

Streszczenie

Działanie cytotoksyczne i proapoptotyczne resweratrolu na wybrane nowotwory przewodu pokarmowego w badaniach *in vitro*

Pomimo postępu w dziedzinie profilaktyki i wczesnego wykrywania zmian nowotworowych, nowotwory nadal pozostają jedną z głównych przyczyn śmierci na całym świecie. Szczególnie niebezpieczne są nowotwory trzustki, ze względu na brak charakterystycznych objawów, pozwalających na postawienie diagnozy na wczesnym etapie rozwoju choroby. Tym samym późne rozpoznanie przekłada się na brak możliwości wdrożenia skutecznego leczenia.

Stosowanie cytostatyków w leczeniu większości nowotworów przynosi pożądane efekty w stosunku do komórek nowotworowych. Jednak w przypadku nowotworów trzustki ta forma leczenia charakteryzuje się niską skutecznością, prowadząc jednocześnie do licznych skutków ubocznych. Stąd też poszukuje się związków o działaniu toksycznym dla komórek nowotworowych przy jednocześnie niskiej toksyczności względem komórek prawidłowych. Przykładem takich substancji są związki polifenolowe, obecne w wielu produktach spożywczych, wchodzących w skład naszej codziennej diety. Jednym z przedstawicieli tej grupy związków jest resweratrol.

Resweratrol (3,5,4'-trihydroksystilben) jest fitoaleksyną występującą w wielu roślinach, takich jak maliny, borówki, czarna porzeczka. Głównym jego źródłem są ciemne winogrona. Wyróżnia się dwie formy stereoisomeryczne *cis* i *trans*, przy czym formą bardziej aktywną jest forma *trans*. Resweratrol wykazuje szereg zróżnicowanych aktywności biologicznych, w tym aktywność przeciwnowotworową. Działanie przeciwnowotworowe resweratrolu polega między innymi na hamowaniu proliferacji komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego oraz indukcji procesu apoptozy.

Badania w pracy (Katarzyna Mieszala, Małgorzata Rudewicz, Agnieszka Gomulkiwicz, Katarzyna Ratajczak-Wielgomas, Jędrzej Grzegorzółka, Piotr Dziegiel, Sylwia Borska. Expression of genes and proteins of multidrug resistance in gastric cancer cells treated with resveratrol. *Oncol.Lett.* 2018, Vol.15, s. 5825-5832) wykonano na trzech liniach nowotworowych żołądka, wrażliwych (EPG85-257P) i opornych na działanie cytostatyków: daunorubicyny (EPG85-257RDB) i mitoksantronu (EPG85-257RNOV). Za pomocą reakcji

real-time PCR w badanych liniach komórkowych dokonano oceny zmian ekspresji genów związanych z opornością wielolekową (MDR, *multidrug resistance*) w wyniku zastosowania różnych stężeń resweratrolu. Następnie za pomocą metody Western Blot określono poziom białek kodowanych przez te geny. Wykorzystując metodę immunofluorescencji potwierdzono obecność poszczególnych białek w liniach komórkowych. Wyniki przeprowadzonych badań poddano analizie statystycznej.

Analiza otrzymanych wyników wykazała nadekspresję genu *ABCBI* w linii odpornej na działanie cytostatyku (daunorubicyny) w porównaniu do linii wrażliwej na jej działanie. Traktowanie resweratrolem w stężeniu 30 μM skutkowało istotnym obniżeniem poziomu ekspresji genu *ABCBI* w porównaniu z komórkami nie poddanymi działaniu związku. Podobną zależność wykazano na poziomie białka. Działanie resweratrolem w stężeniach 30 μM i 50 μM spowodowało spadek poziomu P-glikoproteiny poniżej poziomu oznaczenia ilościowego w stosunku do komórek kontrolnych.

