Nagarajan, and Uchil 2018).



Obrázok 8 - Redukcia MTT na MTT formazan.

Na začiatku sme si do 50 ml skúmavky s uzáverom pripravili ekvivalentné množstvo MTT roztoku v PBS s koncentráciou 3 mg/ml. Takto pripravený roztok bol vytemperovaný na teplotu 37 °C vo vodnom kúpeli. Na 96-jamkovú doštičku sme aplikovali do každej jamky 25 µl roztoku a za štandardných podmienok sme doštičku nechali inkubovať po dobu 3 hodín.

Po skončení 3 hodinovej inkubácie nasledovalo rozpustenie vytvoreného formazanu v organickom rozpúšťadle. Pri bunkovej línii MCF-7 môžeme odstrániť kultivačné médium vďaka adherencii buniek. Následne sme do každej jamky pridali 100 µl DMSO pomocou multikanálovej pipety. Mikrotitračná doštička bola umiestnená na laboratórnu trepačku približne na 10 minút pri rýchlosti 650 rpm. Po uplynutí tejto doby sme pomocou prístroja TECAN zmerali absorbanciu. Absorbancia bola meraná pri dvoch vlnových dĺžkach – absorpčné maximum fialového formazanu (570 nm) a referenčné meranie žltého MTT (690 nm).

V prípade neadherentnej bunkovej línie HL-60 sme vytvorené kryštály formazanu rozpúšťali v lyzačnom roztoku, ktorý sme mali pripravený ako zásobný roztok. Pri príprave 500 ml lyzačného roztoku sme použili 475 ml isopropanolu, 4,35 ml 35% HCl a 25 ml Triton-X 100. Do všetkých jamiek doštičky sme pridali 100 µl lyzačného roztoku. Takto pripravenú mikrotitračnú doštičku sme umiestnili na laboratórnu trepačku a nechali sme trepať minimálne 30 minút pri rýchlosti 650 rpm. V prípade, že sme v niektorých jamkách zaznamenali väčšie zhluky kryštálov, zvolili sme proces resuspendácie, ktorý je opísaný v kapitole bunková pasáž (7.6). Následne sme doštičku znovu umiestnili na laboratórnu trepačku a trepali ďalších 45 minút. Po uplynutí tejto doby sme tak ako v predošlom prípade merali pomocou prístroja TECAN absorbanciu pri dvoch vlnových dĺžkach. Každá koncentrácia bola analyzovaná

v technickom kvadruplikáte, z čoho sme následne získali priemernú hodnotu biologického replikátu. Pre hodnotenie štatistickej významnosti sme použili štyri biologické replikáty. Takto získané hodnoty boli upravené a vyhodnotené v MS Excel. Hodnoty boli následne normalizované, štatisticky a graficky spracované v programe GraphPad. Hodnoty IC50 (koncentrácia skúmanej látky, pri ktorej došlo k zníženiu proliferácie buniek o 50%) boli stanovené pomocou GraphPadu.

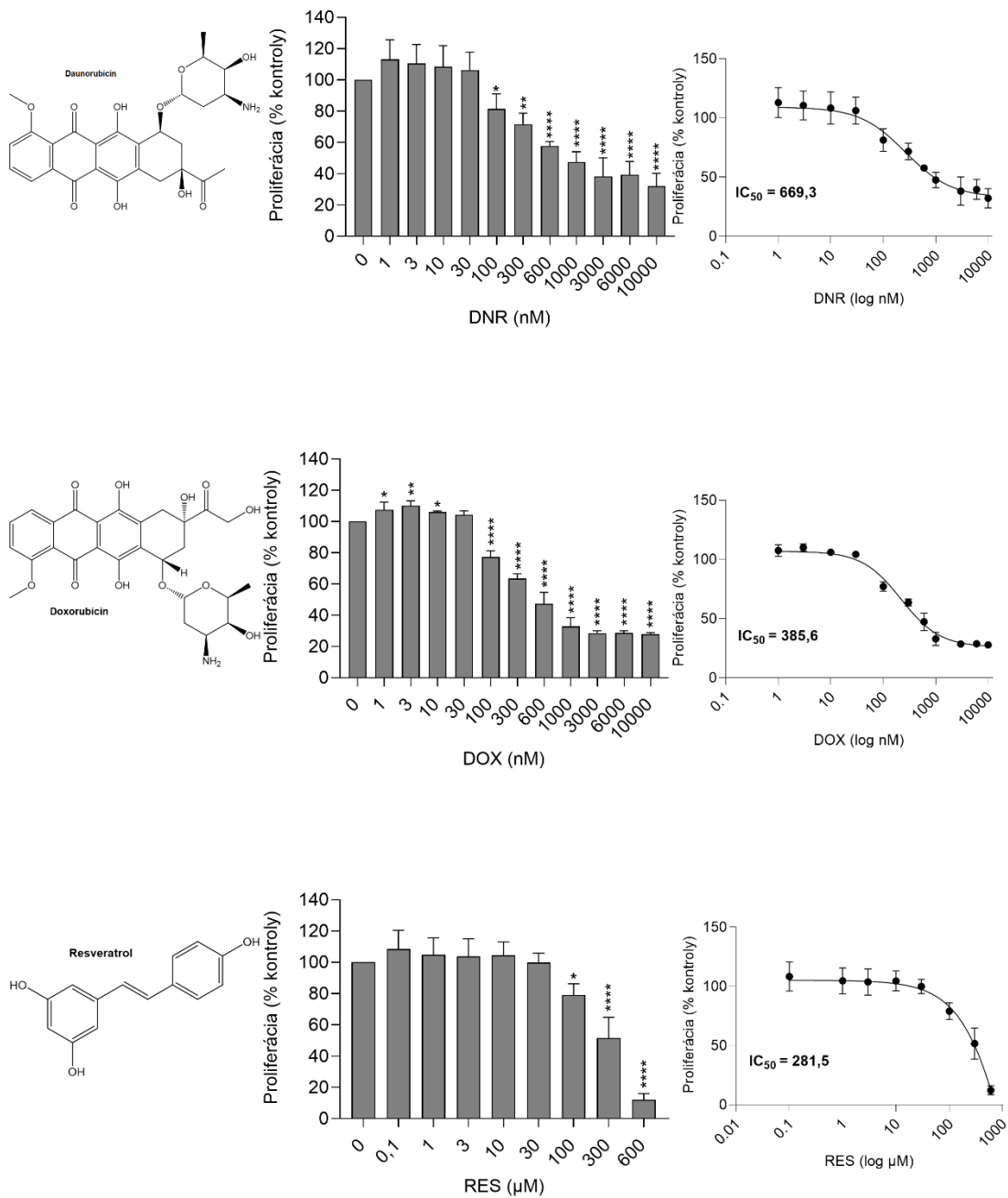
8 VÝSLEDKY

8.1 Antiproliferačné účinky na bunkovú líniu MCF-7

V tejto kapitole podrobne rozoberieme antiproliferačnú aktivitu DNR, DOX, RES a jeho analógov na bunkovej línii MCF-7.

8.1.1 Antiproliferačné účinky DNR, DOX a RES

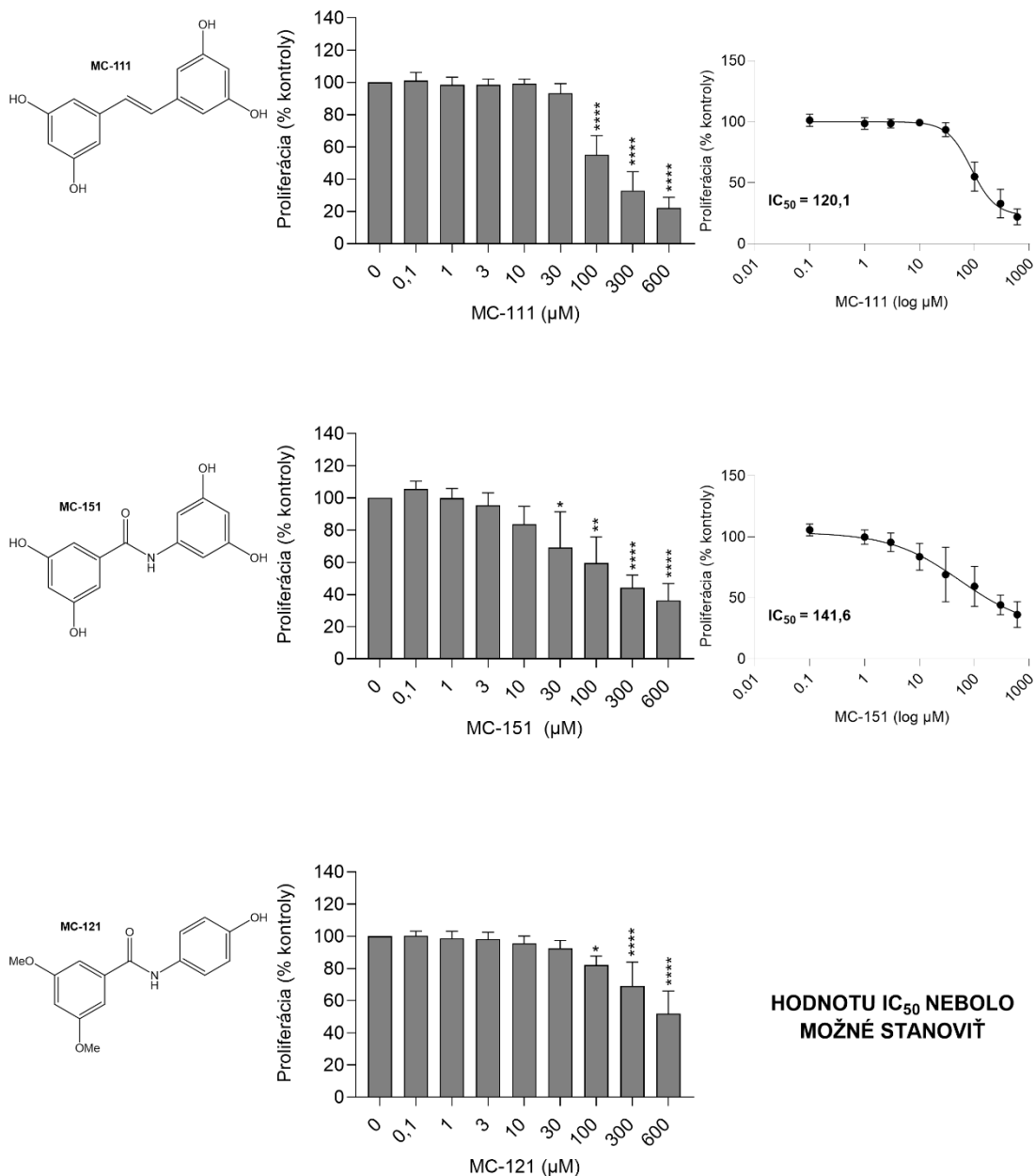
V prípade DNR štatisticky významné zníženie proliferácie buniek oproti kontrole sledujeme od koncentrácie 100 nM. Hodnota IC_{50} bola na úrovni 669,3 nM. Naproti tomu, pri DOX sledujeme štatisticky významné zníženie proliferácie buniek už pri koncentrácii DOX 1 nM. Avšak, koncentrácia DOX 30 nM prejavuje štatisticky nesignifikantné zníženie proliferácie oproti kontrole. Každá ďalšia koncentrácia prejavila štatistickú významnosť a na dávke závislé zníženie proliferácie pri hodnote IC_{50} 385,6 nM. V prípade RES bolo štatisticky významné a na dávke závislé zníženie proliferácie pozorované pri koncentrácii 100 μ M a hodnote IC_{50} 281,5 μ M.



Obrázok 9 - Vplyv DNR, DOX a RES vo vzrastajúcich koncentráciách na proliferáciu bunkovej línie MCF-7. Bunková proliferácia je vyjadrená ako priemer zo štyroch meraní spolu so smerodajnou odchýlkou. Hodnotenie štatistickej významnosti bolo vykonané pomocou One-way ANOVA s Post-hoc testom Holm-Šidák; * - štatisticky významné oproti kontrole; * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$; *** - $P \leq 0,001$; **** - $P \leq 0,0001$; stĺpce neoznačené hviezdikou – nesignifikantná štatistická významnosť.

