

Nghiên cứu *in silico* và *in vitro* về tác động lên quá trình chết theo chương trình của Markhacanasin A trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7 thông qua cơ chế kích hoạt caspase-3

Nguyễn Quốc Trung^{1*}, Nguyễn Khánh Hưng¹, Ngô Trọng Nghĩa^{2*}, Nguyễn Tấn Phát³

¹Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, phường 4, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Khoa Tài nguyên - Môi trường, Trường Đại học Kiên Giang, 320A quốc lộ 61, thị trấn Minh Lương, huyện Châu Thành, tỉnh Kiên Giang, Việt Nam

³Viện Công nghệ Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 1A, TL29, phường Thạnh Lộc, quận 12, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 17/2/2023; ngày chuyển phản biện 20/2/2023; ngày nhận phản biện 13/3/2023; ngày chấp nhận đăng 16/3/2023

Tóm tắt:

Markhacanasin A (MA) là một cycloartane triterpenoid được phân lập từ lá cây Thiết đỉnh Cà Ná (*Markhamia stipulata* var. *canaense* V.S. Dang) thu thập tại tỉnh Ninh Thuận, Việt Nam. Nghiên cứu cho thấy, MA thể hiện hoạt tính gây độc mạnh trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7 với $IC_{50} = 16,51 \pm 0,22 \mu M$. Tuy nhiên, cơ chế MA kích hoạt quá trình chết của tế bào theo chương trình (apoptosis) trong tế bào ung thư vú MCF-7 vẫn chưa được khám phá. Trong nghiên cứu này, các tác giả đánh giá tác động của MA lên quá trình apoptosis trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7 bằng phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy, kết hợp phân tích mô hình docking phân tử trên caspase-3, caspase-8, caspase-9, Apaf-1 và survivin. Kết quả cho thấy, MA có tác dụng hoạt hoá quá trình chết của tế bào ung thư vú MCF-7 theo chương trình, thông qua cảm ứng caspase-3 *in vitro* và *in silico*, qua đó chứng minh tính kháng tế bào ung thư vú MCF-7 của phân tử này. Nghiên cứu cũng cung cấp những hiểu biết mới về cơ chế hoạt động của MA, đồng thời cho thấy tiềm năng của MA như một lựa chọn điều trị đầy hứa hẹn cho bệnh ung thư vú.

Từ khóa: caspase-3, Markhacanasin A, quá trình chết của tế bào theo chương trình, Thiết đỉnh Cà Ná.

Chỉ số phân loại: 1.4, 1.6

1. Đặt vấn đề

Thiết đỉnh Cà Ná thuộc chi *Makhamia*, họ Quao (*Bignoniaceae*) là loài thực vật mới được phát hiện tại xã Cà Ná, huyện Thuận Nam, tỉnh Ninh Thuận bởi V.S. Dang (2015) [1].

Theo thống kê hiện có khoảng 7 loài thuộc chi *Markhamia* đã được nghiên cứu về thành phần hóa học, chủ yếu là các dẫn xuất phenol, flavonoid, triterpenoid, anthraquinone, naphthoquinone... Trong một nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã phân lập và đánh giá hoạt tính trên các dòng tế bào ung thư (HeLa, HepG2, MCF-7, Jurkat, NCI-H460) của 2 hợp chất là $1\alpha,3\beta,7\beta$ -trihydroxycycloart-24-en-28-oic acid (MA) và $1\alpha,3\beta,22$ -trihydroxycycloart-24-en-28-oic acid (Markhacanasin B) từ cao chiết ethyl acetate lá cây Thiết đỉnh Cà Ná. Thông qua phương pháp nhuộm Sulforhodamine B cho thấy, hợp chất MA gây độc đối với tất cả các dòng tế bào thử nghiệm. Trong số đó, MA thể hiện độc tính mạnh trên dòng tế bào MCF-7 với giá trị IC_{50} là $16,51 \pm 0,22 \mu M$ [2]. Một số nghiên cứu khác về dược lý của chi *Makhamia* cho thấy, các hợp chất cycloartane là musambin A, B, C và dẫn xuất musambioside A, B, C từ lá cây *M. lutea* được cô lập bởi D. Lacroix và cs (2009) [3] có khả năng ức chế dòng tế bào ung thư biểu mô. Nghiên cứu của D.M. El-Kersh và cs (2016) [4] cho thấy, dịch chiết cồn từ lá của *M. zanzibarica* có khả năng ức chế tế bào ung thư cổ tử cung với giá trị IC_{50} là $9,68 \mu g/ml$. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu của M.B. Ibrahim và cs (2018) [5] cho thấy, mollic acid cô lập từ lá *M. tomentosa* có khả năng ức chế dòng ung thư cổ tử cung [5].