Wykazano także, że w linii komórkowej odpornej na działanie daunorubicyny oprócz klasycznego mechanizmu oporności wielolekowej (nadekspresja P-glikoproteiny) istnieją także mechanizmy nietypowe, związane ze zwiększoną ekspresją genów *ANXA1* oraz *TXN*. Ekspresja genu *ANXA1* w komórkach opornych na działanie daunorubicyny jest istotnie wyższa w porównaniu do komórek wrażliwych na jej działanie. Traktowanie resweratrolem w stężeniu 30 μM i 50 μM skutkowało obniżeniem poziomu ekspresji genu *ANXA1* w porównaniu do komórek wrażliwych. Wraz ze wzrostem stężenia resweratrolu zaobserwowano wzrost poziomu Aneksyny I. Obecność tego białka w badanej linii komórkowej została potwierdzona za pomocą reakcji immunofluorescencji (IF).

Ekspresja genu *TXN* w komórkach opornych na działanie daunorubicyny jest wyższa w porównaniu do komórek wrażliwych. Obecność tioredoksyny w badanych komórkach potwierdzono za pomocą reakcji immunofluorescencji. Pod działaniem resweratrolu doszło do obniżenia poziomu ekspresji *TXN*. Zależność ta została także potwierdzona na poziomie białka.

W linii komórkowej odpornej na działanie mitoksantronu odnotowano obecność nietypowych mechanizmów oporności wielolekowej, związanych z nadekspresją genu *TXN* w stosunku do komórek wrażliwych na działanie cytostatyku. Po zastosowaniu resweratrolu w stężeniu 30 μM zaobserwowano znaczące obniżenie poziomu ekspresji *TXN* w stosunku do komórek opornych, niepoddanych działaniu badanego związku. Zależności te potwierdziły eksperymenty na poziomie białka.

W pracy pogładowej (Katarzyna Ratajczak, Sylwia Borska. Cytotoxic and Proapoptotic Effects of Resveratrol in *In Vitro* Studies on Selected Types of Gastrointestinal Cancers. *Mol. 2021*, Vol. 26; s. 4350) został przedstawiony przegląd piśmiennictwa dotyczącego antyproliferacyjnego i proapoptotycznego działania resweratrolu w nowotworach przewodu pokarmowego (rak trzustki, żołądka, wątroby oraz jelit). Dodatkowo zwrócono także uwagę na zjawisko MDR, będącej często przyczyną nieskuteczności klasycznej chemioterapii. Opisano rolę resweratrolu jako jednego z przedstawicieli związków naturalnych wykazujących właściwości plejotropowe, w tym przeciwnowotworowe, a także zdolność do „przełamania” MDR. Przegląd piśmiennictwa dotyczącego badań w modelu *in vitro* dowodzi, że resweratrol działa na komórki wybranych nowotworów przewodu pokarmowego hamując ich proliferację i wykazując właściwości proapoptotyczne o różnym nasileniu. Jednocześnie substancja ta wykazuje zróżnicowane działanie w zależności od typu nowotworu, stężenia badanego związku, czasu inkubacji, w odniesieniu do efektu przeciwnowotworowego. W komórkach raka trzustki (PANC-1, AsPC-1, BxPC-3, Capan-2, CEPAC-1, MIA Paca-2, Hs766T) działanie antyproliferacyjne oraz proapoptotyczne obserwowane jest po 48 godzinach inkubacji w wyższych stężeniach resweratrolu (>100 μM). Działanie to polega między innymi na regulacji ekspresji białek pro- i antyapoptotycznych (Bax i Bcl-2). W przypadku komórek raka żołądka (MGC803, SGC-7901, BGC823, GES1) działanie to obserwowane jest w zakresie stężeń 0-400 μM i związane jest między ze wzrostem produkcji ROS (ang. *Reactive Oxygen Species*). Z kolei w komórkach raka wątroby (HepG2, Bel-7402, SMMC-7721, MHCC97-H) i jelita (HT-29, WiDr, HCA-17, SW480, HCT-116, Caco-2, CO-115, DLD1, HCT15) działanie antyproliferacyjne oraz proapoptotyczne obserwowane jest już w niższych stężeniach resweratrolu, w zakresach 0-100 μM i 0-50 μM . Efekty te są związane między innymi z regulacją ekspresji białek pro- i antyapoptotycznych.