8.1.2 Antiproliferačné účinky analógov MC-111, MC-151 a MC-121

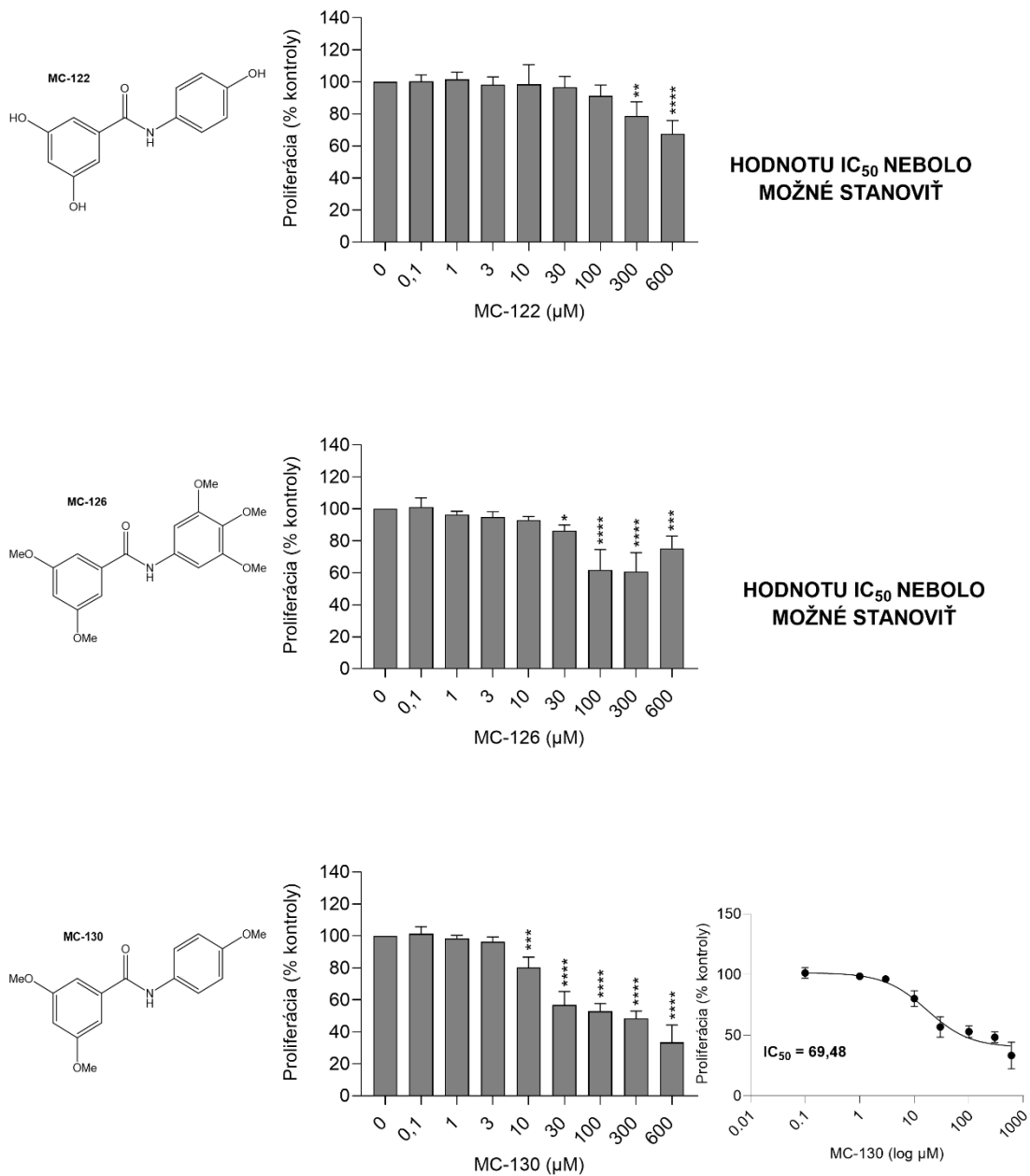
Po inkubácii buniek so skúmanými látkami je možné sledovať u derivátu MC-111 štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 100 μM . Hodnota IC_{50} bola stanovená na 120,1 μM . Pri MC-151 bolo zaznamenané štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 30 μM . Hodnota IC_{50} bola stanovená na 141,6 μM . Derivát MC-121 prejavil štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 100 μM . Hodnotu IC_{50} nebolo možné stanoviť a to v dôsledku nedostatočného antiproliferačného účinku tohto derivátu, kde ani pri najvyššej koncentrácii liečiva proliferácia buniek neklesla pod 50%.



Obrázok 10 - Vplyv MC-111,MC-151 a MC-121 vo vzrastajúcich koncentráciách na proliferáciu bunkovej línie MCF-7. Bunková proliferácia je vyjadrená ako priemer zo štyroch meraní spolu so smerodajnou odchýlkou. Hodnotenie štatistickej významnosti bolo vykonané pomocou One-way ANOVA s Post-hoc testom Holm-Šidák; * - štatistický významné oproti kontrole; * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$; *** - $P \leq 0,001$; **** - $P \leq 0,0001$; stĺpce neoznačené hviezdíčkou – nesignifikantná štatistická významnosť.

8.1.3 Antiproliferačné účinky analógov MC-122, MC-126 a MC-130

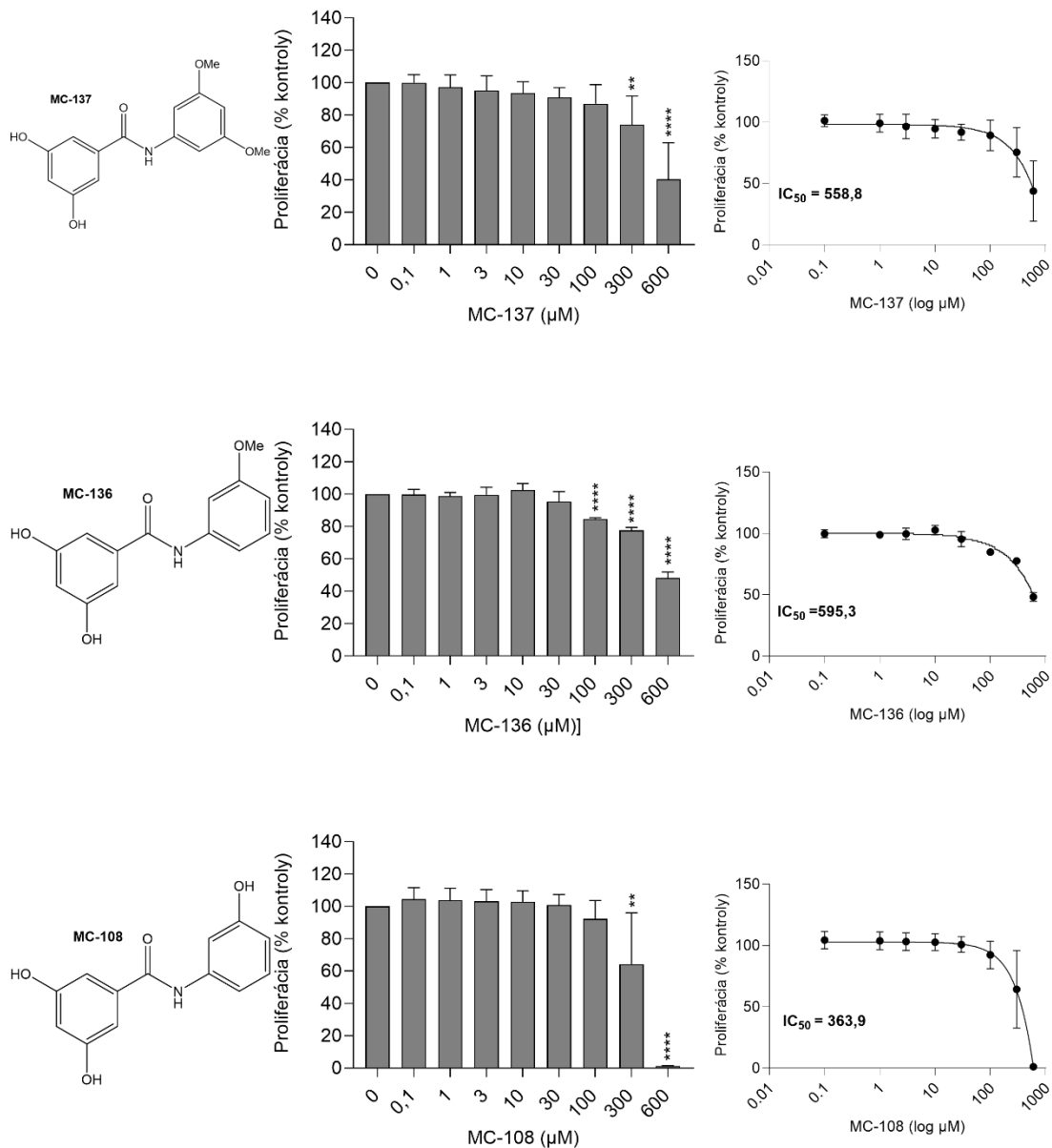
Po inkubácii buniek so skúmanými látkami je možné sledovať u derivátu MC-122 štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 300 μM . Pri MC-126 bolo zaznamenané štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 30 μM . Hodnotu IC_{50} nebolo možné stanoviť ani u jedného z týchto analógov (MC-122, MC-126) a to v dôsledku nedostatočného antiproliferačného účinku týchto derivátov, kde ani pri najvyššej koncentrácii liečiva proliferácia buniek neklesla pod 50%. Derivát MC-130 prejavil štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 10 μM . Hodnota IC_{50} bola stanovená na 69,48 μM .



Obrázok 11 - Vplyv MC-122, MC-126 a MC-130 vo vzrastajúcich koncentráciách na proliferáciu bunkovej línie MCF-7. Bunková proliferácia je vyjadrená ako priemer zo štyroch meraní spolu so smerodajnou odchýlkou. Hodnotenie štatistickej významnosti bolo vykonané pomocou One-way ANOVA s Post-hoc testom Holm-Šidák; * - štatistický významný oproti kontrole; * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$; *** - $P \leq 0,001$; **** - $P \leq 0,0001$; stĺpce neoznačené hviezdikou – nesignifikantná štatistická významnosť.

8.1.4 Antiproliferačné účinky analógov MC-137, MC-136 a MC-108

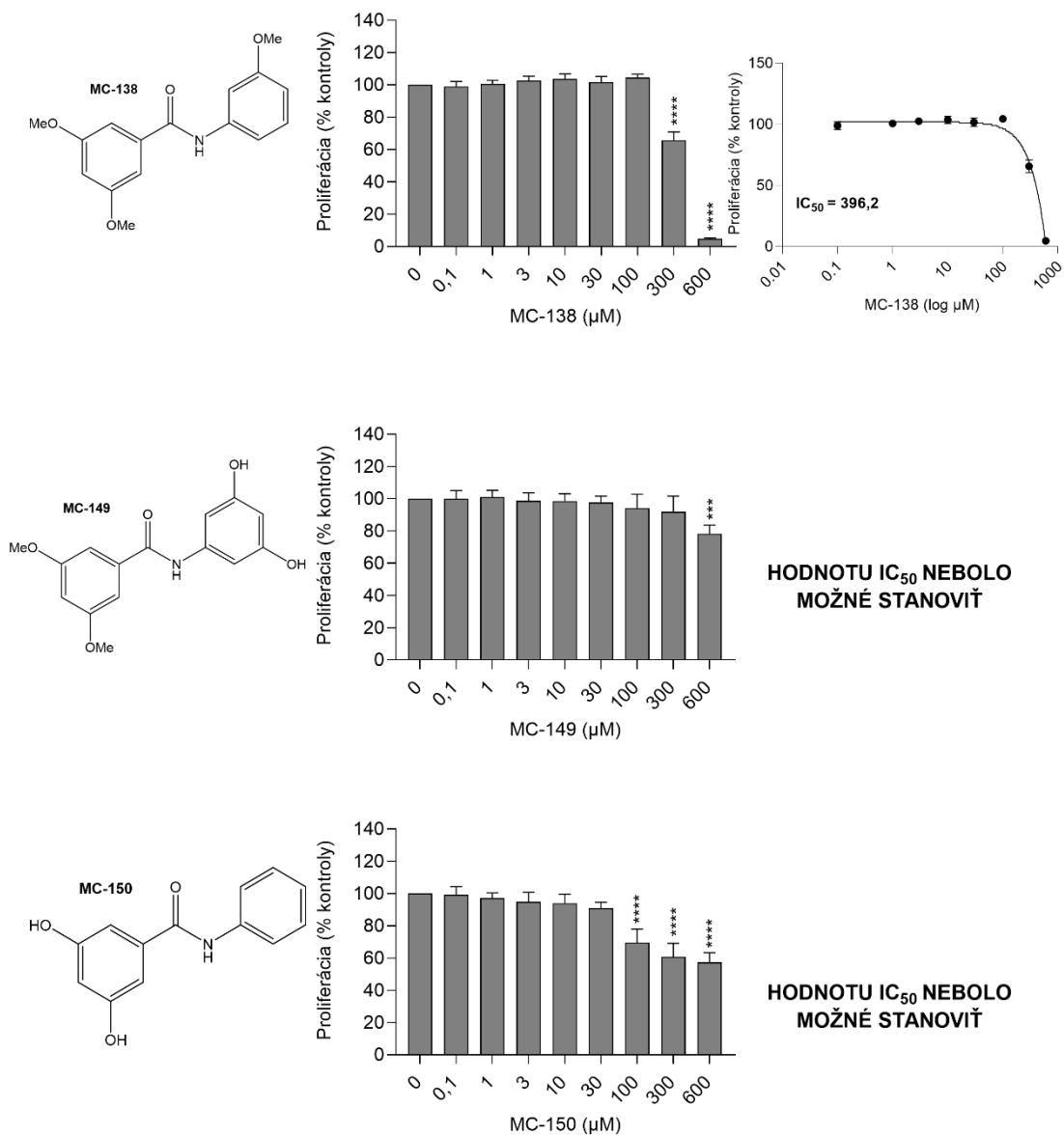
Po inkubácii buniek so skúmanými látkami je možné sledovať u derivátu MC-137 štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 300 μM . Hodnota IC_{50} bola stanovená na 558,8 μM . Pri MC-136 bolo zaznamenané štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 100 μM . Hodnota IC_{50} bola stanovená na 595,3 μM . Derivát MC-108 prejavil štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 300 μM . Hodnota IC_{50} bola stanovená na 363,9 μM .