Apoptosis là một kiểu chết tế bào theo chương trình thông qua sự kích hoạt các protease tế bào là các caspase có vai trò phân cắt protein làm mất cấu trúc và chức năng của tế bào [6, 7]. Caspase-3 là protease

liên quan đến giai đoạn đầu của quá trình chết theo chương trình. Cụ thể, caspase này xúc tác cho sự phân cắt nhiều protein quan trọng của tế bào, đóng vai trò quan trọng trong quá trình ngưng tụ chất nhiễm sắc apoptotic và phân mảnh DNA [8-10]. Do đó, caspase-3 được xem là enzyme chủ chốt gây ra quá trình chết theo chương trình.

Các caspase liên quan đến quá trình apoptosis được chia thành 2 nhóm chính là caspase khơi mào (caspase-8, caspase-9) và caspase tác động (caspase-3 hoặc caspase-7) [11]. Do đó, quá trình kích hoạt caspase-8, caspase-9 hay kích hoạt trực tiếp caspase-3 sẽ ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình apoptosis của tế bào. Trong các nghiên cứu gần đây, quá trình kích hoạt caspase-3 thông qua caspase-9 có thể được thực hiện thông qua quá trình ức chế survivin, một protein thuộc họ IAPs, có tác dụng chống lại quá trình chết tế bào thông qua liên kết với procaspase-9, cytochrome C, Apaf-1 và ngăn chặn sự hình thành caspase-3 [12-14]. Survivin chỉ được biểu hiện quá mức đối với tế bào ung thư mà không được phát hiện ở tế bào thường [15, 16], cụ thể với dòng tế bào ung thư vú, survivin biểu hiện protein ở mức 70,7-90,2%. Trong nghiên cứu của S.I. Wanandi và cs (2020) [17], việc ức chế survivin đã được chứng minh là có liên quan đến quá trình kích hoạt caspase-3. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xây dựng mô hình docking phân tử của hợp chất MA với caspase-3, caspase-8, caspase-9, Apaf-1 và survivin để chứng minh hoạt tính kháng ung thư mạnh trên dòng tế bào MCF-7 của MA thông qua cơ chế kích hoạt caspase-3.

Hiện chưa có nghiên cứu nào đánh giá cơ chế cảm ứng quá trình apoptosis lên tế bào ung thư vú MCF-7 của MA. Chính vì thế, nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác định phần trăm tế bào ung thư vú MCF-7 dương tính caspase-3 sau khi xử lý với hoạt chất trên. Ngoài

*Tác giả liên hệ: Email: quoctrunghmd@gmail.com, ntngia@vnkgu.edu.vn

In silico and in vitro study on apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells lines via caspase-3 activation of Markhacanasin A

Quoc Trung Nguyen^{1*}, Khanh Hung Nguyen¹,
Trong Nghia Ngo^{2*}, Tan Phat Nguyen³

¹Faculty of Chemistry, University of Science, Vietnam National University - Ho Chi Minh City,
227 Nguyen Van Cu Street, Ward 4, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Faculty of Environment and Natural Resources, Kien Giang University,
320A Highway 61, Minh Luong Town, Chau Thanh District, Kien Giang Province, Vietnam

³Institute of Chemical Technology, Vietnam Academy of Science and Technology,
1A, TL29 Street, Thanh Loc Ward, District 12, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 17 February 2023; revised 13 March 2023; accepted 16 March 2023

Abstract:

Markhacanasin A (MA), a cycloartane-type triterpenoid was isolated from the leaves of *Markhamia stipulata* var. *canaense* V.S. Dang, collected in Ninh Thuan province, Vietnam. In our previous study, it was found that MA possessed potential cytotoxicity against MCF-7 human breast cancer cell lines, with an $IC_{50}=16.51\pm0.22$ μ M. However, the mechanism by which MA triggers apoptosis in the MCF-7 cells has not been explored yet. Therefore, this study has been conducted to investigate the mechanism of apoptosis induction in the MCF-7 cell lines by MA. The study utilised the flow cytometry method and molecular docking patterns analysis of caspase-3, caspase-8, caspase-9, Apaf-1, and survivin. Interestingly, the results have demonstrated that MA induces apoptosis in the MCF-7 cell line by activating the caspase-3 enzyme, both *in vitro* and *in silico*, which suggests that MA may have therapeutic potential as a breast cancer treatment agent. This study provides new insights into the mechanism of action of MA and highlights its potential as a promising therapeutic option for breast cancer.

Keywords: apoptosis, caspase-3, Markhacanasin A, *Markhamia stipulata* var. *canaense* V.S. Dang.

Classification numbers: 1.4, 1.6

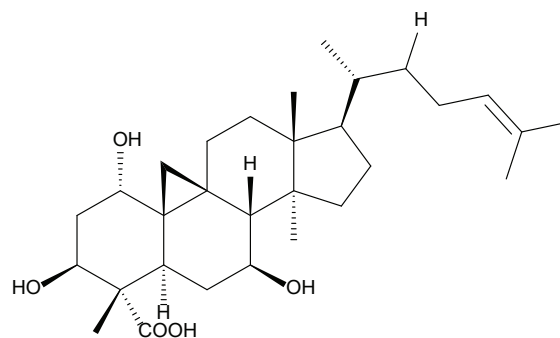
ra, mô hình docking phân tử của các protein liên quan đến con đường cascade như caspase-3, caspase-8, caspase-9, Apaf-1 và survivin cũng được xây dựng nhằm đánh giá khả năng liên kết của MA với các protein để xác nhận khả năng cảm ứng kích hoạt caspase-3.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Dòng tế bào ung thư vú (MCF-7) sử dụng trong nghiên cứu này được cung cấp bởi Viện Tế bào gốc, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.

MA được phân lập từ cao ethyl acetate của lá cây Thiết đỉnh Cà Ná với độ tinh khiết >99%. Cấu trúc hóa học của hợp chất (hình 1) được xác định dựa trên dữ liệu phổ IR, UV, HR-ESI-MS, 1D, 2D-NMR [2].



Hình 1. Cấu trúc của MA.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu khả năng cảm ứng quá trình apoptosis của MA in vitro

Nuôi cấy tế bào và xử lý tế bào với MA: Phân tích apoptosis của tế bào ung thư vú MCF-7 được thực hiện theo phương pháp của H.S. Bagheri và cs (2020) [18] có hiệu chỉnh. Theo đó, tế bào được cấy vào đĩa 6 giếng với mật độ 100.000 tế bào trên 1 giếng. Tế bào sau đó được nuôi cấy trong môi trường DMEM-F12 bổ sung huyết thanh bò (FBS) ở nồng độ 10%, nhiệt độ 37°C, CO₂ 5% (v/v) trong 24 giờ. Sau 24 giờ nuôi cấy, tế bào được xử lý với MA ở các nồng độ 5, 10, 20 và 40 μ M trong 24 giờ tiếp theo. Đối chứng âm được xử lý với DMSO ở nồng độ 0,1%. Sau khi hoàn thành xử lý MA trong 24 giờ.

Nhuộm kháng thể: Sau 24 giờ xử lý MA ở các nồng độ nêu trên, tế bào được tách lên khỏi bề mặt nuôi cấy bằng dung dịch tách tế bào Detachment (Viện Tế bào gốc, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh). Nồng độ tế bào trong mỗi mẫu khoảng 2×10^5 và 1×10^7 tế bào/ml. Mẫu tế bào sau đó được đem đi nhuộm kháng thể để phát hiện sự hoạt động của caspase-3 bằng bộ kit PE Active Caspase-3 Apoptosis (Cat 550914, BD Bioscience, Úc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Rửa tế bào 2 lần bằng dung dịch PBS 1X, sau đó tái huyền phù tế bào trong dung dịch BD Cytofix/Cytoperm ở nồng độ 1×10^6 tế bào/0,5 ml. Ủ dung dịch chứa tế bào trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, ly tâm để tách bỏ dung dịch BD Cytofix/Cytoperm, thu cặn tế bào, rửa tế bào 2 lần trong dung dịch BD Perm/Wash 1X ở nhiệt độ phòng. Tái huyền phù tế bào trong dung dịch BD Perm/Wash 1X cùng với 10 μ l kháng thể và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó rửa mẫu trong 1 ml dung dịch BD Perm/Wash 1X và tái huyền phù trong 0,5 ml dung dịch BD Perm/Wash 1X rồi đem đi phân tích bằng máy FCM FACSJazz (BD Bioscience, Úc).