Badania w trzeciej pracy z cyklu publikacji (Katarzyna Ratajczak, Natalia Glatzel-Plucińska, Katarzyna Ratajczak-Wielgomas, Katarzyna Nowińska, Sylwia Borska. Effect of Resveratrol Treatment on Human Pancreatic Cancer Cells through Alterations of Bcl-2 Family Members. *Mol. 2021*, Vol. 26; s. 6560) wykonano na trzech liniach nowotworowych trzustki: EPP85-181P, EPP85-181RNOV (komórki odporne na działanie mitoksantronu), AsPC-1 oraz prawidłowej linii trzustki H6c7. Za pomocą testu kolorymetrycznego (MTT) oraz metody cytometrii przepływowej (FACS) zbadano cytotoksyczne działanie resweratrolu. Następnie z wykorzystaniem metody FACS dokonano analizy wpływu resweratrolu na cykl komórkowy badanych komórek. Dokonano także oceny nasilenia apoptozy komórek spowodowanej działaniem resweratrolu metodą FACS oraz metodą TUNEL. Zmiany ekspresji genów

związanych z procesem apoptozy (*BAX* i *BCL2*) zbadano z wykorzystaniem techniki real-time PCR. Metodę Western Blot wykorzystano do oceny zmian poziomu białek związanych z procesem apoptozy: Bax i Bcl-2.

Analiza wyników reakcji kolorymetrycznej MTT wykazała, że komórki linii EPP85-181RNOV pomimo oporności na mitoksantron są bardziej wrażliwe na działanie resweratrolu w porównaniu do komórek EPP85-181P (linia wrażliwa na cytostatyki). Z kolei najmniejszą wrażliwość na działanie resweratrolu wykazywały komórki linii AsPC-1. Zależny od stężenia i czasu działania spadek żywotności komórek odnotowano także w prawidłowych komórkach trzustki (H6c7). Na podstawie otrzymanych wyników wytypowano trzy stężenia resweratrolu: 25, 50 i 100 μM oraz czas inkubacji 48 godzin, stosowane w pozostałych eksperymentach. Badania rozkładu faz cyklu komórkowego wykazały, że resweratrol prowadzi do kumulacji komórek w fazie G0/G1 lub S, w zależności od typu komórek oraz stężenia związku. W komórkach nowotworowych EPP85-181P i EPP85-181RNOV hamowanie cyklu komórkowego w fazie S obserwowano przy niższych stężeniach związku (25 i 50 μM), natomiast przy wyższych stężeniach resweratrolu (100 μM) występowało hamowanie w fazie G0/G1. W przypadku komórek nowotworowych AsPC-1 nie wykazano istotnych statystycznie różnic w hamowaniu cyklu komórkowego pomiędzy badanymi stężeniami. Wystąpiły jednak istotne zmiany w rozkładzie komórek w określonych fazach cyklu komórkowego. W komórkach prawidłowych trzustki H6c7 działanie resweratrolem nie powodowało istotnego zatrzymania komórek w poszczególnych fazach cyklu.

Metoda TUNEL wykazała wzrost apoptozy we wszystkich badanych liniach komórkowych, a zmiany były zależne od zastosowanego stężenia związku. W linii komórkowej AsPC-1 zaobserwowano najmniejszy wzrost liczby komórek apoptotycznych. Z kolei linie komórkowe EPP85-181P oraz EPP85-181RNOV charakteryzował umiarkowany wzrost liczby komórek apoptotycznych. Największą liczbę komórek apoptotycznych odnotowano w linii komórkowej H6c7 przy najwyższym stężeniu resweratrolu (100 μM).

Reakcje immunocytochemiczne (IHC) mające na celu ocenę wpływu resweratrolu na białka związane z procesem apoptozy (Bax, Bcl-2, Kaspaza-3), wykazały zależny od stężenia spadek poziomu białka Bcl-2 oraz wzrost poziomu białek Bax i Kaspazy-3 we wszystkich badanych nowotworowych liniach komórkowych. W prawidłowej linii komórkowej trzustki resweratrol nie powodował istotnych zmian poziomu poszczególnych białek.