Obrázok 12 - Vplyv MC-137, MC-136 a MC-108 vo vzrastajúcich koncentráciách na proliferáciu bunkovej línie MCF-7. Bunková proliferácia je vyjadrená ako priemer zo štyroch meraní spolu so smerodajnou odchýlkou. Hodnotenie štatistickej významnosti bolo vykonané pomocou One-way ANOVA s Post-hoc testom Holm-Šidák; * - štatistický významné oproti kontrole; * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$; *** - $P \leq 0,001$; **** - $P \leq 0,0001$; stĺpce neoznačené hviezdíčkou – nesignifikantná štatistická významnosť.

8.1.5 Antiproliferačné účinky analógov MC-138, MC-149 a MC-150

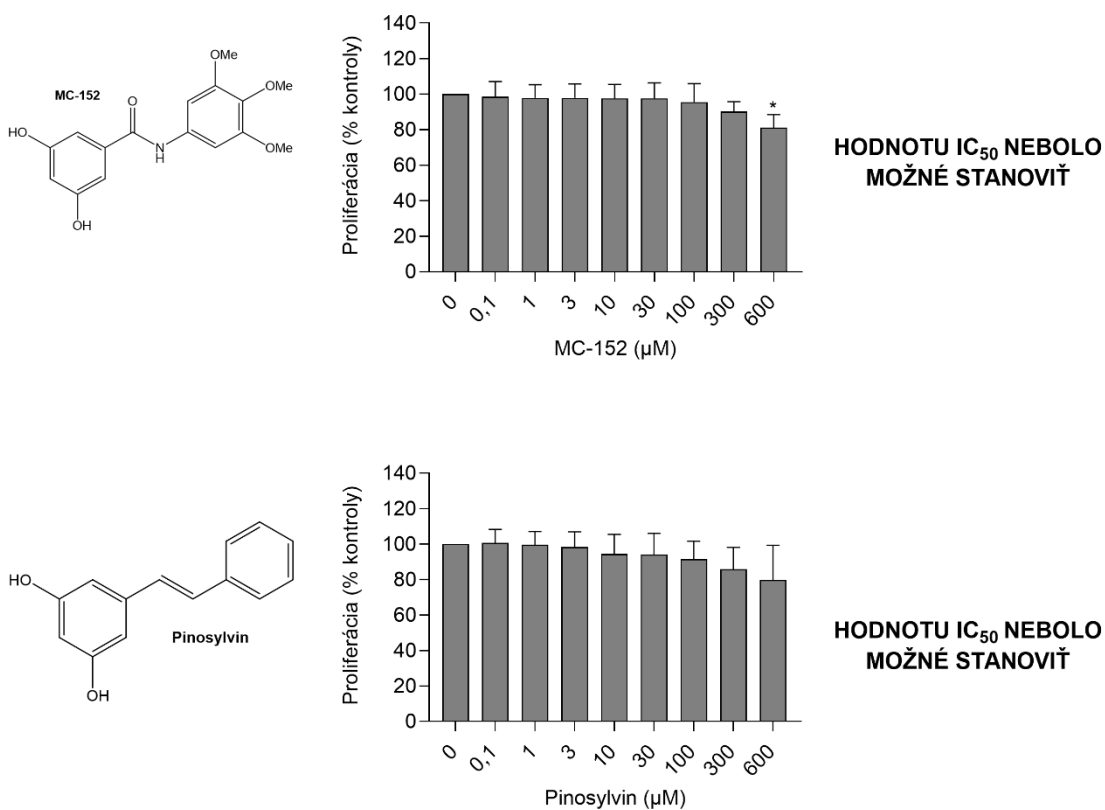
Po inkubácii buniek so skúmanými látkami je možné sledovať u derivátu MC-138 štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 300 μM . Hodnota IC_{50} bola stanovená na 396,2 μM . Pri MC-149 bolo zaznamenané štatisticky významné zníženie proliferácie pri koncentrácii 600 μM . Derivát MC-150 prejavil štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 100 μM . Hodnotu IC_{50} nebolo možné stanoviť ani u jedného z týchto analógov (MC-149, MC-150) a to v dôsledku nedostatočného antiproliferačného účinku týchto derivátov, kde ani pri najvyššej koncentrácii liečiva proliferácia buniek neklesla pod 50%.



Obrázok 13 - Vplyv MC-138, MC-149 a MC-150 vo vzrastajúcich koncentráciách na proliferáciu bunkovej línie MCF-7. Bunková proliferácia je vyjadrená ako priemer zo štyroch meraní spolu so smerodajnou odchýlkou. Hodnotenie štatistickej významnosti bolo vykonané pomocou One-way ANOVA s Post-hoc testom Holm-Šidák; * - štatistický významné oproti kontrole; * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$; *** - $P \leq 0,001$; **** - $P \leq 0,0001$; stĺpce neoznačené hviezdičkou – nesignifikantná štatistická významnosť.

8.1.6 Antiproliferačné účinky analógov MC-152 a Pinosylvinu

Po inkubácii buniek so skúšanými látkami je možné sledovať u derivátu MC-152 štatisticky signifikantné zníženie proliferácie pri koncentrácii 600 μM . Pri Pinosylvine nebolo zaznamenané štatisticky signifikantné zníženie proliferácie buniek. Hodnotu IC_{50} nebolo možné stanoviť ani u jedného z týchto analógov a to v dôsledku nedostatočného antiproliferačného účinku týchto derivátov, kde ani pri najvyššej koncentrácii liečiva proliferácia buniek neklesla pod 50%.



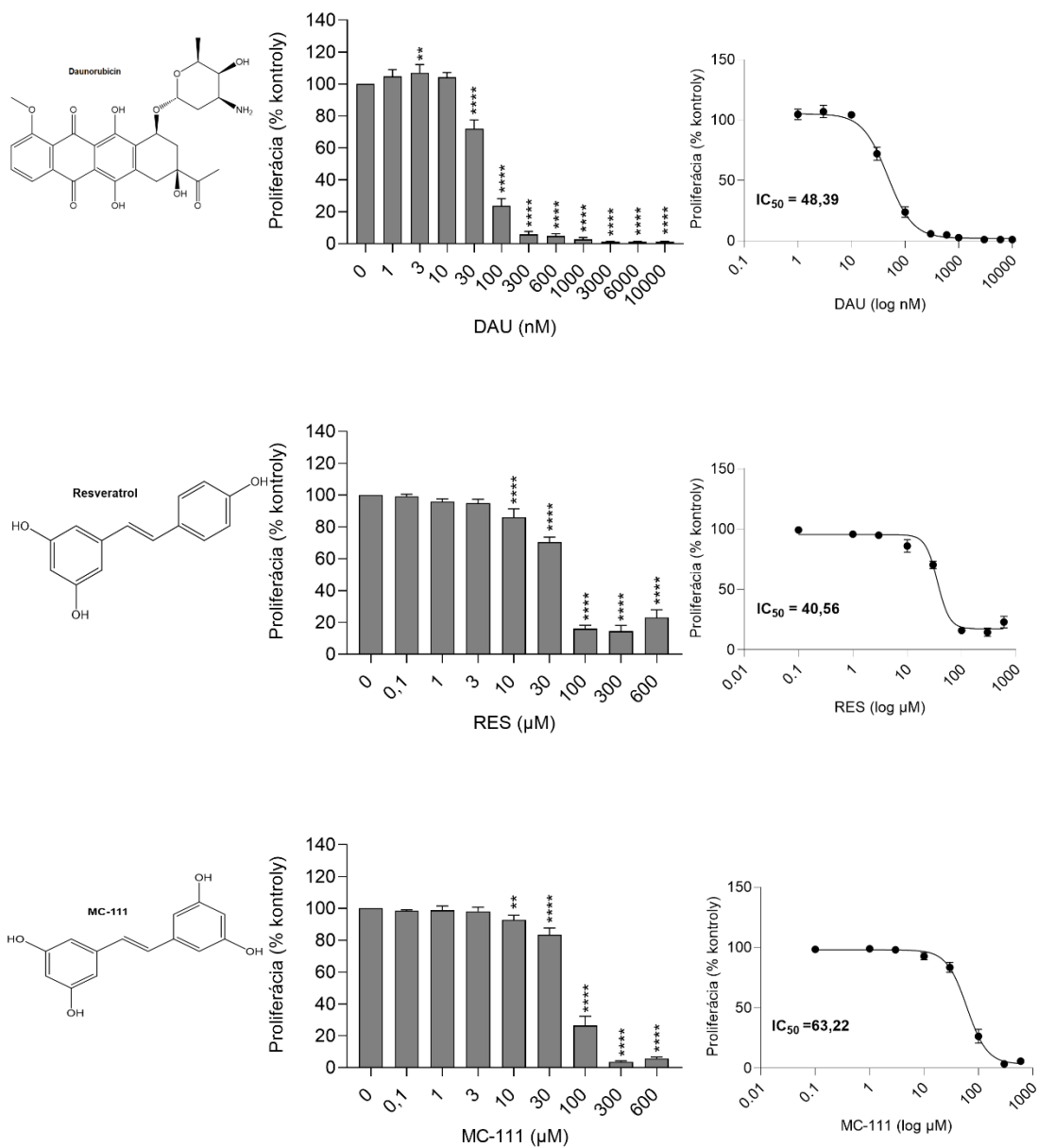
Obrázok 14 - Vplyv MC-152 a Pinosylvin vo vzrastajúcich koncentráciách na proliferáciu bunkovej línie MCF-7. Bunková proliferácia je vyjadrená ako priemer zo štyroch meraní spolu so smerodajnou odchýlkou. Hodnotenie štatistickej významnosti bolo vykonané pomocou One-way ANOVA s Post-hoc testom Holm-Šidák; * - štatisticky významné oproti kontrole; * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$; *** - $P \leq 0,001$; **** - $P \leq 0,0001$; stĺpce neoznačené hviezdikou – nesignifikantná štatistická významnosť.

8.2 Antiproliferačné účinky na bunkovú líniu HL-60

V tejto kapitole podrobne rozoberieme antiproliferačnú aktivitu DNR, RES a jeho analógov na bunkovej línii HL-60.

8.2.1 Antiproliferačné účinky DNR, RES a analógu MC-111

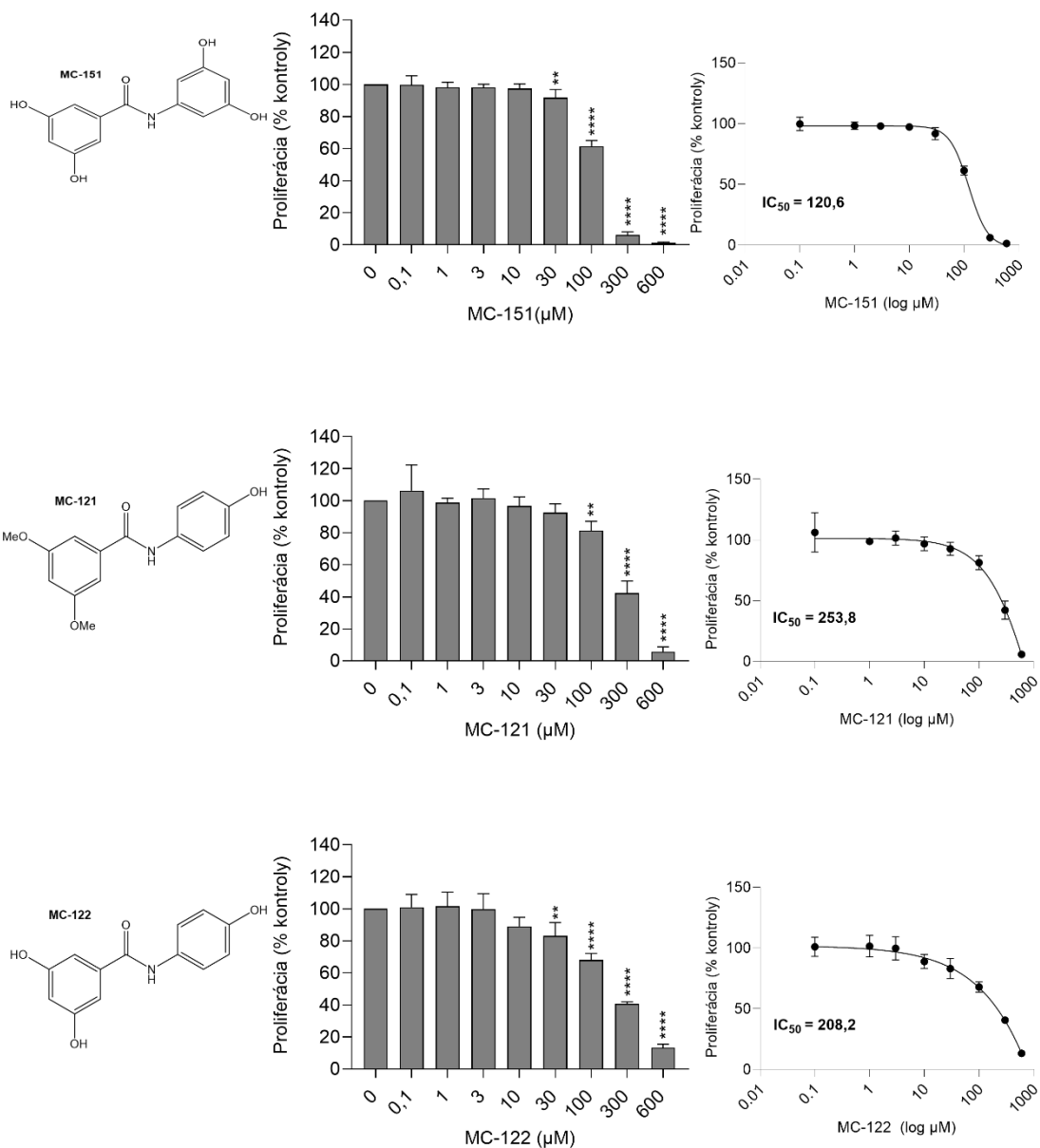
V prípade DNR štatisticky významné zníženie proliferácie buniek oproti kontrole sledujeme od koncentrácie 3 nM. Avšak, koncentrácia DNR 10 nM prejavuje štatisticky nesignifikantné zníženie proliferácie buniek oproti kontrole. Každá ďalšia koncentrácia prejavila štatistickú významnosť a na dávke závislé zníženie proliferácie pri hodnote IC_{50} 48,39 nM. V prípade RES bolo štatisticky významné a na dávke závislé zníženie proliferácie pozorované pri koncentrácii 10 μ M a hodnote IC_{50} 40,56 μ M. Pri deriváte MC-111 bola zaznamenaná štatistická významnosť na zníženie proliferácie od koncentrácie 10 μ M. Hodnota IC_{50} bola stanovená na 63,22 μ M.