Xử lý số liệu: Phân tích kết quả được thực hiện bằng phần mềm FlowJo (ver.10.5.3). Các thí nghiệm được thực hiện 3 lần và kết quả được biểu thị bằng trung bình $\pm$ SD.

2.2.2. Nghiên cứu docking phân tử

Chuẩn bị ligand: Hợp chất MA được phác thảo bằng phần mềm Chemdraw Professional 16.0, sau đó được tối ưu hóa cấu trúc 3 chiều trên phần mềm MOE.2022 và năng lượng được giảm thiểu tối đa 0,0001 gradient.

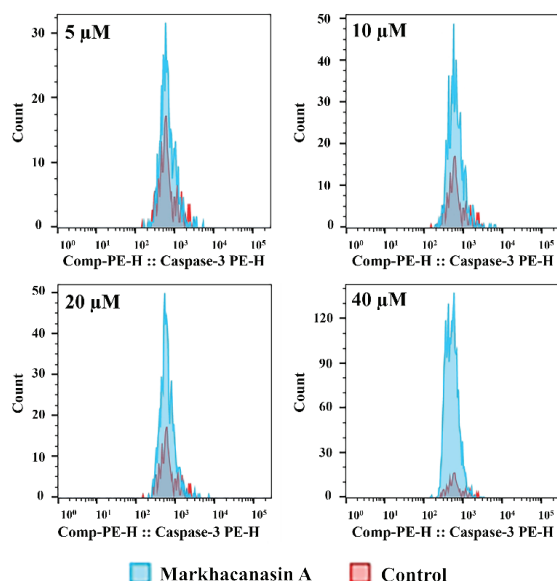
Chuẩn bị protein: Cấu trúc tinh thể của các protein caspase-3 (PDB ID: 2XYG), caspase-8 (PDB ID: 2C2Z), caspase-9 (PDB ID: 1NW9), survivin (PDB ID: 2RAW) và Apaf-1 (PDB ID: 1Z6T) thu được từ ngân hàng cơ sở dữ liệu protein RCSB (<http://www.rcsb.org>). Tất cả các phân tử nhỏ, nước và các phối tử đồng kết tinh được loại bỏ, chỉ giữ lại phân tử chất ức chế. Cấu trúc protein sau đó được cố định điện tích, hydrogen và được solvate trong pha khí sử dụng trường lực AMBER10:EHT. Cấu trúc protein sau đó được tối ưu hóa và xác định vùng tâm hoạt tính bằng công cụ Site Finder trên phần mềm MOE.

Quy trình docking phân tử: Quá trình docking phân tử được thực hiện trên phần mềm MOE.2022. Các thông số docking đã được điều chỉnh để các vùng dummy được chọn làm vùng docking. Phương pháp sắp xếp là triangle matcher, phương pháp tính điểm là London dG. Ngoài ra, phương pháp sàng lọc được chọn là induced receptors và GBVI/WSA, đây là phương pháp chấm điểm để lựa chọn 5 trong số 30 cấu trúc docking tốt nhất của ligand. Các cấu trúc thu được phải có điểm docking tốt nhất (docking score, DS) và giá trị rmsd_refined không cao hơn 3Å.

3. Kết quả và bản luận

3.1. Khả năng cảm ứng quá trình apoptosis in vitro

Tác động của MA từ cây Thiết đình Cà Nà lên quá trình apoptosis của tế bào ung thư vú MCF-7 được phân tích bằng kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy ở các nồng độ MA trong môi trường nuôi cấy là 5, 10, 20 và 40 μM . Kết quả xác định tỷ lệ tế bào dương tính caspase-3 sau khi xử lý mẫu thử được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Ảnh hưởng của hoạt chất MA lên apoptosis của tế bào ung thư vú MCF-7.