Badania wykonane metodą real-time PCR wykazały zależne od stężenia resweratrolu zmiany ekspresji genów związanych z procesem apoptozy (*BAX*, *BCL2*). W przypadku linii komórkowej EPP85-181P działanie resweratrolem spowodowało zmniejszenie ekspresji *BAX*

i wzrost ekspresji *BCL2* (przy stężeniu 25 μM) w porównaniu do komórek nietraktowanych ww. związkiem. Pomiędzy stężeniami 50 i 100 μM zaobserwowano spadek poziomu ekspresji *BCL2*. Z kolei w linii komórkowej EPP85-181RNOV resweratrol powodował zmniejszenie ekspresji *BAX* w sposób zależny od stężenia. Przy stężeniu 25 μM zaobserwowano spadek poziomu ekspresji *BCL2*, a pomiędzy stężeniami 50 i 100 μM odnotowano jego wzrost. W przypadku linii komórkowej AsPC-1 uzyskano podobne zależności. W prawidłowej linii komórkowej trzustki H6c7 działanie resweratrolem skutkowało zwiększeniem poziomu ekspresji *BAX* przy stężeniu 25 μM oraz zmniejszeniem jego poziomu pomiędzy stężeniem 50 i 100 μM. Z kolei stężenie 25 μM prowadziło do obniżenia poziomu ekspresji *BCL2*, natomiast stężenia 50 i 100 μM powodowały jego wzrost.

Ocenę zdolności resweratrolu do modulacji białek związanych z procesem apoptozy przeprowadzono za pomocą metody Western Blot. W linii komórkowej EPP85-181P stężenie 25 μM powodowało wzrost poziomu proapoptotycznego białka Bax, natomiast pomiędzy wyższymi stężeniami (50 i 100 μM) doszło do jego obniżenia w porównaniu z komórkami nie poddanymi działaniu resweratrolu. W przypadku białka antyapoptotycznego Bcl-2 działanie resweratrolu w niższym stężeniu (25 μM) powodowało wzrost poziomu białka, podczas gdy wyższe stężenia powodowały jego spadek. W linii komórkowej EPP85-181RNOV, odpornej na działanie cytostatyku, resweratrol w stężeniu 25 μM powodował wzrost poziomu białka Bax, a z kolei wyższe stężenia prowadziły do jego obniżenia i znajdowały się na podobnym poziomie. Poziom białka Bcl-2 przy stężeniu 25 μM był niższy w porównaniu do komórek nietraktowanych, a wyższe stężenia nie powodowały znaczących zmian. W kolejnej badanej linii komórkowej AsPC-1 przy stężeniu 25 μM zauważono niewielki spadek poziomu białka proapoptotycznego Bax w stosunku do komórek nie poddanych działaniu resweratrolu, a wyższe stężenia powodowały wzrost jego poziomu. Podobne zależności wykazano dla białka antyapoptotycznego Bcl-2. Stężenie 25 μM skutkowało obniżeniem poziomu białka, a wyższe stężenia prowadziły do jego wzrostu. W prawidłowej linii komórkowej trzustki H6c7 działanie resweratrolu nie powodowało istotnych zmian w poziomie białka proapoptotycznego Bax. Jedynie przy najwyższym jego stężeniu (100 μM) odnotowano jego wzrost. Z kolei w przypadku białka antyapoptotycznego Bcl-2 zaobserwowano wzrost jego poziomu, a zmiany były proporcjonalne do stężenia resweratrolu.

Podsumowując, badania w modelu *in vitro* na komórkach nowotworowych trzustki i żołądka wskazują na zależność pomiędzy efektem działania resweratrolu, a zastosowanym stężeniem i czasem inkubacji. Wyniki badań potwierdziły przeciwnowotworową aktywność resweratrolu poprzez wpływ na hamowanie proliferacji oraz indukowanie apoptozy.

Mechanizmy działania obejmują zmianę ekspresji genów oraz poziomu białek związanych z cyklem komórkowym i apoptozą. Ponadto poprzez wpływ na geny i białka związane z opornością wielolekową, resweratrol może mieć istotne znaczenie w „przełamaniu” tego zjawiska.