Obrázok 15 - Vplyv DNR, RES a MC-111 vo vzrastajúcich koncentráciách na proliferáciu bunkovej línie HL-60. Bunková proliferácia je vyjadrená ako priemer zo štyroch meraní spolu so smerodajnou odchýlkou. Hodnotenie štatistickej významnosti bolo vykonané pomocou One-way ANOVA s Post-hoc testom Holm-Šidák; * - štatisticky významné oproti kontrole; * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$; *** - $P \leq 0,001$; **** - $P \leq 0,0001$; stĺpce neoznačené hviezdičkou – nesignifikantná štatistická významnosť.

8.2.2 Antiproliferačné účinky analógov MC-151, MC-121 a MC-122

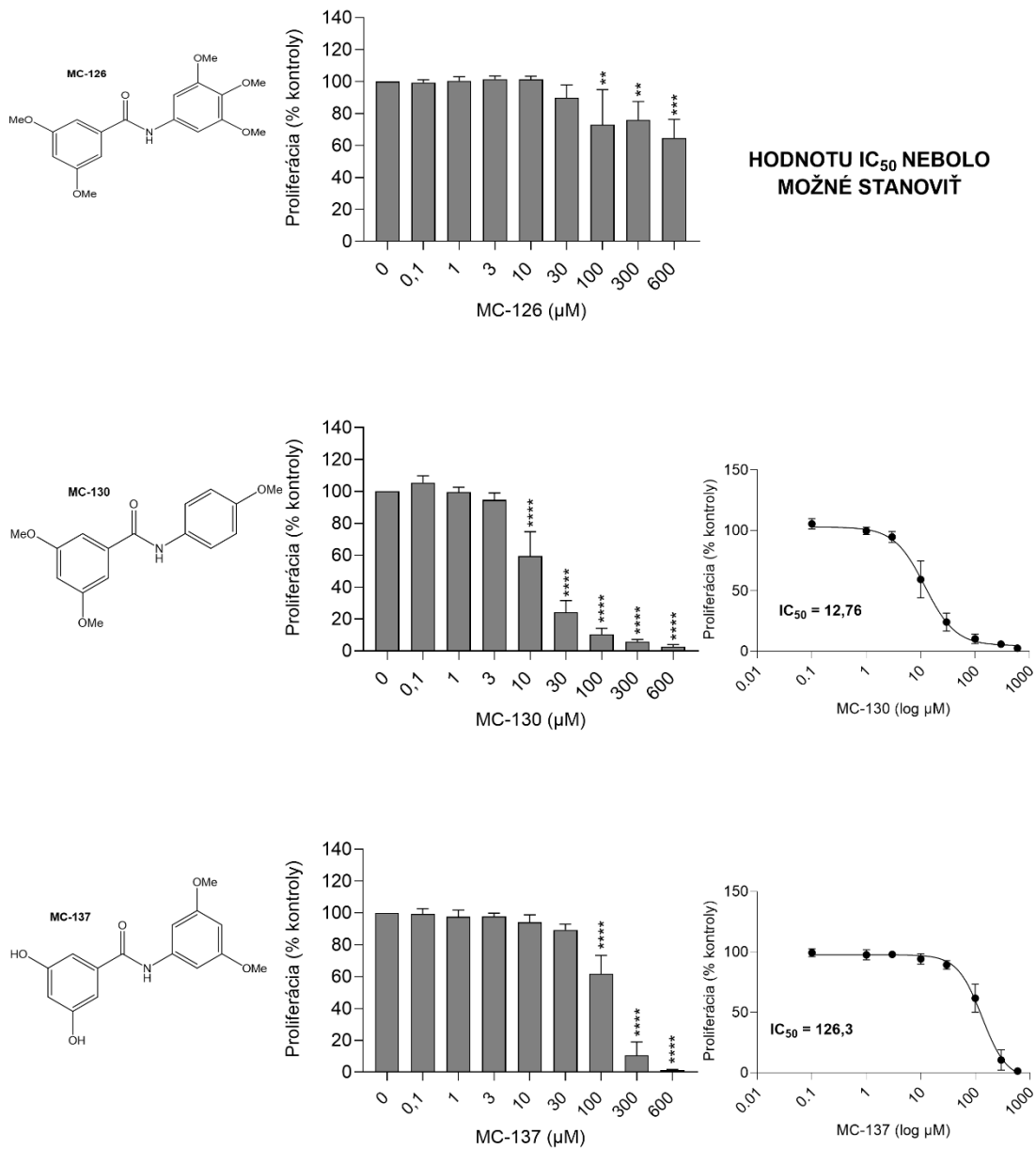
Po inkubácii buniek so skúmanými látkami je možné sledovať u derivátu MC-151 štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 30 μM . Hodnota IC_{50} bola stanovená na 120,6. Pri MC-121 bolo zaznamenané štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 100 μM . Hodnota IC_{50} bola stanovená na 253,8 μM . Derivát MC-122 prejavil štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 30 μM . Hodnota IC_{50} bola stanovená na 208,2 μM .



Obrázok 16 - Vplyv MC-151, MC-121 a MC-122 vo vzrastajúcich koncentráciách na proliferáciu bunkovej línie HL-60. Bunková proliferácia je vyjadrená ako priemer zo štyroch meraní spolu so smerodajnou odchýlkou. Hodnotenie štatistickej významnosti bolo vykonané pomocou One-way ANOVA s Post-hoc testom Holm-Šidák; * - štatistický významné oproti kontrole; * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$; *** - $P \leq 0,001$; **** - $P \leq 0,0001$; stĺpce neoznačené hviezdíčkou – nesignifikantná štatistická významnosť.

8.2.3 Antiproliferačné účinky analógov MC-126, MC-130 a MC-137

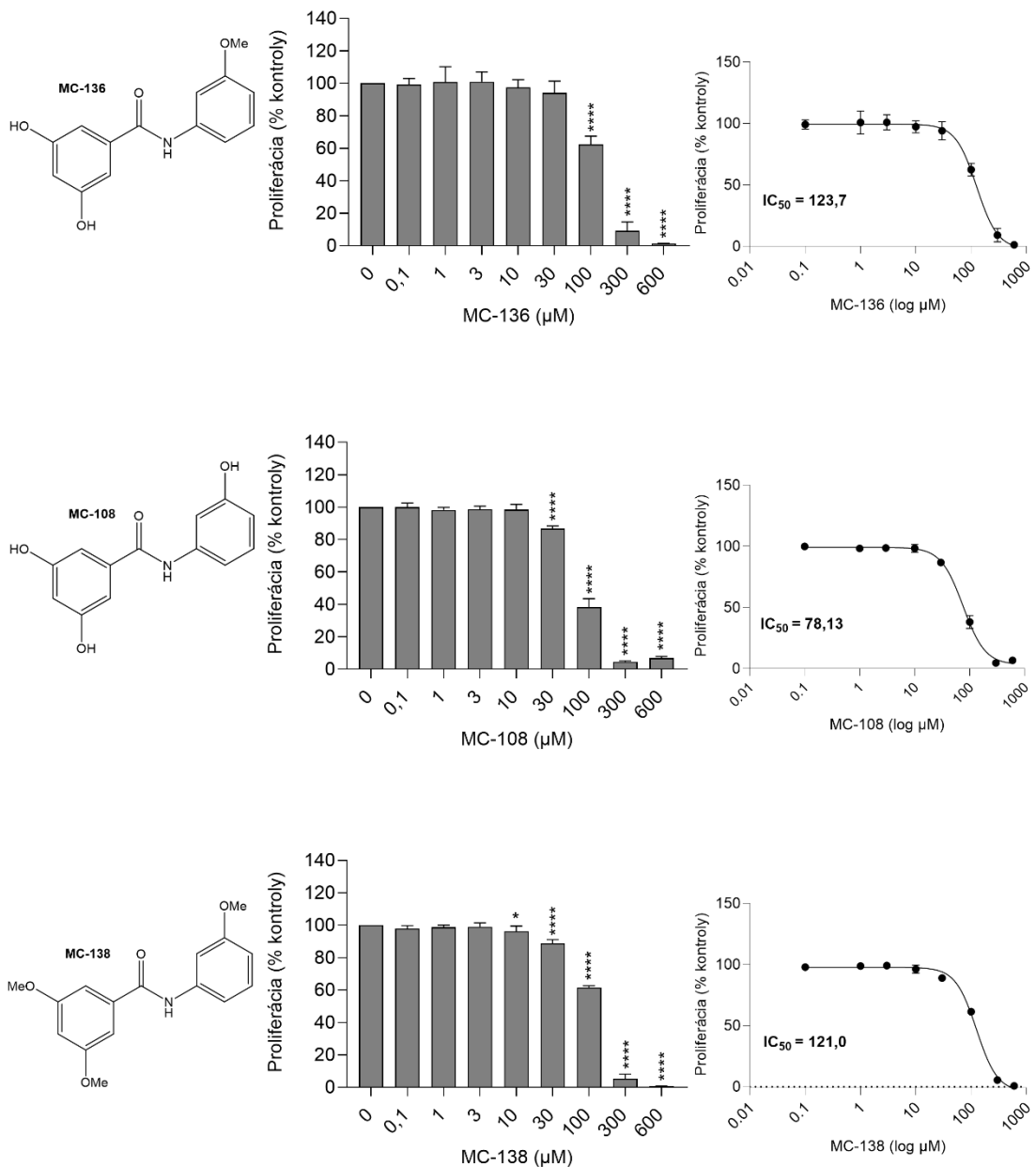
Po inkubácii buniek so skúmanými látkami je možné sledovať u derivátu MC-126 štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 100 μM . Hodnotu IC_{50} nebolo možné stanoviť a to v dôsledku nedostatočného antiproliferačného účinku tohto derivátu, kde ani pri najvyššej koncentrácii liečiva proliferácia buniek neklesla pod 50%. Pri MC-130 bolo zaznamenané štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 10 μM . Hodnota IC_{50} bola stanovená na 12,76 μM . Derivát MC-137 prejavil štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 100 μM . Hodnota IC_{50} bola stanovená na 126,3 μM .



Obrázok 17 - Vplyv MC-126, MC-130 a MC-137 vo vzrastajúcich koncentráciách na proliferáciu bunkovej línie HL-60. Bunková proliferácia je vyjadrená ako priemer zo štyroch meraní spolu so smerodajnou odchýlkou. Hodnotenie štatistickej významnosti bolo vykonané pomocou One-way ANOVA s Post-hoc testom Holm-Šidák; * - štatistický významné oproti kontrole; * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$; *** - $P \leq 0,001$; **** - $P \leq 0,0001$; stĺpce neoznačené hviezdíčkou – nesignifikantná štatistická významnosť.