Kết quả hình 2 cho thấy, tỷ lệ tế bào apoptosis tăng khi được xử lý với MA. Sau 24 giờ, tỷ lệ tế bào dương tính caspase-3 tăng lên $4,5 \pm 0,6\%$ ở nồng độ 5 μM MA, $6,6 \pm 0,4\%$ ở nồng độ 10 μM MA, $6,9 \pm 0,6\%$ ở nồng độ 20 μM MA và tăng đáng kể lên $19,4 \pm 0,9\%$ khi ở nồng độ 40 μM MA so với đối chứng khoảng $4,0 \pm 0,2\%$. Ở nồng độ xử lý 5 μM , không có sự khác biệt về tỷ lệ tế bào dương tính caspase-3

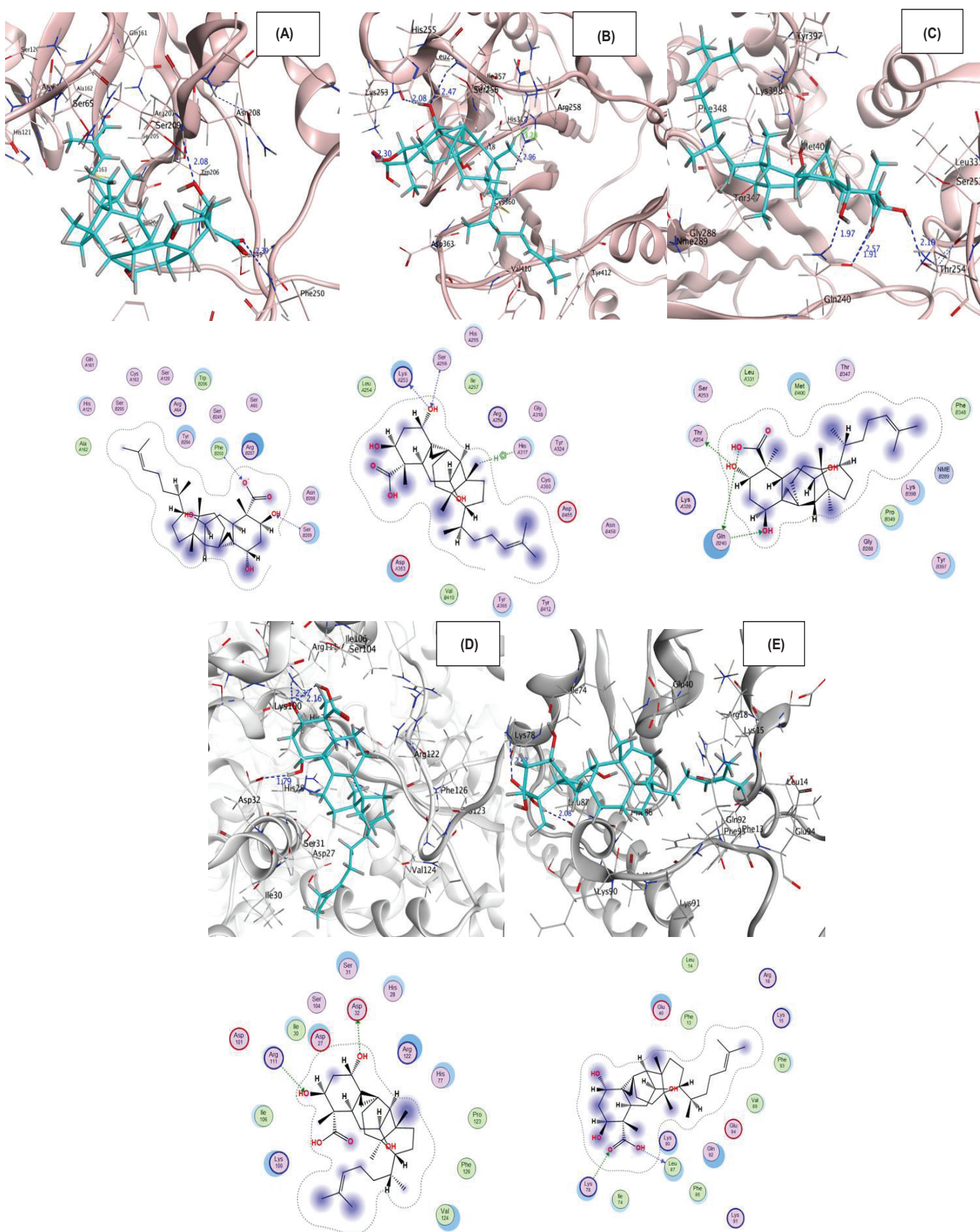
so với đối chứng. Có thể kết luận rằng, MA là một hợp chất có khả năng cảm ứng sự chết tế bào theo chương trình. Nghiên cứu trước đây của B. Ibrahim và cs (2013) [19] đã cho thấy dịch chiết ethanol của *M. tomentosa* có khả năng gây apoptosis trên tế bào ung thư cổ tử cung. Cụ thể, ở nồng độ 189 $\mu\text{g/ml}$, dịch chiết đã làm tăng tỷ lệ tế bào apoptosis sớm lên 25,9% so với đối chứng là 0,4% sau 24 giờ xử lý.