Summary

Cytotoxic and proapoptotic effects of resveratrol on selected neoplasms of the gastrointestinal tract in *in vitro* studies

Despite advances in the field of prevention and early detection of neoplastic changes, cancer remains one of the leading causes of death worldwide. Pancreatic neoplasms are particularly dangerous due to the lack of characteristic symptoms allowing for diagnosis at an early stage of the disease development. Thus, late diagnosis translates into the inability to implement effective treatment.

The use of cytostatics in treating most types of cancer has the desired effect on cancer cells. However, this treatment is of low effectiveness in the case of pancreatic tumors, leading to numerous side effects simultaneously. Hence, compounds are sought that are toxic to neoplastic cells with low toxicity to normal cells simultaneously. Examples of such substances are polyphenolic compounds in many food products in our daily diet. One of the representatives of this group of compounds is resveratrol.

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) is a phytoalexin found in many plants, such as raspberries, blueberries, and black currants. Its main source is dark grapes. There are two stereoisomeric forms, *cis* and *trans*, the more active form being the *trans* form. Resveratrol exhibits several diverse biological activities, including anticancer activity. The antitumor activity of resveratrol consists, among other things, in inhibiting the proliferation of cells in particular phases of the cell cycle and inducing the process of apoptosis.

Research at work (Katarzyna Mieszala, Małgorzata Rudewicz, Agnieszka Gomulkiwicz, Katarzyna Ratajczak-Wielgomas, Jędrzej Grzegorzółka, Piotr Dzięgiel, Sylwia Borska. Expression of genes and proteins of multidrug resistance in gastric cancer cells treated with resveratrol. *Oncol.Lett.* 2018, Vol 15, pp. 5825-5832) was performed on three gastric cancer lines, sensitive (EPG85-257P) and resistant to cytostatics: daunorubicin (EPG85-257RDB) and mitoxantrone (EPG85-257RNOV). The changes in gene expression associated with multidrug resistance (MDR) as a result of using different concentrations of resveratrol were assessed using real-time PCR reactions in the tested cell lines. Then, the level of proteins encoded by these genes was determined using the Western Blot method. Using the immunofluorescence method, the presence of individual proteins in cell lines was confirmed. The results of the conducted research were subjected to statistical analysis.

The analysis of the obtained results showed the overexpression of the *ABCB1* gene in the line resistant to the cytostatics (daunorubicin) compared to the line sensitive to its action.

Treatment with resveratrol at a concentration of 30 μM resulted in a significant reduction in the expression level of the *ABCB1* gene compared to untreated cells. A similar relationship was demonstrated at the protein level. Treatment with resveratrol at concentrations of 30 μM and 50 μM resulted in a decrease in the level of P-glycoprotein below the quantification level of control cells.

It has also been shown that in the daunorubicin-resistant cell line, apart from the classic mechanism of multidrug resistance (P-glycoprotein overexpression), there are also atypical mechanisms related to increased expression of *ANXA1* and *TXN* genes. Expression of the *ANXA1* gene in daunorubicin-resistant cells is significantly higher than in daunorubicin-sensitive cells. Treatment with resveratrol at a concentration of 30 μM and 50 μM reduced the expression of the *ANXA1* gene compared to sensitive cells. As the concentration of resveratrol increased, an increase in the level of Annexin I was observed. The presence of this protein in the tested cell line was confirmed by the immunofluorescence (IF) reaction.

Expression of the *TXN* gene in daunorubicin-resistant cells is higher compared to sensitive cells. The presence of thioredoxin in the tested cells was confirmed by an immunofluorescence reaction. Under the action of resveratrol, the expression level of *TXN* was reduced. This relationship was also established on the protein level.

In the mitoxantrone-resistant cell line, the presence of atypical multi-drug resistance mechanisms related to the overexpression of the *TXN* gene in relation to cytostatic-sensitive cells has been reported. After applying resveratrol at a concentration of 30 μM , a significant reduction in the expression level of *TXN* was observed in resistant cells not exposed to the test compound. Experiments confirmed these relationships at the protein level.