8.2.4 Antiproliferačné účinky analógov MC-136, MC-108 a MC-138

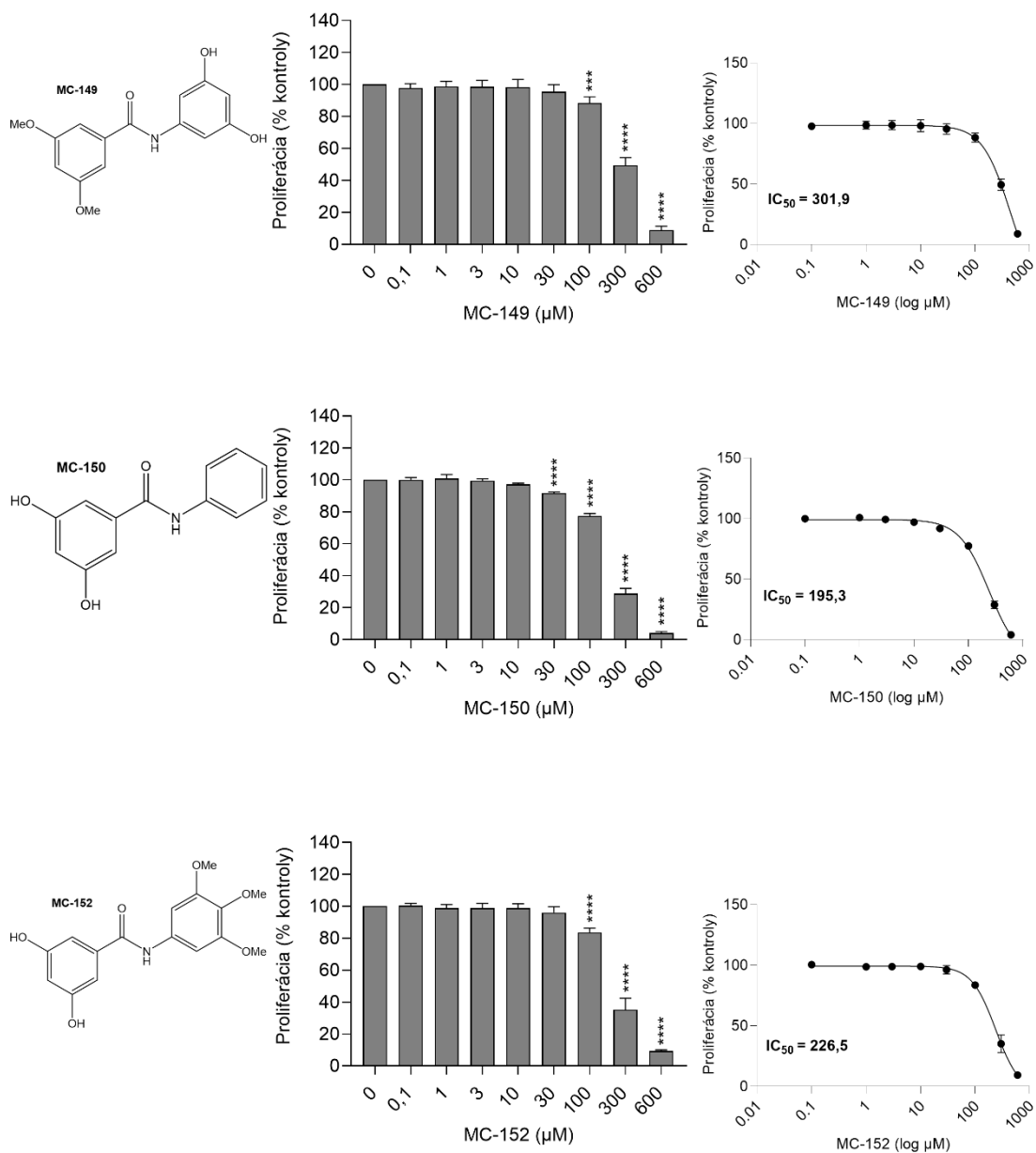
Po inkubácii buniek so skúmanými látkami je možné sledovať u derivátu MC-136 štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 100 μM . Hodnota IC_{50} bola stanovená na 123,7 μM . Pri MC-108 bolo zaznamenané štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 30 μM . Hodnota IC_{50} bola stanovená na 78,13 μM . Derivát MC-138 prejavil štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 10 μM . Hodnota IC_{50} bola stanovená na 121,0 μM .



Obrázok 18 - Vplyv MC-136, MC-108 a MC-138 vo vzrastajúcich koncentráciách na proliferáciu bunkovej línie HL-60. Bunková proliferácia je vyjadrená ako priemer zo štyroch meraní spolu so smerodajnou odchýlkou. Hodnotenie štatistickej významnosti bolo vykonané pomocou One-way ANOVA s Post-hoc testom Holm-Šidák; * - štatistický významné oproti kontrole; * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$; *** - $P \leq 0,001$; **** - $P \leq 0,0001$; stĺpce neoznačené hviezdíčkou – nesignifikantná štatistická významnosť.

8.2.5 Antiproliferačné účinky analógov MC-149, MC-150 a MC-152

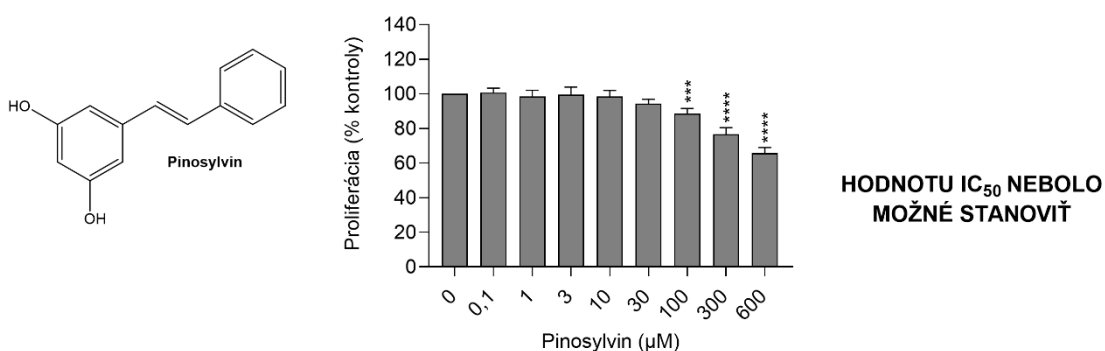
Po inkubácii buniek so skúmanými látkami je možné sledovať u derivátu MC-149 štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 100 μM . Hodnota IC_{50} bola stanovená na 301,9 μM . Pri MC-150 bolo zaznamenané štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 30 μM . Hodnota IC_{50} bola stanovená na 195,3 μM . Derivát MC-152 prejavil štatisticky významné zníženie proliferácie od koncentrácie 100 μM . Hodnota IC_{50} bola stanovená na 226,5 μM .



Obrázok 19 - Vplyv MC-149, MC-150 a MC-152 vo vzrastajúcich koncentráciách na proliferáciu bunkovej línie HL-60. Bunková proliferácia je vyjadrená ako priemer zo štyroch meraní spolu so smerodajnou odchýlkou. Hodnotenie štatistickej významnosti bolo vykonané pomocou One-way ANOVA s Post-hoc testom Holm-Šidák; * - štatistický významné oproti kontrole; * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$; *** - $P \leq 0,001$; **** - $P \leq 0,0001$; stĺpce neoznačené hviezdíčkou – nesignifikantná štatistická významnosť.

8.2.6 Antiproliferačné účinky Pinosylvinu

Pri Pinosylvine bolo zaznamenané štatisticky signifikantné zníženie proliferácie buniek od koncentrácie 100 μM . Hodnotu IC_{50} nebolo možné stanoviť a to v dôsledku nedostatočného antiproliferačného účinku tohto derivátu, kde ani pri najvyššej koncentrácii liečiva proliferácia buniek neklesla pod 50%.



Obrázok 20 - Vplyv Pinosylvinu vo vzrastajúcej koncentrácii na proliferáciu bunkovej línie HL-60. Bunková proliferácia je vyjadrená ako priemer zo štyroch meraní spolu so smerodajnou odchýlkou. Hodnotenie štatistickej významnosti bolo vykonané pomocou One-way ANOVA s Post-hoc testom Holm-Šidák; * - štatisticky významné oproti kontrole; * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$; *** - $P \leq 0,001$; **** - $P \leq 0,0001$; stĺpce neoznačené hviezdíčkou – nesignifikantná štatistická významnosť.

9 DISKUSIA

Antracyklíny sú súčasťou najúčinnnejšej klasickej terapie v protinádorovej liečbe. Klinické použitie týchto liečiv je obmedzené kardiotoxicitou, ktorá patrí medzi ich častý nežiaduci účinok. Nedávne štúdie potvrdili, že cieľom antracyklínov v kardiomyocytoch je TOP II β (Keresteš et al. 2024).

V rámci tejto práce sme pracovali s dvomi bunkovými líniami, ktoré tvorili základ pre hodnotenie antiproliferačnej aktivity ANT a to DOX a DAU. Bunková línia MCF-7 je líniou karcinómu prsníka, ktorá je využívaná mnohými výskumnými skupinami už viac ako 40 rokov (Chen, Liu, and Yan 2022). Bunková línia HL-60 predstavuje bunky akútnej myeloidnej leukémie. Táto bunková línia patrí medzi suspenzné bunkové línie, v ktorých bunky rastú v suspenzii v médiu. Umožňuje nám sledovať pochody, ktoré sú zamerané na proliferáciu a diferenciáciu leukemických buniek (Collins 1987).

Výsledky naznačujú predpokladaný antiproliferačný účinok ANT pri bunkových líniiach MCF-7 a HL-60. Hodnoty IC₅₀ pri MCF-7 bunkovej línii poukazujú na nižšiu účinnosť DNR (IC₅₀ = 669,3 nM) ako DOX (IC₅₀ = 385,6 nM), čo je zrovnateľné napríklad so štúdiou (Lovitt, Shelper, and Avery 2018), kde IC₅₀ pre DOX bola 225,2 \pm 64,2 nM. Antiproliferačné účinky DNR na bunkovej línii HL-60 boli stanovené na hodnotu IC₅₀ = 48,39 nM, čo je vyššie ako predchádzajúce výsledky našej výskumnej skupiny (IC₅₀ = 19 nM), ale stále zrovnateľné (Jirkovska et al. 2013). Hodnotenie antiproliferačného účinku DOX a DNR v rámci tejto práce bolo na začiatku zamýšľané so zámerom vytvoriť kombinácie DOX a DNR s RES a jeho novo syntetizovanými analógmi hlavne na bunkovej línii MCF-7. Avšak, nakoniec sme sa rozhodli pre skúmanie antiproliferačného účinku aj na bunkovej línii HL-60 a kombinačné štúdie vykonať v ďalšom výskume.

RES (3,4',5-trihydroxy-trans-stilbén), prirodzene vyskytujúci sa fytoalexín je produkovaný rastlinami za úlohou ich ochrany pred stresom a patogénmi. Najväčšiu popularitu získal po tom ako sa zistilo, že RES vyskytujúci sa v červenom víne má kardioprotektívny účinok. V roku 1997 sa ukázali jeho protinádorové účinky, ktoré zabraňovali nádorovému šíreniu u karcinómu kože u myší (Jang et al. 1997). RES sa vyskytuje v dvoch geometrických izoméroch. Väčšiu stabilitu prejavuje trans-izomér, ktorý nesie protinádorové a zdravotné účinky RES. Napriek tomu, tento izomér podlieha

vplyvom UV žiarenia a vysokému pH premene na cis-izomér, ktorý nie je stabilný. Chemoprotektívne účinky RES môžeme sledovať v štyroch hlavných krokoch karcinogenézy, a to v štádiu iniciácie, propagácie, progresie a metastázovania. Jeho účinnosť v protinádorovej terapii bola potvrdená *in vitro* a súčasne aj *in vivo*. Vlastnosti RES ho predurčujú k zabezpečeniu doplnkovej terapie pri konvenčnej chemoterapii. Toxicita RES je podmienená jeho dávkou a dĺžkou trvania liečby. Jednorazové dávky RES, ktoré nepresiahnu 1 g na deň liečby predstavujú malé alebo dokonca žiadne nežiaduce účinky. Pri dávke nad 0,5 g/deň, ktorá bola podávaná počas jedného mesiaca sa môžu objaviť mierne nežiaduce účinky ako nevoľnosť, hnačka, bolesť hlavy alebo vyrážka. Vo všeobecnosti sa ale RES považuje za dobre tolerované liečivo pri dávke pod 1 g/deň (Ren et al. 2021).

In vitro štúdie potvrdili proapoptický účinok RES na bunkách adenokarcinómu prostaty (LNCaP), na bunkách prsného karcinómu (MCF-7), na HeLa bunkách a na bunkách karcinómu pečene (HepG2) (Meng et al. 2020). Ďalej sa potvrdil účinok RES pri potláčaní rastu kolorektálneho karcinómu (HCT116) (Berretta et al. 2020). Pokles bunkovej proliferácie a viability spojený s procesom apoptózy je účinkom RES na bunkách ľudskej epitelovej rakoviny pľúc (NCI-H460) (Wright et al. 2017) a na ľudských leukemických bunkách (HL-60) (Fan et al. 2018). Hodnoty IC₅₀ zistené v rámci štúdií boli stanovené u bunkovej línie MCF-7 na hodnotu 131,0 μM (Schmidt, et al. 2020), a pri bunkovej línie HL-60 po 48 hodinovej inkubácii na hodnotu 30 μM (Fan, et al. 2018). Pričom nami nameraná hodnota IC₅₀ bola stanovená na 281,5 μM pri bunkovej línie MCF- 7, a pri bunkovej línie HL-60 na hodnotu 40,56 μM.

Štúdie vykonané Demoulinom *et al.* klasifikujú RES ako TOP II jed, ktorý stabilizuje kovalentný medziprodukt enzým-DNA a vyvoláva stimul na spustenie apoptózy závislej od p53. Tieto štúdie zároveň potvrdili, že RES je menej účinný ako etopozid a na dorovnanie jeho účinku by sme museli použiť koncentráciu RES, ktorá bude 2-4 krát vyššia (Demoulin et al. 2015). Na druhej strane, novšie štúdie vykonané Lee *et al.* ukazujú, že RES má minimálnu alebo žiadnu schopnosť vystupovať ako jed TOP II, ale naopak má schopnosť inhibovať aktivitu ATPázy a vystupuje ako katalytický inhibítor TOP II. Liečivá patriace do tejto skupiny preukázali efekt spojený s kardioprotektívnym a protinádorovým účinkom (Lee, Wendorff, and Berger 2017).

Po preukázaní kardioprotektívnych a protinádorových účinkov RES, ktoré majú pravdepodobne súvis s inhibíciou TOP II sme sa zamerali na hľadanie nových liečiv, ktoré by mohli byť potencionálne účinnejšie ako RES.

Hľadanie nových liečiv, ktoré ovplyvňujú TOP II je dôležitým aspektom v boji proti rakovine a rovnako aj pre vývoj nových terapeutických stratégií (Nitiss 2009).