3.2. Khả năng liên kết với caspase của MA in silico

Mô hình docking phân tử của MA với các protein liên quan đến quá trình apoptosis trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7 cho thấy, phân tử MA tương tác với nhiều amino acid tại trung tâm hoạt động của protein thông qua các liên kết hydrogen mạnh. Dựa trên con đường cascade kích hoạt caspase-3 để quá trình apoptosis diễn ra mạnh mẽ hơn, việc kích hoạt tốt hay khả năng tạo phức hợp caspase - hợp chất đích càng tốt và survivin bị ức chế càng mạnh thì hoạt tính gây chết tế bào ung thư càng cao [20]. Dựa trên kết quả thu được ở bảng 1 và mô hình tương tác 2D, 3D của MA với các protein, chúng tôi có thể chứng minh được khả năng kích hoạt caspase-3 của MA thông qua cơ chế kích hoạt trực tiếp caspase-3 hoặc gián tiếp dựa trên kích hoạt caspase-8, caspase-9 hay Apaf-1. MA có thể tạo liên kết hydrogen mạnh với Ser209 và Phe250 với giá trị năng lượng liên kết cao là 6,9606 Kcal/mol, giá trị này chỉ thấp hơn chất ức chế TQ8 (N-[(2S)-4-chloro-3-oxo-1-phenyl-butan-2-yl]-4-methyl-benzenesulfonamide) của caspase-3 và gần như tương đồng với 2 loại thuốc đang được sử dụng để điều trị ung thư vú ở người là Doxorubicin ($\text{IC}_{50}=4,39 \mu\text{M}$) [21] và Raxoflofen ($\text{IC}_{50}=10 \mu\text{M}$) [22]. Trong nghiên cứu của X. Ma và cs (2017) [23], một triterpenoid có khung tương tự với MA là ursolic acid (UA), nhóm carboxylic của UA hình thành liên kết hydrogen với Ser và Arg trên protein caspase-3 (PDB ID: 5I4C). Quá trình tương tác này cũng được quan sát trên mô hình 2D nhóm carboxylic của MA, có hình thành liên kết hydrogen với Phe và tương tác với Arg, ngoài ra còn có liên kết hydrogen với Ser (hình 3). Với những bằng chứng thu được từ mô hình docking phân tử, MA hình thành phức hợp tốt với caspase-3 và kích hoạt quá trình apoptosis, chứng minh tính kháng tế bào ung thư vú MCF-7 của phân tử này.

Bảng 1. Kết quả docking phân tử của MA, Native ligand (NL), chất đối chứng (Doxorubicin, Raxoflofen) với protein kích hoạt caspase.

Protein	Docking score (Kcal/mol)				Loại liên kết	AAs liên kết
	MA	NL	Doxorubicin	Raxoflofen		
Apaf-1 (PDB ID: 1Z6T)	-8,4969	-9,0508	-	-	H-donor	Asp32
					H-acceptor	Arg111
Caspase-3 (PDB ID: 2XYG)	-6,9606	-7,1375	-7,0313	-7,1838	H-acceptor	Ser209
					H-acceptor	Phe250
					H-donor	Lys253
Caspase-8 (PDB ID: 2C2Z)	-6,8253	-8,4308	-7,5334	-7,6949	H-acceptor	Ser256
					H-pi	His317
					H-donor	Thr254
Caspase-9 (PDB ID: 1NW9)	-6,4453	-	-7,3119	-7,9543	H-donor	Gln240
					H-acceptor	Gln240
Survivin (PDB ID: 2RAW)	-6,5513	-	-6,8293	-7,6180	H-donor	Leu87
					H-acceptor	Lys78



Hình 3. Mô hình docking phân tử 2D và 3D của MA với caspase-3 (A), caspase-8 (B), caspase-9 (C), Apaf-1 (D) và survivin (E).