The review (Katarzyna Ratajczak, Sylwia Borska. Cytotoxic and Proapoptotic Effects of Resveratrol in In Vitro Studies on Selected Types of Gastrointestinal Cancers. Mol. 2021, Vol. 26; p. 4350) presents a review of the literature on the antiproliferative and pro-apoptotic effects of resveratrol in gastrointestinal cancer (cancer of the pancreas, stomach, liver, and intestines). In addition, attention was also paid to the phenomenon of MDR, which is often the reason for the ineffectiveness of traditional chemotherapy. The role of resveratrol as one of the representatives of natural compounds demonstrating pleiotropic properties, including anticancer properties, as well as the ability to "break" MDR, has been described. A review of the literature on studies in an *in vitro* model proves that resveratrol acts on the cells of selected gastrointestinal neoplasms by inhibiting their proliferation and demonstrating proapoptotic properties of varying severity. At the same time, this substance exhibits various effects depending on the type of tumor, the concentration of the test compound, and incubation time,

about the antitumor effect. In pancreatic cancer cells (PANC-1, AsPC-1, BxPC-3, Capan-2, CEPAC-1, MIA Paca-2, Hs766T), the antiproliferative and proapoptotic effect is observed after 48 hours of incubation in higher concentrations of resveratrol ($>100 \mu\text{M}$). This action is based, among other things, on regulating the expression of pro- and antiapoptotic proteins (Bax and Bcl-2). In the case of gastric cancer cells (MGC803, SGC-7901, BGC823, GES1), this effect is observed in the concentration range of $0\text{-}400 \mu\text{M}$ and is associated with an increase in the production of ROS (*Reactive Oxygen Species*). In turn, in liver cancer cells (HepG2, Bel-7402, SMMC-7721, MHCC97-H) and intestines (HT-29, WiDr, HCA-17, SW480, HCT-116, Caco-2, CO-115, DLD1, HCT15), antiproliferative and proapoptotic effects are already observed at lower concentrations of resveratrol, in the ranges of $0\text{-}100 \mu\text{M}$ and $0\text{-}50 \mu\text{M}$. These effects are related to, among other things, the regulation of the expression of pro- and antiapoptotic proteins.

Research in the third work in the series of publications (Katarzyna Ratajczak, Natalia Glatzel-Plucińska, Katarzyna Ratajczak-Wielgomas, Katarzyna Nowińska, Sylwia Borska. Effect of Resveratrol Treatment on Human Pancreatic Cancer Cells through Alterations of Bcl-2 Family Members. *Mol.* 2021, Vol. 26; p. 6560) was performed on three pancreatic cancer lines: EPP85-181P, EPP85-181RNOV (mitoxantrone-resistant cells), AsPC-1, and the normal pancreatic line H6c7. The cytotoxic effects of resveratrol were investigated using the colorimetric test (MTT) and the flow cytometry (FACS) method. Then, using the FACS method, an analysis of the effect of resveratrol on the cell cycle of the studied cells was carried out. The intensity of cell apoptosis caused by resveratrol was also assessed using the FACS and the TUNEL methods. Changes in the expression of genes related to the apoptosis process (*BAX* and *BCL2*) were investigated using the real-time PCR technique. The Western Blot method was used to evaluate the changes in the level of proteins related to the apoptosis process: Bax and Bcl-2.

The analysis of the results of the MTT colorimetric reaction showed that the cells of the EPP85-181RNOV line, despite resistance to mitoxantrone, are more sensitive to the action of resveratrol compared to EPP85-181P cells (cytostatic-sensitive line). In turn, the AsPC-1 cells showed the lowest sensitivity to the effects of resveratrol. A concentration-dependent and time-dependent decrease in cell viability were also noted in normal pancreatic cells (H6c7). Based on the obtained results, three concentrations of resveratrol were selected: 25, 50, and $100 \mu\text{M}$, and the incubation time of 48 hours was used in the remaining experiments. Cell cycle phase distribution studies have shown that resveratrol leads to cell accumulation in the G₀/G₁ or S phase, depending on the cell type and compound concentration. In tumor cells, EPP85-181P

and EPP85-181RNOV, cell cycle inhibition in the S phase was observed at lower concentrations of the compound (25 and 50 μM). In comparison, inhibition in G0/G1 occurred at higher concentrations of resveratrol (100 μM). In the case of AsPC-1 neoplastic cells, no statistically significant differences in cell cycle inhibition between the tested concentrations were found. However, there were substantial changes in cellular distribution at certain phases of the cell cycle. In normal H6c7 pancreatic cells, the action of resveratrol did not cause significant cell arrest at any stage of the cycle.