Analógy RES boli syntetizované výskumnou skupinou doc. Roha na Katedre organickej a bioorganickej chémie (Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova). Jednotlivé analógy RES sa líšili polohou a počtom methoxylových a hydroxylových skupín. Pinosylvín a analóg MC-111 mali rovnaký základný skelet ako RES. Ostatné analógy mali namiesto spojovacieho eténu naviazanú amidovú skupinu.

RES a jeho novo syntetizované deriváty boli vo všeobecnosti menej úspešné pri bunkovej línii MCF-7, nakoľko sledujeme, že hodnotu IC_{50} sme neboli schopný stanoviť u derivátov MC-121, MC-122, MC-126, MC-149, MC-150, MC-152 a Pinosylvínu, pretože nedošlo k zníženiu proliferácie buniek pod 50% oproti kontrole. Koncentrácia RES a jeho derivátov potrebná na zníženie proliferácie buniek na polovicu bola približne 1 000x vyššia, ako u DOX alebo DNR. Najvyšší antiproliferačný účinok pri tejto bunkovej línii predstavoval analóg MC-130, kde hodnota IC_{50} bola 69,48 μ M.

RES a jeho analógy predstavovali u bunkovej línii HL-60 potencionálne lepší účinok. Analógy, ktoré neznižovali bunkovú proliferáciu pod 50% sú Pinosylvín a MC-126, z tohto dôvodu sme neboli schopný stanoviť hodnotu IC_{50} a to v dôsledku nedostatočnej antiproliferačnej aktivity. Rovnako ako pri bunkovej línii MCF-7, aj pri tejto bunkovej línii sme na zníženie proliferácie buniek na polovicu využívali koncentráciu, ktorá bola približne 1 000x vyššia ako koncentrácia DNR. Platia rovnaké podmienky ako v prípade bunkovej línie MCF-7. Najvyššiu inhibíciu proliferácie sledujeme u analógu MC-130, kde hodnota IC_{50} bola 12,76 μ M.

Antiproliferačné účinky RES preukazovali štatisticky signifikantné a na dávke závislé zníženie bunkovej viability pri oboch bunkových líniiach. V prípade bunkovej línie MCF-7 bola hodnota $IC_{50} = 281,5 \mu$ M a pri bunkovej línii HL-60 bola hodnota $IC_{50} = 40,56 \mu$ M. Na základe porovnania hodnôt IC_{50} je zrejmé, že RES má silnejší antiproliferačný účinok na bunkovej línii HL-60. Účinok analógu MC-111 na pokles bunkovej viability predstavoval silnejší účinok pri bunkovej línii HL-60

($IC_{50} = 63,22 \mu M$) ako pri bunkovej línii MCF-7 ($IC_{50} = 120,1 \mu M$). Rovnako pôsobil aj analóg MC-151, ktorého hodnoty IC_{50} boli stanovené u HL-60 na $120,6 \mu M$ a pri MCF-7 na $141,6 \mu M$. Vyššia antiproliferačná aktivita bola zaznamenaná pri bunkovej línii HL-60 aj u analógov MC-137 ($IC_{50} = 126,3$), MC-136 ($IC_{50} = 123,7$), MC-108 ($IC_{50} = 78,13 \mu M$), MC-139 ($IC_{50} = 121,0 \mu M$) pričom, rovnaké analógy, ale u MCF-7 naberali hodnoty MC-137 ($IC_{50} = 558,8 \mu M$), MC-136 ($595,3 \mu M$), MC-108 ($IC_{50} = 363,9$) a MC-138 ($IC_{50} = 396,2 \mu M$). Zvyšné analógy MC-121 ($IC_{50} = 253,8 \mu M$), MC-122 ($IC_{50} = 208,2 \mu M$), MC-149 ($IC_{50} = 301,9 \mu M$), MC-150 ($IC_{50} = 195,3 \mu M$) a MC-152 ($IC_{50} = 226,5 \mu M$) prejavili štatisticky významné a na dávke závislé zníženie bunkovej proliferácie oproti kontrole len pri bunkovej línii HL-60.

Najväčšia limitácia použitia RES je jeho zlá rozpustnosť a nízka biologická dostupnosť po perorálnom podaní. Zlepšiť jeho biologickú dostupnosť môžeme inkorporáciou RES do micel alebo lipozómov. V súčasnosti sa stále populárnejšími stávajú nanotechnológie, ktoré sa taktiež podieľajú na zvyšovaní rozpustnosti a biologickej dostupnosti RES. Nanoformulácie sa zdajú byť preferované a to hlavne z dôvodu ich selektívneho pôsobenia na konkrétne miesta a znižovania toxicity (Ren, et al. 2021).

Z nameraných výsledkov tejto diplomovej práce môžeme konštatovať, že samotný RES a niektoré z testovaných analógov preukázali sľubné účinky na pokles viability na bunkových líniiach MCF-7 a HL-60 a mohli by byť použité ako potencionálne účinné protinádorové liečivá. RES samotný už protinádorové účinky preukázal a to najmä na bunkových líniiach spomenutých vyššie. Jeho účinok bol však hodnotený aj na modeloch *in vivo*. Dôležité je poznamenať, že na objasnenie presného mechanizmu účinku týchto analógov sú potrebné ďalšie výskumy.

10 ZÁVER

Výsledky predkladanej diplomovej práce poukazujú na antiproliferačnú aktivitu vybraných a klinicky používaných antracyklínov a zároveň sa zaoberajú výsledkami a hodnotením antiproliferačných účinkov resveratrolu a jeho novo syntetizovaných analógov. Tieto výsledky nám pomohli získať užitočné informácie ohľadom už jestvujúcich antiproliferačných účinkoch resveratrolu a zabezpečili získať nový náhľad na analógy resveratrolu.

11 ZOZNAM SKRATIEK

ANT	antracyklíny
ATTC	americká banka bunkových línií(American Type Culture Collection)
DEX	dexrazoxan
DMEM	kultivačné médium (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNR	daunorubicín
DOX	doxorubicín
EDTA	etyléndiamínotetraoctová kyselina
ER	estrogénny receptor
FBS	fetálne bovinné sérum
HEPES	pufor; N-2-hydroxyethylpiperazín-N'-2-etánsulfónová kyselina
MHC	myozín ťažkého reťazca
mtDNA	mitochondriálna deoxyribonukleová kyselina
MTT	3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NT-proBNP	N-terminálny proB-typ natriuterického peptidu
P/S	zmes penicilín/streptomycín
PBS	fosfátový pufor
PR	progesterónový receptor
RES	resveratrol

T/E	zmes trypsín s EDTA
t-AML	akútna myeloidná leukémia
t-APL	akútna promyelocytová leukémia
TOP II	topoizomeráza II
VLEF	ľavá komora ejakčnej frakcie

12 POUŽITÁ LITERATÚRA

- Alizadehasl, A., N. Ghadimi, S. Kaveh, M. Maleki, A. Ghavamzadeh, F. Noohi, and H. Hosseinifard. 2021. "Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: A Systematic Review and Network Meta-Analysis." *Int J Clin Pharm* 43, no. 1 (Feb): 25-34. <https://dx.doi.org/10.1007/s11096-020-01146-6>.
- Andoh, T. 1998. "Bis(2,6-Dioxopiperazines), Catalytic Inhibitors of Dna Topoisomerase Ii, as Molecular Probes, Cardioprotectors and Antitumor Drugs." *Biochimie* 80, no. 3 (Mar): 235-46. [https://dx.doi.org/10.1016/s0300-9084\(98\)80006-0](https://dx.doi.org/10.1016/s0300-9084(98)80006-0).
- Armenian, S., and S. Bhatia. 2018. "Predicting and Preventing Anthracycline-Related Cardiotoxicity." *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 38 (May 23): 3-12. https://dx.doi.org/10.1200/edbk_100015.
- Austin, C. A., K. C. Lee, R. L. Swan, M. M. Khazeem, C. M. Manville, P. Cridland, A. Treumann, A. Porter, N. J. Morris, and I. G. Cowell. 2018. "Top2b: The First Thirty Years." *Int J Mol Sci* 19, no. 9 (Sep 14). <https://dx.doi.org/10.3390/ijms19092765>.
- Bayles, C. E., D. E. Hale, A. Konieczny, V. D. Anderson, C. R. Richardson, K. V. Brown, J. T. Nguyen, J. Hecht, N. Schwartz, M. K. Kharel, F. Amissah, T. C. Dowling, and S. E. Nybo. 2023. "Upcycling the Anthracyclines: New Mechanisms of Action, Toxicology, and Pharmacology." *Toxicol Appl Pharmacol* 459 (Jan 15): 116362. <https://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2022.116362>.
- Behroozaghdam, M., M. Dehghani, A. Zabolian, D. Kamali, S. Javanshir, F. Hasani Sadi, M. Hashemi, T. Tabari, M. Rashidi, S. Mirzaei, A. Zarepour, A. Zarrabi, D. De Greef, and A. Bishayee. 2022. "Resveratrol in Breast Cancer Treatment: From Cellular Effects to Molecular Mechanisms of Action." *Cell Mol Life Sci* 79, no. 11 (Oct 4): 539. <https://dx.doi.org/10.1007/s00018-022-04551-4>.
- Berretta, M., A. Bignucolo, R. Di Francia, F. Comello, G. Facchini, M. Ceccarelli, R. V. Iaffaioli, V. Quagliariello, and N. Maurea. 2020. "Resveratrol in Cancer Patients: From Bench to Bedside." *Int J Mol Sci* 21, no. 8 (Apr 22). <https://dx.doi.org/10.3390/ijms21082945>.
- Bober, Z., D. Aebisher, M. Olek, A. Kawczyk-Krupka, and D. Bartusik-Aebisher. 2022. "Multiple Cell Cultures for Mri Analysis." *Int J Mol Sci* 23, no. 17 (Sep 03). <https://dx.doi.org/10.3390/ijms231710109>.
- Bostan, M., G. G. Petrică-Matei, N. Radu, R. Hainarosie, C. D. Stefanescu, C. C. Diaconu, and V. Roman. 2020. "The Effect of Resveratrol or Curcumin on Head

- and Neck Cancer Cells Sensitivity to the Cytotoxic Effects of Cisplatin." *Nutrients* 12, no. 9 (Aug 26). <https://dx.doi.org/10.3390/nu12092596>.
- Boucek, R. J., Jr., A. Miracle, M. Anderson, R. Engelman, J. Atkinson, and D. A. Dodd. 1999. "Persistent Effects of Doxorubicin on Cardiac Gene Expression." *J Mol Cell Cardiol* 31, no. 8 (Aug): 1435-46. <https://dx.doi.org/10.1006/jmcc.1999.0972>.
- Brown, V. A., K. R. Patel, M. Viskaduraki, J. A. Crowell, M. Perloff, T. D. Booth, G. Vasilinin, A. Sen, A. M. Schinas, G. Piccirilli, K. Brown, W. P. Steward, A. J. Gescher, and D. E. Brenner. 2010. "Repeat Dose Study of the Cancer Chemopreventive Agent Resveratrol in Healthy Volunteers: Safety, Pharmacokinetics, and Effect on the Insulin-Like Growth Factor Axis." *Cancer Res* 70, no. 22 (Nov 15): 9003-11. <https://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-10-2364>.
- Buhrmann, C., M. Yazdi, B. Popper, P. Shayan, A. Goel, B. B. Aggarwal, and M. Shakibaei. 2018. "Resveratrol Chemosensitizes Tnf-B-Induced Survival of 5-Fu-Treated Colorectal Cancer Cells." *Nutrients* 10, no. 7 (Jul 12). <https://dx.doi.org/10.3390/nu10070888>.
- Capranico, G., S. Tinelli, C. A. Austin, M. L. Fisher, and F. Zunino. 1992. "Different Patterns of Gene Expression of Topoisomerase Ii Isoforms in Differentiated Tissues During Murine Development." *Biochim Biophys Acta* 1132, no. 1 (Aug 17): 43-8. [https://dx.doi.org/10.1016/0167-4781\(92\)90050-a](https://dx.doi.org/10.1016/0167-4781(92)90050-a).
- Cardinale, D., F. Iacopo, and C. M. Cipolla. 2020. "Cardiotoxicity of Anthracyclines." *Front Cardiovasc Med* 7: 26. <https://dx.doi.org/10.3389/fcvm.2020.00026>.
- Carter, L. G., J. A. D'Orazio, and K. J. Pearson. 2014. "Resveratrol and Cancer: Focus on in Vivo Evidence." *Endocr Relat Cancer* 21, no. 3 (Jun): R209-25. <https://dx.doi.org/10.1530/erc-13-0171>.
- Carvalho, C., R. X. Santos, S. Cardoso, S. Correia, P. J. Oliveira, M. S. Santos, and P. I. Moreira. 2009. "Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect." *Curr Med Chem* 16, no. 25: 3267-85. <https://dx.doi.org/10.2174/092986709788803312>.
- Champoux, J. J. 2001. "Dna Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism." *Annu Rev Biochem* 70: 369-413. <https://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.369>.
- Chan, L. L., W. L. Rice, and J. Qiu. 2020. "Observation and Quantification of the Morphological Effect of Trypan Blue Rupturing Dead or Dying Cells." *PLoS One* 15, no. 1: e0227950. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0227950>.