Bên cạnh đó, MA cũng cho thấy kết quả tương tác tốt với Apaf-1, một protein khi kết hợp với cytochrome C sẽ tạo thành phức hợp apoptosome, tiền chất trong tổng hợp caspase-3; tương tác khá tốt với caspase-8 và caspase-9, các protein khởi mào cho quá trình apoptosis [24]. Đáng chú ý, trong quá trình nghiên cứu quá trình docking phân tử, MA cũng cho thấy khả năng ức chế khi tạo thành phức hợp với survivin, một protein ức chế quá trình apoptosis [20]. Nhìn chung, với kết quả thu được từ thử nghiệm *in silico*, MA cho thấy khả năng tương tác tốt với protein caspase, kích hoạt quá trình apoptosis thông qua cảm ứng caspase-3.

Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy hoạt chất MA có hoạt tính gây độc tế bào ung thư vú MCF-7 bằng cách gây ra quá trình chết tế bào theo chương trình. Phân tích docking phân tử đã cho thấy, MA có khả năng tương tác tốt với các protein caspase, kích hoạt quá trình apoptosis thông qua cảm ứng caspase-3. Kết quả của nghiên cứu này đã cho thấy MA được phân lập từ cây Thiết đỉnh Cà Ná tại tỉnh Ninh Thuận có tiềm năng phát triển như một loại thuốc chống ung thư. Tuy nhiên, để có kết luận chính xác hơn về con đường ức chế, cũng như vị trí cảm ứng của MA, các thử nghiệm về biểu hiện protein cần được thực hiện nhiều hơn, cũng như các nghiên cứu docking về tương tác của protein-protein, protein-protein-ligand cần được thực hiện thêm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] V.S. Dang (2015), "A new variety of *Markhamia stipulata* (Bignoniaceae) from Southern Vietnam", *Taiwania*, **60**(3), pp.129-132, DOI: 10.6165/tai.2015.60.129.
- [2] T.N. Ngo, N.M. Phan, T.D. Bui, et al. (2017), "Cytotoxic cycloartane triterpenoids from the leaves of *Markhamia stipulata* var. *canaense*", *Phytochemistry Letters*, **22**, pp.251-254, DOI: 10.1016/j.phytol.2017.10.020.
- [3] D. Lacroix, S. Prado, A. Deville, et al. (2009), "Hydroperoxy-cycloartane triterpenoids from the leaves of *Markhamia lutea*, a plant ingested by wild chimpanzees", *Phytochemistry*, **70**(10), pp.1239-1245, DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.06.020.
- [4] D.M. El-Kersh, R.S. El Dine, D.R. Abou-Hussein, et al. (2016), "Cytotoxicity and chemical investigation of the aerial parts of *Markhamia zanzibarica* (Bojer Ex Dc.) K. Schum. (Bignoniaceae)", *Live Science Journal*, **13**(2), pp.22-26.
- [5] M. Ibrahim, A. Sowemimo, L. Venables, et al. (2018), "Biological evaluation of phytoconstituents from *Markhamia tomentosa* ethanolic leaf extract", *South African Journal of Botany*, **115**, pp.31-36, DOI: 10.1016/j.sajb.2017.12.014.
- [6] M.C. Maiuri, E. Zalcvar, A. Kimchi, et al. (2007), "Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8**(9), pp.741-752, DOI: 10.1038/nrm2239.
- [7] T.N. Aung, Z. Qu, R.D. Kortschak, et al. (2017), "Understanding the effectiveness of natural compound mixtures in cancer through their molecular mode of action", *International Journal of Molecular Sciences*, **18**(3), DOI: 10.3390/ijms18030656.
- [8] J.C. Reed (2000), "Mechanisms of apoptosis", *The American Journal of Pathology*, **157**(5), pp.1415-1430, DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64779-7.