The TUNEL method showed an increase in apoptosis in all tested cell lines, and the changes depended on the concentration of the compound used. In the AsPC-1 cell line, the smallest growth in the number of apoptotic cells was observed. In turn, the EPP85-181P and EPP85-181RNOV cell lines were characterized by a moderate increase in the number of apoptotic cells. The highest number of apoptotic cells was recorded in the H6c7 cell line with the highest concentration of resveratrol (100 μM).

Immunocytochemical reactions (IHC) to assess the effect of resveratrol on apoptotic proteins (Bax, Bcl-2, Kaspaza-3) showed a concentration-dependent decrease in the level of Bcl-2 and an increase in the level of Bax and Kaspase-3 in all cancer cell lines tested. In a normal pancreatic cell line, resveratrol did not cause any significant changes in the levels of individual proteins.

Real-time PCR studies showed changes in the expression of genes related to the apoptosis process (*BAX*, *BCL2*) dependent on the concentration of resveratrol. In the case of the EPP85-181P cell line, treatment with resveratrol resulted in a decrease in *BAX* expression and an increase in *BCL2* expression (at a concentration of 25 μM) compared to untreated cells. Between concentrations of 50 and 100 μM , a decrease in the level of *BCL2* expression was observed. In contrast, in the EPP85-181RNOV cell line, resveratrol reduced *BAX* expression in a concentration-dependent manner. At a concentration of 25 μM , a decrease in the level of *BCL2* expression was observed, and an increase was noted between concentrations of 50 and 100 μM . Similar relationships were found in the case of the AsPC-1 cell line. In the normal H6c7 pancreatic cell line, treatment with resveratrol resulted in an increase in *BAX* expression levels at a concentration of 25 μM and a reduction in *BAX* levels between 50 and 100 μM . On the other hand, the concentration of 25 μM decreased the level of *BCL2* expression, while the concentrations of 50 and 100 μM caused its increase.

The ability of resveratrol to modulate proteins related to the apoptosis process was assessed using the Western Blot method. In the EPP85-181P cell line, the concentration of 25 μM increased the level of the proapoptotic protein Bax. In contrast, between the higher

concentrations (50 and 100 μM), there was a reduction in it compared to cells not treated with resveratrol. In the case of the antiapoptotic protein Bcl-2, the action of resveratrol at a lower concentration (25 μM) caused an increase in the level of the protein, while higher concentrations caused its decrease. In the cytostatic-resistant cell line EPP85-181RNOV, resveratrol at a concentration of 25 μM increased the level of the Bax protein, while higher concentrations led to a decrease in protein and were at a similar level. The level of Bcl-2 protein at the concentration of 25 μM was lower than the untreated cells, and the higher concentrations did not cause significant changes. In the following tested cell line, AsPC-1, at a concentration of 25 μM , a slight decrease in the proapoptotic protein Bax was observed about cells not treated with resveratrol, and higher concentrations increased its level. Similar relationships were demonstrated for the antiapoptotic protein Bcl-2. A concentration of 25 μM resulted in a decrease in the protein level, and higher concentrations led to an increase in protein. In the normal H6c7 pancreatic cell line, the action of resveratrol did not cause significant changes in the level of the proapoptotic protein Bax. Its increase was noted only at its highest concentration (100 μM). In turn, in the case of the antiapoptotic protein Bcl-2, an increase in its level was observed, and the changes were proportional to the concentration of resveratrol.

In conclusion, studies in an *in vitro* model on pancreatic and gastric cancer cells indicate a connection between the effect of resveratrol and the concentration used and the incubation duration. The study results confirmed the anticancer activity of resveratrol by inhibiting proliferation and inducing apoptosis. Mechanisms of action include altering gene expression and the level of associated proteins connected with the cell cycle and apoptosis. In addition, by affecting multidrug resistance-related genes and proteins, resveratrol may be important in 'overcoming' this phenomenon.