- Chen, G., W. Liu, and B. Yan. 2022. "Breast Cancer MCF-7 Cell Spheroid Culture for Drug Discovery and Development." *J Cancer Ther* 13, no. 3 (Mar): 117-130. <https://dx.doi.org/10.4236/jct.2022.133009>.
- Chittipolu, Ajaykumar. 2020. "Overview on the Side Effects of Doxorubicin."
- Collins, S. J. 1987. "The HL-60 Promyelocytic Leukemia Cell Line: Proliferation, Differentiation, and Cellular Oncogene Expression." *Blood* 70, no. 5 (Nov): 1233-44.
- Comşa, Ş, A. M. Cîmpean, and M. Raica. 2015. "The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 Years of Experience in Research." *Anticancer Res* 35, no. 6 (Jun): 3147-54.
- Cotino-Nájera, S., L. A. Herrera, G. Domínguez-Gómez, and J. Díaz-Chávez. 2023. "Molecular Mechanisms of Resveratrol as Chemo and Radiosensitizer in Cancer." *Front Pharmacol* 14: 1287505. <https://dx.doi.org/10.3389/fphar.2023.1287505>.
- Cummings, J., and J. F. Smyth. 1993. "DNA Topoisomerase I and II as Targets for Rational Design of New Anticancer Drugs." *Ann Oncol* 4, no. 7 (Aug): 533-43. <https://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.annonc.a058584>.
- Delgado, J. L., C. M. Hsieh, N. L. Chan, and H. Hiasa. 2018. "Topoisomerases as Anticancer Targets." *Biochem J* 475, no. 2 (Jan 23): 373-398. <https://dx.doi.org/10.1042/bcj20160583>.
- Demoulin, B., M. Hermant, C. Castrogiovanni, C. Staudt, and P. Dumont. 2015. "Resveratrol Induces DNA Damage in Colon Cancer Cells by Poisoning Topoisomerase II and Activates the ATM Kinase to Trigger P53-Dependent Apoptosis." *Toxicol In Vitro* 29, no. 5 (Aug): 1156-65. <https://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2015.04.015>.
- Deweese, J. E., and N. Osheroff. 2009. "The DNA Cleavage Reaction of Topoisomerase II: Wolf in Sheep's Clothing." *Nucleic Acids Res* 37, no. 3 (Feb): 738-48. <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn937>.
- Drake, F. H., J. P. Zimmerman, F. L. McCabe, H. F. Bartus, S. R. Per, D. M. Sullivan, W. E. Ross, M. R. Mattern, R. K. Johnson, S. T. Crooke, and et al. 1987. "Purification of Topoisomerase II from Amsacrine-Resistant P388 Leukemia Cells. Evidence for Two Forms of the Enzyme." *J Biol Chem* 262, no. 34 (Dec 5): 16739-47.

- Fan, Y., J. F. Chiu, J. Liu, Y. Deng, C. Xu, J. Zhang, and G. Li. 2018. "Resveratrol Induces Autophagy-Dependent Apoptosis in HL-60 Cells." *BMC Cancer* 18, no. 1 (May 22): 581. <https://dx.doi.org/10.1186/s12885-018-4504-5>.
- Geisberg, C. A., and D. B. Sawyer. 2010. "Mechanisms of Anthracycline Cardiotoxicity and Strategies to Decrease Cardiac Damage." *Curr Hypertens Rep* 12, no. 6 (Dec): 404-10. <https://dx.doi.org/10.1007/s11906-010-0146-y>.
- Gewirtz, D. A. 1999. "A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin." *Biochem Pharmacol* 57, no. 7 (Apr 1): 727-41. [https://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952\(98\)00307-4](https://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00307-4).
- Gibson, Elizabeth, and Joseph Deweese. 2013. "Covalent Poisons of Topoisomerase II." *Current Topics in Pharmacology* 17 (01/01): 1-12.
- Giliarov, D. A., and I. S. Shkundina. 2012. "[Dna-Topoisomerases and Their Functions in Cell]." *Mol Biol (Mosk)* 46, no. 1 (Jan-Feb): 52-63.
- Hasinoff, B. B., K. Hellmann, E. H. Herman, and V. J. Ferrans. 1998. "Chemical, Biological and Clinical Aspects of Dexrazoxane and Other Bisdioxopiperazines." *Curr Med Chem* 5, no. 1 (Feb): 1-28.
- Hasinoff, B. B., and E. H. Herman. 2007. "Dexrazoxane: How It Works in Cardiac and Tumor Cells. Is It a Prodrug or Is It a Drug?" *Cardiovasc Toxicol* 7, no. 2: 140-4. <https://dx.doi.org/10.1007/s12012-007-0023-3>.
- Henriksen, P. A. 2018. "Anthracycline Cardiotoxicity: An Update on Mechanisms, Monitoring and Prevention." *Heart* 104, no. 12 (Jun): 971-977. <https://dx.doi.org/10.1136/heartjnl-2017-312103>.
- Hensley, M. L., K. L. Hagerty, T. Kewalramani, D. M. Green, N. J. Meropol, T. H. Wasserman, G. I. Cohen, B. Emami, W. J. Gradishar, R. B. Mitchell, J. T. Thigpen, A. Trotti, 3rd, D. von Hoff, and L. M. Schuchter. 2009. "American Society of Clinical Oncology 2008 Clinical Practice Guideline Update: Use of Chemotherapy and Radiation Therapy Protectants." *J Clin Oncol* 27, no. 1 (Jan 1): 127-45. <https://dx.doi.org/10.1200/jco.2008.17.2627>.
- Herman, E. H., V. J. Ferrans, C. E. Myers, and J. F. Van Vleet. 1985. "Comparison of the Effectiveness of (+/-)-1,2-Bis(3,5-Dioxopiperazinyl-1-Yl)Propane (Icrf-187) and N-Acetylcysteine in Preventing Chronic Doxorubicin Cardiotoxicity in Beagles." *Cancer Res* 45, no. 1 (Jan): 276-81.

- Herman, E. H., V. J. Ferrans, R. S. Young, and R. L. Hamlin. 1988. "Effect of Pretreatment with Icrf-187 on the Total Cumulative Dose of Doxorubicin Tolerated by Beagle Dogs." *Cancer Res* 48, no. 23 (Dec 1): 6918-25.
- Horacek, J. M., M. Vasatova, R. Pudil, M. Tichy, P. Zak, M. Jakl, L. Jebavy, and J. Maly. 2014. "Biomarkers for the Early Detection of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Current Status." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 158, no. 4 (Dec): 511-7. <https://dx.doi.org/10.5507/bp.2014.004>.
- Jang, M., L. Cai, G. O. Udeani, K. V. Slowing, C. F. Thomas, C. W. Beecher, H. H. Fong, N. R. Farnsworth, A. D. Kinghorn, R. G. Mehta, R. C. Moon, and J. M. Pezzuto. 1997. "Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes." *Science* 275, no. 5297 (Jan 10): 218-20. <https://dx.doi.org/10.1126/science.275.5297.218>.
- Jiang, Z., K. Chen, L. Cheng, B. Yan, W. Qian, J. Cao, J. Li, E. Wu, Q. Ma, and W. Yang. 2017. "Resveratrol and Cancer Treatment: Updates." *Ann N Y Acad Sci* 1403, no. 1 (Sep): 59-69. <https://dx.doi.org/10.1111/nyas.13466>.
- Jin, X., Y. Wei, Y. Liu, X. Lu, F. Ding, J. Wang, and S. Yang. 2019. "Resveratrol Promotes Sensitization to Doxorubicin by Inhibiting Epithelial-Mesenchymal Transition and Modulating Sirt1/B-Catenin Signaling Pathway in Breast Cancer." *Cancer Med* 8, no. 3 (Mar): 1246-1257. <https://dx.doi.org/10.1002/cam4.1993>.
- Jirkovska, Anna, Hana Jansova, Eliska Mackova, Miloslav Machacek, Pavlina Haskova, Lucie Tichotova, Martin Sterba, and Tomas Simunek. 2013. "Catalytic Inhibitors of Topoisomerase Ii Differently Modulate the Toxicity of Anthracyclines in Cardiac and Cancer Cells." *PloS one* 8 (10/07): e76676. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0076676>.
- Jirkovská, A., G. Karabanovich, J. Kubeš, V. Skalická, I. Melnikova, J. Korábečný, T. Kučera, E. Jirkovský, L. Nováková, H. Bavlovič Piskáčková, J. Škoda, M. Štěrba, C. A. Austin, T. Šimůnek, and J. Roh. 2021. "Structure-Activity Relationship Study of Dexrazoxane Analogues Reveals Icrf-193 as the Most Potent Bisdioxopiperazine against Anthracycline Toxicity to Cardiomyocytes Due to Its Strong Topoisomerase Iiβ Interactions." *J Med Chem* 64, no. 7 (Apr 8): 3997-4019. <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c02157>.
- Jirkovský, E., A. Jirkovská, H. Bavlovič-Piskáčková, V. Skalická, Z. Pokorná, G. Karabanovich, P. Kollárová-Brázdová, J. Kubeš, O. Lenčová-Popelová, Y. Mazurová, M. Adamcová, A. R. Lyon, J. Roh, T. Šimůnek, P. Štěrbová-Kovaříková, and M. Štěrba. 2021. "Clinically Translatable Prevention of Anthracycline Cardiotoxicity by Dexrazoxane Is Mediated by Topoisomerase Ii Beta and Not Metal Chelation." *Circ Heart Fail* 14, no. 11 (Nov): e008209. <https://dx.doi.org/10.1161/circheartfailure.120.008209>.

- Kapałczyńska, M., T. Kolenda, W. Przybyła, M. Zajączkowska, A. Teresiak, V. Filas, M. Ibbs, R. Bliźniak, Ł. Łuczewski, and K. Lamperska. 2018. "2d and 3d Cell Cultures - a Comparison of Different Types of Cancer Cell Cultures." *Arch Med Sci* 14, no. 4 (Jun): 910-919. <https://dx.doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>.
- Keresteš, V., J. Kubeš, L. Applová, P. Kollárová, O. Lenčová-Popelová, I. Melnikova, G. Karabanovich, M. M. Khazeem, H. B. Piskáčková, P. Štěrbová-Kovaříková, C. A. Austin, J. Roh, M. Štěrba, T. Šimůnek, and A. Jirkovská. 2024. "Exploring the Effects of Topoisomerase Ii Inhibitor Xk469 on Anthracycline Cardiotoxicity and Dna Damage." *Toxicol Sci* (Jan 30). <https://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfae008>.
- Kumar, P., A. Nagarajan, and P. D. Uchil. 2018. "Analysis of Cell Viability by the Mtt Assay." *Cold Spring Harb Protoc* 2018, no. 6 (Jun 01). <https://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot095505>.
- Larsen, A. K., A. E. Escargueil, and A. Skladanowski. 2003. "Catalytic Topoisomerase Ii Inhibitors in Cancer Therapy." *Pharmacol Ther* 99, no. 2 (Aug): 167-81. [https://dx.doi.org/10.1016/s0163-7258\(03\)00058-5](https://dx.doi.org/10.1016/s0163-7258(03)00058-5).
- Lebrecht, D., A. Kokkori, U. P. Ketelsen, B. Setzer, and U. A. Walker. 2005. "Tissue-Specific Mtdna Lesions and Radical-Associated Mitochondrial Dysfunction in Human Hearts Exposed to Doxorubicin." *J Pathol* 207, no. 4 (Dec): 436-44. <https://dx.doi.org/10.1002/path.1863>.
- Lee, J. H., T. J. Wendorff, and J. M. Berger. 2017. "Resveratrol: A Novel Type of Topoisomerase Ii Inhibitor." *J Biol Chem* 292, no. 51 (Dec 22): 21011-21022. <https://dx.doi.org/10.1074/jbc.M117.810580>.
- Leerink, J. M., S. J. Verkleij, E. A. M. Feijen, A. M. C. Mavinkurve-Groothuis, M. S. Pourier, K. Ylänen, W. J. E. Tissing, M. Louwerens, M. M. van den Heuvel, E. van Dulmen-den Broeder, A. C. H. de Vries, C. M. Ronckers, H. J. H. van der Pal, L. Kapusta, J. Loonen, L. Bellersen, Y. M. Pinto, L. C. M. Kremer, and W. E. M. Kok. 2019. "Biomarkers to Diagnose Ventricular Dysfunction in Childhood Cancer Survivors: A Systematic Review." *Heart* 105, no. 3 (Feb): 210-216. <https://dx.doi.org/10.1136/heartjnl-2018-313634>.
- Lipshultz, S. E., R. Karnik, P. Sambatakos, V. I. Franco, S. W. Ross, and T. L. Miller. 2014. "Anthracycline-Related Cardiotoxicity in Childhood Cancer Survivors." *Curr Opin Cardiol* 29, no. 1 (Jan): 103-12. <https://dx.doi.org/10.1097/hco.0000000000000034>.