- [9] A.G. Porter, R.U. Jänicke, (1999), "Emerging roles of caspase-3 in apoptosis", *Cell Death & Differentiation*, **6**(2), pp.99-104, DOI: 10.1038/sj.cdd.4400476.
- [10] H.Y. Chang, X. Yang, (2000), "Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspases", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**(4), pp.821-846, DOI: 10.1128/MMBR.64.4.821-846.2000.
- [11] Y. Shi (2004), "Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view", *Protein Science*, **13**(8), pp.1979-1987, DOI: 10.1110/ps.04789804.
- [12] M. Xiao, W. Li (2015), "Recent advances on small-molecule survivin inhibitors", *Current Medicinal Chemistry*, **22**(9), pp.1136-1146, DOI: 10.2174/0929867322666150114102146.
- [13] P.A. Quispe, M.J. Lavecchia, I.E. Leon (2019), "On the discovery of a potential survivin inhibitor combining computational tools and cytotoxicity studies", *Heliyon*, **5**(8), DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e02238.
- [14] M.A. Martínez-Sifuentes, S. Bassol-Mayagoitia, M.P. Nava-Hernández, et al. (2022), "Survivin in breast cancer: A review", *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, **26**(9), pp.411-421, DOI: 10.1089/gtmb.2021.0286.
- [15] C.H.A. Cheung, C.C. Huang, F.Y. Tsai, et al. (2013), "Survivin-biology and potential as a therapeutic target in oncology", *Onco Targets and Therapy*, **6**, pp.1453-1462, DOI: 10.2147/OTT.S33374.
- [16] P.K. Jaiswal, A. Goel, R.D. Mittal (2015), "Survivin: A molecular biomarker in cancer", *The Indian Journal of Medical Research*, **141**(4), pp.389-397, DOI: 10.4103/0971-5916.159250.
- [17] S.I. Wanandi, A. Limanto, E. Yunita, et al. (2020), "In silico and in vitro studies on the anti-cancer activity of andrographolide targeting survivin in human breast cancer stem cells", *PLOS ONE*, **15**(11), DOI: 10.1371/journal.pone.0240020.
- [18] H.S. Bagheri, S.H. Rasta, S.M. Mohammadi, et al. (2020), "Low-level laser irradiation modulated viability of normal and tumor human lymphocytes in vitro", *Journal of Lasers in Medical Sciences*, **11**(2), pp.174-180, DOI: 10.34172/jlms.2020.29.
- [19] B. Ibrahim, A. Sowemimo, L. Spies, et al. (2013), "Antiproliferative and apoptosis inducing activity of *Markhamia tomentosa* leaf extract on HeLa cells", *Journal of Ethnopharmacology*, **149**(3), pp.745-749, DOI: 10.1016/j.jep.2013.07.040.
- [20] N. Albadari, W. Li, (2023), "Survivin small molecules inhibitors: Recent advances and challenges", *Molecules*, **28**(3), DOI: 10.3390/molecules28031376.
- [21] S. Peter, S. Alven, R.B. Maseko, et al. (2022), "Doxorubicin-based hybrid compounds as potential anticancer agents: A review", *Molecules*, **27**(14), DOI: 10.3390/molecules27144478.
- [22] D.E. Kim, Y. Kim, D.H. Cho, et al. (2015), "Raloxifene induces autophagy-dependent cell death in breast cancer cells via the activation of AMP-activated protein kinase", *Molecules And Cells*, **38**(2), pp.138-144, DOI: 10.14348/molcells.2015.2193.
- [23] X. Ma, Y. Zhang, Z. Wang, et al. (2017), "Ursolic acid, a natural nutraceutical agent, targets caspase3 and alleviates inflammation-associated downstream signal transduction", *Molecular Nutrition & Food Research*, **61**(12), DOI: 10.1002/mnfr.201700332.
- [24] F.S. Yu, A.C. Huang, J.S. Yang, et al. (2012), "Safrole induces cell death in human tongue squamous cancer SCC-4 cells through mitochondria-dependent caspase activation cascade apoptotic signaling pathways", *Environmental Toxicology*, **27**(7), pp.433-444, DOI: 10.1002/tox.20658.