- Lovitt, C. J., T. B. Shelper, and V. M. Avery. 2018. "Doxorubicin Resistance in Breast Cancer Cells Is Mediated by Extracellular Matrix Proteins." *BMC Cancer* 18, no. 1 (Jan 6): 41. <https://dx.doi.org/10.1186/s12885-017-3953-6>.
- Lyu, Y. L., J. E. Kerrigan, C. P. Lin, A. M. Azarova, Y. C. Tsai, Y. Ban, and L. F. Liu. 2007. "Topoisomerase Iibeta Mediated Dna Double-Strand Breaks: Implications in Doxorubicin Cardiotoxicity and Prevention by Dexrazoxane." *Cancer Res* 67, no. 18 (Sep 15): 8839-46. <https://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-07-1649>.
- Mao, Y., S. D. Desai, C. Y. Ting, J. Hwang, and L. F. Liu. 2001. "26 S Proteasome-Mediated Degradation of Topoisomerase Ii Cleavable Complexes." *J Biol Chem* 276, no. 44 (Nov 2): 40652-8. <https://dx.doi.org/10.1074/jbc.M104009200>.
- Marinello, J., M. Delcuratolo, and G. Capranico. 2018. "Anthracyclines as Topoisomerase Ii Poisons: From Early Studies to New Perspectives." *Int J Mol Sci* 19, no. 11 (Nov 6). <https://dx.doi.org/10.3390/ijms19113480>.
- Martins-Teixeira, M. B., and I. Carvalho. 2020. "Antitumour Anthracyclines: Progress and Perspectives." *ChemMedChem* 15, no. 11 (Jun 4): 933-948. <https://dx.doi.org/10.1002/cmde.202000131>.
- Mattioli, R., A. Ilari, B. Colotti, L. Mosca, F. Fazi, and G. Colotti. 2023. "Doxorubicin and Other Anthracyclines in Cancers: Activity, Chemoresistance and Its Overcoming." *Mol Aspects Med* 93 (Oct): 101205. <https://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2023.101205>.
- McGowan, J. V., R. Chung, A. Maulik, I. Piotrowska, J. M. Walker, and D. M. Yellon. 2017. "Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity." *Cardiovasc Drugs Ther* 31, no. 1 (Feb): 63-75. <https://dx.doi.org/10.1007/s10557-016-6711-0>.
- McKie, S. J., K. C. Neuman, and A. Maxwell. 2021. "Dna Topoisomerases: Advances in Understanding of Cellular Roles and Multi-Protein Complexes Via Structure-Function Analysis." *Bioessays* 43, no. 4 (Apr): e2000286. <https://dx.doi.org/10.1002/bies.202000286>.
- Meng, X., J. Zhou, C. N. Zhao, R. Y. Gan, and H. B. Li. 2020. "Health Benefits and Molecular Mechanisms of Resveratrol: A Narrative Review." *Foods* 9, no. 3 (Mar 14). <https://dx.doi.org/10.3390/foods9030340>.
- Minotti, G., P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, and L. Gianni. 2004. "Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity." *Pharmacol Rev* 56, no. 2 (Jun): 185-229. <https://dx.doi.org/10.1124/pr.56.2.6>.

- Mu, Q., and M. Najafi. 2021. "Resveratrol for Targeting the Tumor Microenvironment and Its Interactions with Cancer Cells." *Int Immunopharmacol* 98 (Sep): 107895. <https://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107895>.
- Nitiss, J. L. 2009. "Targeting Dna Topoisomerase Ii in Cancer Chemotherapy." *Nat Rev Cancer* 9, no. 5 (May): 338-50. <https://dx.doi.org/10.1038/nrc2607>.
- Novelle, M. G., D. Wahl, C. Diéguez, M. Bernier, and R. de Cabo. 2015. "Resveratrol Supplementation: Where Are We Now and Where Should We Go?" *Ageing Res Rev* 21 (May): 1-15. <https://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2015.01.002>.
- Pommier, Y., E. Leo, H. Zhang, and C. Marchand. 2010. "Dna Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs." *Chem Biol* 17, no. 5 (May 28): 421-33. <https://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.04.012>.
- Preksha, G., R. Yesheswini, and C. V. Srikanth. 2021. "Cell Culture Techniques in Gastrointestinal Research: Methods, Possibilities and Challenges." *Indian J Pathol Microbiol* 64, no. Supplement (Jun): S52-S57. https://dx.doi.org/10.4103/IJPM.IJPM_933_20.
- Qiu, Y., P. Jiang, and Y. Huang. 2023. "Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Mechanisms, Monitoring, and Prevention." *Front Cardiovasc Med* 10: 1242596. <https://dx.doi.org/10.3389/fcvm.2023.1242596>.
- Ramírez-Garza, S. L., E. P. Laveriano-Santos, M. Marhuenda-Muñoz, C. E. Storniolo, A. Tresserra-Rimbau, A. Vallverdú-Queralt, and R. M. Lamuela-Raventós. 2018. "Health Effects of Resveratrol: Results from Human Intervention Trials." *Nutrients* 10, no. 12 (Dec 3). <https://dx.doi.org/10.3390/nu10121892>.
- Rauf, A., M. Imran, M. S. Butt, M. Nadeem, D. G. Peters, and M. S. Mubarak. 2018. "Resveratrol as an Anti-Cancer Agent: A Review." *Crit Rev Food Sci Nutr* 58, no. 9 (Jun 13): 1428-1447. <https://dx.doi.org/10.1080/10408398.2016.1263597>.
- Ren, B., M. X. Kwah, C. Liu, Z. Ma, M. K. Shanmugam, L. Ding, X. Xiang, P. C. Ho, L. Wang, P. S. Ong, and B. C. Goh. 2021. "Resveratrol for Cancer Therapy: Challenges and Future Perspectives." *Cancer Lett* 515 (Sep 1): 63-72. <https://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2021.05.001>.
- Sakaguchi, A., and A. Kikuchi. 2004. "Functional Compatibility between Isoform Alpha and Beta of Type Ii Dna Topoisomerase." *J Cell Sci* 117, no. Pt 7 (Mar 1): 1047-54. <https://dx.doi.org/10.1242/jcs.00977>.

- Sawaya, H., I. A. Sebag, J. C. Plana, J. L. Januzzi, B. Ky, V. Cohen, S. Gosavi, J. R. Carver, S. E. Wiegers, R. P. Martin, M. H. Picard, R. E. Gerszten, E. F. Halpern, J. Passeri, I. Kuter, and M. Scherrer-Crosbie. 2011. "Early Detection and Prediction of Cardiotoxicity in Chemotherapy-Treated Patients." *Am J Cardiol* 107, no. 9 (May 1): 1375-80. <https://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2011.01.006>.
- Sawicki, K. T., V. Sala, L. Prever, E. Hirsch, H. Ardehali, and A. Ghigo. 2021. "Preventing and Treating Anthracycline Cardiotoxicity: New Insights." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 61 (Jan 6): 309-332. <https://dx.doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-030620-104842>.
- Schmidt, B., C. Ferreira, C. L. Alves Passos, J. L. Silva, and E. Fialho. 2020. "Resveratrol, Curcumin and Piperine Alter Human Glyoxalase 1 in MCF-7 Breast Cancer Cells." *Int J Mol Sci* 21, no. 15 (Jul 24). <https://dx.doi.org/10.3390/ijms21155244>.
- Shaito, A., A. M. Posadino, N. Younes, H. Hasan, S. Halabi, D. Alhababi, A. Al-Mohannadi, W. M. Abdel-Rahman, A. H. Eid, G. K. Nasrallah, and G. Pintus. 2020. "Potential Adverse Effects of Resveratrol: A Literature Review." *Int J Mol Sci* 21, no. 6 (Mar 18). <https://dx.doi.org/10.3390/ijms21062084>.
- Shan, K., A. M. Lincoff, and J. B. Young. 1996. "Anthracycline-Induced Cardiotoxicity." *Ann Intern Med* 125, no. 1 (Jul 1): 47-58. <https://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-125-1-199607010-00008>.
- Singh, A. P., R. Singh, S. S. Verma, V. Rai, C. H. Kaschula, P. Maiti, and S. C. Gupta. 2019. "Health Benefits of Resveratrol: Evidence from Clinical Studies." *Med Res Rev* 39, no. 5 (Sep): 1851-1891. <https://dx.doi.org/10.1002/med.21565>.
- Solem, L. E., T. R. Henry, and K. B. Wallace. 1994. "Disruption of Mitochondrial Calcium Homeostasis Following Chronic Doxorubicin Administration." *Toxicol Appl Pharmacol* 129, no. 2 (Dec): 214-22. <https://dx.doi.org/10.1006/taap.1994.1246>.
- Speyer, J. L., M. D. Green, E. Kramer, M. Rey, J. Sanger, C. Ward, N. Dubin, V. Ferrans, P. Stecy, A. Zeleniuch-Jacquotte, and et al. 1988. "Protective Effect of the Bispiperazinedione Icrf-187 against Doxorubicin-Induced Cardiac Toxicity in Women with Advanced Breast Cancer." *N Engl J Med* 319, no. 12 (Sep 22): 745-52. <https://dx.doi.org/10.1056/nejm198809223191203>.
- Stěrba, M., O. Popelová, J. Lenčo, A. Fučíková, E. Brčáková, Y. Mazurová, E. Jirkovský, T. Šimůnek, M. Adamcová, S. Mičuda, J. Stulík, and V. Geršl. 2011. "Proteomic Insights into Chronic Anthracycline Cardiotoxicity." *J Mol Cell Cardiol* 50, no. 5 (May): 849-62. <https://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.01.018>.

- Stěrba, M., O. Popelová, A. Vávrová, E. Jirkovský, P. Kovaříková, V. Geršl, and T. Simůnek. 2013. "Oxidative Stress, Redox Signaling, and Metal Chelation in Anthracycline Cardiotoxicity and Pharmacological Cardioprotection." *Antioxid Redox Signal* 18, no. 8 (Mar 10): 899-929. <https://dx.doi.org/10.1089/ars.2012.4795>.
- Swain, S. M., F. S. Whaley, and M. S. Ewer. 2003. "Congestive Heart Failure in Patients Treated with Doxorubicin: A Retrospective Analysis of Three Trials." *Cancer* 97, no. 11 (Jun 1): 2869-79. <https://dx.doi.org/10.1002/cncr.11407>.
- Tewey, K. M., T. C. Rowe, L. Yang, B. D. Halligan, and L. F. Liu. 1984. "Adriamycin-Induced Dna Damage Mediated by Mammalian Dna Topoisomerase Ii." *Science* 226, no. 4673 (Oct 26): 466-8. <https://dx.doi.org/10.1126/science.6093249>.
- Volkova, M., and R. Russell, 3rd. 2011. "Anthracycline Cardiotoxicity: Prevalence, Pathogenesis and Treatment." *Curr Cardiol Rev* 7, no. 4 (Nov): 214-20. <https://dx.doi.org/10.2174/157340311799960645>.
- Von Hoff, D. D., M. W. Layard, P. Basa, H. L. Davis, Jr., A. L. Von Hoff, M. Rozencweig, and F. M. Muggia. 1979. "Risk Factors for Doxorubicin-Induced Congestive Heart Failure." *Ann Intern Med* 91, no. 5 (Nov): 710-7. <https://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-91-5-710>.
- Weiss, G., M. Loyevsky, and V. R. Gordeuk. 1999. "Dexrazoxane (Icrf-187)." *Gen Pharmacol* 32, no. 1 (Jan): 155-8. [https://dx.doi.org/10.1016/s0306-3623\(98\)00100-1](https://dx.doi.org/10.1016/s0306-3623(98)00100-1).
- Woessner, R. D., M. R. Mattern, C. K. Mirabelli, R. K. Johnson, and F. H. Drake. 1991. "Proliferation- and Cell Cycle-Dependent Differences in Expression of the 170 Kilodalton and 180 Kilodalton Forms of Topoisomerase Ii in Nih-3t3 Cells." *Cell Growth Differ* 2, no. 4 (Apr): 209-14.
- Wright, C., A. K. V. Iyer, J. S. Yakisich, and N. Azad. 2017. "Anti-Tumorigenic Effects of Resveratrol in Lung Cancer Cells through Modulation of C-Flip." *Curr Cancer Drug Targets* 17, no. 7: 669-680. <https://dx.doi.org/10.2174/1568009617666170315162932>.
- Wu, H., L. Chen, F. Zhu, X. Han, L. Sun, and K. Chen. 2019. "The Cytotoxicity Effect of Resveratrol: Cell Cycle Arrest and Induced Apoptosis of Breast Cancer 4t1 Cells." *Toxins (Basel)* 11, no. 12 (Dec 13). <https://dx.doi.org/10.3390/toxins11120731>.

- Yang, R., H. Dong, S. Jia, and Z. Yang. 2022. "Resveratrol as a Modulatory of Apoptosis and Autophagy in Cancer Therapy." *Clin Transl Oncol* 24, no. 7 (Jul): 1219-1230. <https://dx.doi.org/10.1007/s12094-021-02770-y>.
- Yang, X., W. Li, E. D. Prescott, S. J. Burden, and J. C. Wang. 2000. "Dna Topoisomerase I β and Neural Development." *Science* 287, no. 5450 (Jan 7): 131-4. <https://dx.doi.org/10.1126/science.287.5450.131>.
- Yiu, E. M., G. Tai, R. E. Peverill, K. J. Lee, K. D. Croft, T. A. Mori, B. Scheiber-Mojdehkar, B. Sturm, M. Prashberger, A. P. Vogel, G. Rance, S. E. Stephenson, J. P. Sarsero, C. Stockley, C. Y. Lee, A. Churchyard, M. V. Evans-Galea, M. M. Ryan, P. J. Lockhart, L. A. Corben, and M. B. Delatycki. 2015. "An Open-Label Trial in Friedreich Ataxia Suggests Clinical Benefit with High-Dose Resveratrol, without Effect on Frataxin Levels." *J Neurol* 262, no. 5 (May): 1344-53. <https://dx.doi.org/10.1007/s00415-015-7719-2>.
- Zhang, S., X. Liu, T. Bawa-Khalfe, L. S. Lu, Y. L. Lyu, L. F. Liu, and E. T. Yeh. 2012. "Identification of the Molecular Basis of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity." *Nat Med* 18, no. 11 (Nov): 1639-42. <https://dx.doi.org/10.1038/nm.2919>.